Technische Universität München
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar

Der humane Natrium-Iodid-Symporter in der Verwendung als kardiales Reportergen

Moritz Dirk Beyer

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger
2. Priv.-Doz. Dr. K. A. Tiroch

Die Dissertation wurde am 05.09.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.03.2012 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 5
1.1 Geschichte 5
1.2 Die Gentherapie 5
1.3 Offene Fragen in der kardiovaskulären Gentherapie 6
1.4 Stand der aktuellen kardialen Molekularforschung 9
1.5 Die kardiale molekulare Bildgebung 9
1.5.1 Direkte Markierung 9
1.5.2 Indirekte Markierung 10
1.6 Die Reportergene 11
1.6.1 Die Transporterproteine 11
1.6.2 Die Gruppe der Enzyme 12
1.6.3 Die Gruppe der Rezeptorproteine 13
1.7 Die Vektoren 13
1.8 Der Promoter 14
1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit 15
2 Material und Methoden 16
2.1 Die Vektoren 16
2.1.1 Der Natrium-Iodid-Symporter-Vektor 16
2.1.2 Der Kontrollvektor 16
2.1.3 Die Vektorpräparation 16
2.2 Die Tiere und ihre Haltung 17
2.2.1 Der Tierversuchsantrag 17
2.2.2 Die Tiere 17
2.2.3 Die Tierhaltung 17
2.3 Der Versuchsplan 18
2.3.1 Übersicht 18
2.3.2 Die Titrations- und Kinetikstudie (Studie I und II) 19
2.3.3 Der Zeitverlauf der hNIS Genexpression (Studie III) 20
2.3.4 Die Inhibitionsstudie mit Natriumperchlorate (Studie IV) 20
2.4 Die Anästhesie 21
2.5 Der myokardiale Gentransfer 22

2.5.1 Das Ultraschallgerät 22
2.5.2 Die Vorbereitung der Tiere 22
2.5.3 Die direkte myokardiale Injektion 24
2.6 Die Nuklide 24
2.6.1 ^{123}Iod 24
2.6.2 ^{99m}Technetium 24
2.7 Die Präparation der Spritzen und Vorbereitung der Tiere 25
2.8 Die konventionelle planare Szintigraphie 25
2.8.1 Die Gammakamera 25
2.8.2 Die serielle Bildgebung 25
2.8.3 Die verwendete ROI Methodik 26
2.8.4 Die Datenerfassung 26
2.8.5 Die Rechenformel der Szintigraphie 27
2.8.6 Die optische Ergebnisdarstellung der Szintigraphie 28
2.9 Die Biodistribution 29
2.9.1 Die Organentnahme 29
2.9.2 Der Bezugsstandard 29
2.9.3 Der Gamma Zähler 29
2.9.4 Die Rechenformel der Biodistribution 30
2.10 Die Histologie 31
2.10.1 Die Gewebedünnschnitte mit dem Mikrotom 31
2.10.2 Der Natrium-Iodid-Symporter Nachweis in der Autoradiographie 31
2.10.3 Der histologische β-Galaktosidase Nachweis 31
2.11 Die statistische Auswertung der Ergebnisse 32
3 Ergebnisse 33
3.1 Die dynamische Szintigraphie (Studie I) 33
3.1.1 Das Herz 33
3.1.2 Die Schilddrüse 36
3.1.3 Der Magen 38
3.2 Die Korrelation von Reportersignalstärke und Vektordosis (Studie II) 40
3.3 Der Zeitverlauf der hNIS Genexpression (Studie III) 43
3.4 Die spezifische Blockade der Nuklidaufnahme mit Natriumperchlorat (Studie IV) 44

3.5 Die kardiale in-vivo / ex-vivo Korrelationsanalyse 50
3.6 Die Organbiodistribution 53
3.7 Die Histologie 59
3.7.1 Der visuelle Vektornachweis 59
3.7.2 Die Korrelation von Nuklidanreicherung und Vektordosis in der Autoradiographie 60
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse 62
4 Diskussion 64
4.1 Ergebnisse 64
4.1.1 Die spezifische Nuklidanreicherung durch NIS nach Gentransfer 64
4.1.2 Die physiologische Nuklidanreicherung in der Schilddrüse und im Magen 67
4.1.3 Organbiodistribution 67
4.2 Histologie 69
4.3 Fazit 70
5 Zusammenfassung 72
6 Literaturverzeichnis 73
7 Anhang 81
7.1 Abbildungsverzeichnis 81
7.2 Tabellen- und Formelverzeichnis 83
7.3 Danksagung 84

1 Einleitung

1.1 Geschichte

Erst Anfang des 20. Jahrhunderts konnte nachgewiesen werden, dass Erbinformation in Chromosomen verpackt im Zellkern liegt und diese auf der molekularen Ebene aus Protein und Nukleinsäure Polymeren bestehen. Bei lediglich 4 unterschiedlichen im Chromosom vorkommenden Nukleinsäuren favorisierte man die Proteine als Träger der Erbinformation bis schließlich 1944 Oswald Avery nachweisen konnte, dass die Nukleinsäuren für die Erbinformation kodieren. Er inkubierte harmlose Pneumokokken mit einem fraktionierten Lysat aus pathogenen Pneumokokken. Die harmlosen Pneumokokken, welche mit dem nukleinsäurehaltigem Lysat inkubiert worden waren, verwandelten sich in die pathogenen Pneumokokken (4). Die molekulare Struktur der DNS, nämlich als Doppelhelix, wurde 1953 gemeinsam von James Watson und Francis Crick postuliert (92).

1990 wurde ein internationales Forschungsprojekt, das sogenannte Humangenomprojekt, gegründet, um die Nukleotid-Abfolge im gesamten menschlichen Genom zu bestimmen. Gregory et al veröffentlichte 2005 als letztes der 23 menschlichen Chromosome das Chromosom 1 (32).

Herzkreislaufversagen ist in Deutschland nach wie vor Todesursache Nummer eins. Mit 43,36 Prozent aller Sterbefälle ist das fast die Hälfte. Auf Platz zwei rangieren die Sterbefälle aufgrund von Krebserkrankungen mit 26,28 Prozent[1].

Die Gentherapie ist eine vielversprechende Möglichkeit diese Krankheitsentitäten zu therapieren. Vision dieser Therapie ist es, kardiale Funktionsstörungen auf molekularer Ebene, also auf Ebene der DNS, zu korrigieren.

1.2 Die Gentherapie

Die deutsche Gesellschaft für Gentherapie e.V. definiert Gentherapie wie folgt: „Durch Übertragung von Genen (Träger der Erbinformation) in geeignete Zellen oder Gewebe des Körpers sollen fehlende oder defekte Funktionen des Organismus wiederhergestellt werden.

[1] Quelle Destatis 2007

Zur Übertragung geeigneter Gene bedient man sich verschiedener physikalischer, chemischer oder biologischer Techniken (Gentransfer).“ Je nach Gentherapiestrategie unterscheidet man:

- **Substitutionstherapie:** Die fehlende, fehlerhafte bzw. ungenügende Genfunktion, welche sich auf einen Gendefekt zurückführen lässt, wird ersetzt bzw. verstärkt.
- **Additionstherapie:** Die vorhandenen physiologischen Genfunktionen werden verstärkt, z. B. die Immunabwehr im Rahmen einer Infektionserkrankung oder eines Krebsleidens.
- **Suppressionstherapie:** Pathologisch aktive Gene werden ausgeschaltet.

In den 90iger Jahren wurden bereits die ersten klinischen Studien durchgeführt (77). Die Hoffnungen in die Gentherapie waren unter Medizinern erwartungsgemäß groß. Die ersten Studien enttäuschten und konnten keine signifikante therapeutische Wirksamkeiten zeigen. Es traten unter Gentherapie mehrere schwerwiegende Komplikationen auf. Zum Beispiel verstarb nach einer erhöhten Adenovektordosis Applikation im Jahr 1999 ein Patient, welcher unter einem geringem Ornithincarbamoyltransferase-Mangel (Genlokus Xp21.1) litt (18, 54). In einer weiteren Studie zur Therapie an SCID[2]-X1 erkrankter Patienten entwickelten diese eine prämaligne T-Zell-Proliferation (38). Aufgrund dieser tragischen Vorfälle wurden zunächst strengere Vorschriften für klinische Gentherapie-Studien erlassen, und es wurde der Bedarf an genaueren mechanistischen Untersuchungen erhöht.

1.3 Offene Fragen in der kardiovaskulären Gentherapie

In der Kardiologie konnte eine Reihe molekularer Mechanismen entdeckt werden, welche für den Beginn und den Fortschritt der meisten kardialen Erkrankungen verantwortlich sind. Es besteht die Hoffnung, dass mit Hilfe der Gentherapie die Aktivität dieser Proteine verändert und damit eine Reihe von Herzerkrankungen behandelt oder verhindert werden kann. Ob die Gen-/Zelltherapie in der zukünftigen Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen eine größere Rolle spielen wird, ist jedoch noch zu belegen (10, 28, 47). Die meisten Modalitäten sind noch nicht zufriedenstellend geklärt:

[2] SCID = severe combined immunodeficiency (deutsch: schwerer kombinierter Immundefekt)

1. **Wie lässt sich der Gencode ausreichend stark und sicher in die Zielzelle einschleusen?**
   Selbst der effizienteste Vektor muss bei durchschnittlich 10^{10-11} humanen Kardiomyozyten in hohen Dosen (ca. 10^{11} Genkopien) appliziert werden, um eine effektive Genexpression im Herzen gewährleisten zu können. Auf der einen Seite ist es nötig eine hohe Vektordosis zu applizieren und auf der anderen Seite muss gleichzeitig die Transfektion anderer Organe so gering wie möglich gehalten werden, um eine Funktionsstörung bis tödliche Schädigung des übrigen Organismus zu vermeiden. Grundsätzlich lässt sich eine hohe Transfektionsrate nach lokaler Injektion am besten erreichen, z.B. Thorakotomie oder als Injektion direkt über den epigastrischen Winkel. Diese Methode ist invasiv und birgt die damit verbundenen Risiken. Zu bevorzugen wäre eine systemische, nicht invasive Applikationsform, z.B. intravenös, transdermal oder oral. Bislang konnte kein Vektor mit dem benötigt starkem myokardialem Tropismus gefunden werden. Ein Mittelweg stellt die Katheter geführte intrakoronare Injektion dar. Prinzipiell kann der Gencode „nackt“, verpackt in künstlichen Sphären oder in modifizierten Viren appliziert werden.

2. **Was ist die optimale Stärke der Genexpression im zeitlichen Verlauf?**
   Die verschiedenen kardiologischen Krankheitsentitäten und deren zugrunde liegenden Proteom[3]defekte unterscheiden sich deutlich. Je nach Erkrankung und Therapiekonzept ist eine unterschiedlich zeitlich modulierte Genexpression nötig. Außerdem muss die Höhe der Genexpression individuell angepasst werden und gegebenenfalls bei einer pathologischen Zelle fortlaufend zusätzlich adaptiert werden (9). Bei einer zu niedrigen Genexpression würde der therapeutische Effekt gar nicht bis unzureichend erreicht werden. Hingegen könnte eine Überexpression des Transgens am Herzen vital bedrohliche Komplikationen verursachen.

   Zum Beispiel ist das vererbte Long QT Syndrom durch einen lebenslangen Austausch des defekten Ionenkanals therapierbar (94). Hingegen beim akuten Herzversagen reicht eine transiente Anhebung verschiedener Genexpressionen, z.B. Phosphatase Inhibitor Typ 1 (68), für ein paar Wochen, Monate oder Jahre. Wenn die Herzfunktion wieder ausreichend hergestellt ist, wird es bei manchen Patienten nötig sein die Genexpression auf ein supranormales bis normales Niveau zu setzen. Und bei der koronaren Herzkrankheit genügt bereits eine kurzfristige Expression vaskulärer Wachstumsfaktoren (42, 58, 59), um eine unkontrollierte Gefäßproliferation zu vermeiden. In Abhängigkeit vom klinischen Verlauf einer Erkrankung ist es eventuell nötig, die Genexpression des Therapiegens wiederholt „aus- und einschalten“ zu können.

3. **Was sind die Risiken einer Gentherapie? Und wie lassen sich diese vermeiden oder vermindern, um eine ausreichendes Sicherheitsniveau zu gewährleisten?**
   Der Zeitpunkt, Zeitverlauf und die Dauer der gewünschten therapeutischen Genexpression müssen kontrollierbar und ausreichend erforscht sein. Die Gentherapie ermöglicht es die Erkrankungen bzw. Funktionsstörungen des Organismus auf

---

[3] Die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment, unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt, wird als Proteom bezeichnet

zellulärer Ebene bzw. in der DNS zu beeinflussen. Schäden oder Störungen in der Proteinsynthese der Zellen können von leichten Funktionsstörungen bis zum Multiorganversagen führen. Die viralen Vektoren sind immunogen, induzieren eine Entzündungsreaktion und können theoretisch durch Rekombination mit einem Wildtypvirus wieder an Virulenz zurück gewinnen. Die Sicherheit muss auf verschiedenen Ebenen gewährleistet werden können.

a. Lokaler Einfluss auf die Herzfunktion:
   Die Methoden des Gentransfers werden fortlaufend verbessert, jedoch ist eine homogene Transfektion des gesamten Myokards aktuell nicht möglich. Daher ist es wichtig, dass eine heterogene Transfektion nicht nur den gewünschten therapeutischen Effekt erreicht, sondern auch keine Arrhythmien im kranken Herz verstärkt oder sogar verursacht. Dieses besitzt oftmals bereits eine elektrische Heterogenität mit einem erhöhten Risiko für Arrhythmien (71, 99). Der virale Vektor muss weiterentwickelt werden, um die Immunogenität zu minimieren, welcher die Effizienz der Gentherapie vermindert und eine iatrogene Myokarditis verursachen kann. Dies könnte vor allem bei einem vorgeschädigtem Herz vital bedrohliche Konsequenzen haben.
b. Einfluss auf den Gesamtkörper:
   Auch wenn der Vektor, z.B. chirurgisch oder Katheter geführt, lokal appliziert wird, lässt sich aufgrund des physiologischen Gewebe „Wash out“ eine geringe systemische Distribution nicht verhindern. Der „Wash out“ Effekt wird durch die Gewebeperfusion und den lymphatischen Abtransport verursacht. Deswegen ist eine gründliche toxikologische Erforschung und eine Verbesserung des kardialen Tropismus nötig, um Komplikationen, welche durch die potentielle Immunogenität des Transgens und/oder der viralen Vektor DNS induziert werden, zu vermeiden bzw. zu minimieren. Kodiert das Transgen ausschließlich für herzzellspezifische Proteine sind toxische Schäden nach einer systemischen Verbreitung eher nicht zu erwarten. Wird jedoch das Transgen in vielen verschieden Körperzellen exprimiert, ist ein toxischer Schaden viel wahrscheinlicher.
c. Potentielle Auswirkungen auf das Erbgut:
   Die Adenoviren und rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (rAAV)(20), schleusen ihr Genom als sogenannte episomale DNS in die Wirtzelle, wo es innerhalb des Zellkerns getrennt von den Chromosomen verbleibt. Es wurde bis dato angenommen, dass die episomal lokalisierte DNS die Wirts DNS nicht verändert, jedoch zeigen neuere Studien, dass die DNS von rAAV sich in verschiedenen Fällen auch in die Wirts DNS integriert (56, 80). Bei anderen Virenarten, wie z.B. Lentiviren und Retroviren, ist es für die Transkription essentiell, dass ihr Genom in die Wirts DNS integriert wird (3). Über 90% des menschlichen Genoms scheinen für keine spezifischen Gene zu kodieren. Eine Insertion des viralen Kodes in Bereiche mit aktiven Genen kann trotzdem nicht sicher ausgeschlossen werden. Einige Lenti- und Retroviren fügen sich bevorzugt in Genom-Abschnitte ein, welche aktive Gene bzw. deren regulatorischen Elemente tragen. Dies nennt man Insertions-Mutagenese, weil es zu einer Mutation des aktiven Gens kommt. Hierdurch lässt sich auch erklären, wieso Kinder mit SCID[4], welche mit einem Retrovirus behandelt

[4] SCID (Severe combined immunodeficiency) Schweres kombiniertes Immundefizit

worden waren, eine erhöhte Inzidenz für Lymphome zeigten. Der Retrovirus fügte sich bevorzugt vor das LMO2 Protoonkogen ein, welches zu einer Überexpression und konsekutiv zu einer bösartigen Entartung der Zelle führte.

1.4 Stand der aktuellen kardialen Molekularforschung

In den meisten klinischen Gen- oder Zelltherapiestudien am Herzen wird das Therapiegen oder die therapeutisch veränderte Stammzelle ohne eine Markierung oder Koppelung mit einem Reportergen appliziert. Die Überprüfung des therapeutischen Erfolgs wird indirekt durch die Kontrolle der klinischen Parameter, wie Myokardkontraktilität, -perfusion, -vitalität und Infarktgröße bestimmt. Die klinischen Parameter werden durch unterschiedliche Methoden bzw. Geräte erfasst und sind dadurch nur eingeschränkt vergleichbar. Im klinischen Alltag steht entsprechend der örtlichen Gegebenheiten die Echokardiographie, das Kardio-MRT, die PET, SPECT, EPU und Angiographie zur Verfügung.

1.5 Die kardiale molekulare Bildgebung

Generell kann das Therapiegen oder die Therapiestammzelle entweder direkt oder indirekt markiert und so lokalisiert werden. Bei beiden Methoden ist es theoretisch möglich, dass die Markierung des Therapiegens oder der Stammzelle zerstört und/oder die Funktion der Wirts- oder Stammzelle bis hin zum Zelltod beeinträchtigt wird.

1.5.1 Direkte Markierung

Die direkte Markierung kann durch Kopplung an ein Markersubstrat, z.B. ein Radioisotop oder eine paramagnetische Substanz (ein Gadolinum-Chelat oder ein Eisen-Nanopartikel) erfolgen. Diese Methode hat den Nachteil, dass das Markersignal weder mit der Aktivität der Genexpression noch der Zellvitalität korrelieren kann.

1.5.2 Indirekte Markierung

Die indirekte Markierung erfolgt durch Kopplung an ein Reportergen. Die Aktivität des Reportergenes korreliert mit der Aktivität des Therapiegens. Ist das Reportergen immunogen, so führt dies zum frühzeitigen Tod der Wirtszelle. Die geeigneten Reportergene können entweder mit den Therapiegenen oder in den transplantierten Zellen coexprimiert werden und ermöglichen so eine nuklearmedizinische Bildgebung zur Erfassung der Lokalisation, Quantifikation und Persistenz der Transgen Expression im Herzen bzw. im gesamten Organismus (13, 46, 96, 97).

Die Bildgebung von Reportergenexpression durch radioaktive oder radionuklidmarkierte Reportersubstrate ist hierfür sehr vielversprechend. So ist es auch möglich z.B. mit der PET die Myokardfunktion, -perfusion und -vitalität zu bestimmen. Diese Methode wird für die Weiterentwicklung der Molekulartherapie als sehr hilfreich betrachtet. Sie ermöglicht (a.) die optimale Methode der Gen- oder Zellapplikation für die jeweilige Situation zu identifizieren, (b.) die therapeutische Effizienz individuell zu bestimmen und (c.) den Zeitverlauf der Genexpression und/oder den Verbleib der transplantierten Zellen im Zielgewebe und Ganzkörper zu visualisieren.

Die bisherigen Studien zur molekularen Bildgebung am Herzen konzentrierten sich auf die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (HSV-tk) in der Funktion des Reportergenes. Die benötigten Radiopharmaka für die Bildgebung mit der Thymidinkinase sind Nukleosidanaloga, z.B. das 2‘-fluoro-2‘-deoxy-5-iodo-1-D-arabinofuranosyluracil (FIAU) oder 18F-fluoro-3-hydroxy-methylbutyl-guanin (FHBG) in der Bildgebung mit der PET. Diese Substrate benötigen eine aufwendige Synthese. Das physiologische Substrat des Natrium-Iodid-Symporter ist das Iodid. Im klinischen Alltag ist die Bildgebung der Schilddrüse durch den physiologisch vorhandenen Natrium-Iodid-Symporter praktikabel, kostengünstig und unkompliziert. Sie lässt sich mit einer konventionellen Szintigraphie hinreichend durchführen und es ist möglich das Analogon Technetium zu verwenden, welches besonders günstig und umgänglich zu handhaben ist. Die gewöhnliche Szintigraphie ermöglicht keine genaue Substratquantifizierung, weil die Gammastrahlung durch das Körpergewebe jeweils individuell abgeschwächt wird und daher nicht ohne einen individuellen Schwächungskoeffizienten korrigiert werden kann. Mit der SPECT-CT lässt sich dieser Nachteil gegenüber der PET wieder ausgleichen. Technisch bedingt ist die PET die sensitivere Methode, jedoch ist dies bei ausreichender Signalstärke nicht zwingend erforderlich.

Die Bildgebung der kardialen Genexpression würde von einer Methode profitieren, welche mit den weitverbreiteten Gammakameras und deren einfacheren Radionuklide durchzuführen ist. Neuere Entwicklungen in der SPECT Technik könnten die gleichzeitige Bildgebung mit bis zu drei Radionukliden (78) ermöglichen. So wäre es möglich in einer Untersuchung die Funktion, Perfusion und Transgenaktivität zu erfassen.

Ziel der aktuellen Forschung sind multimodale Bildgebungsstrategien, welche je nach Krankheitsentität und Therapieoption angepasst werden können (65, 83). Für das Technetium gibt es bereits eine breite Palette an Antikörper-Kits, welche sich auch in der zukünftigen multimodalen Bildgebung als nützlich erweisen könnten, nicht zuletzt unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten.

1.6 Die Reportergene

Die Reportergene werden aufgrund ihrer Funktionsweise in 3 Gruppen eingeteilt, wobei alle Reportergene letztendlich zu einer lokalen Reportersubstratanreicherung führen. Es gibt die Gruppe der Transportproteine, welche das Substrat in die Zelle transportieren. Eine weitere Gruppe ist die der Enzyme. Das Reportersubstrat wird intrazellulär biochemisch modifiziert, so dass es z.B. in der Zelle verbleiben muss. In der dritten Gruppe bindet das Substrat an einen spezifischen Zellrezeptor, so dass es sich auf der Zelloberfläche anreichern kann.

1.6.1 Die Transporterproteine

In der bisherigen Forschung haben der Natrium-Iodid-Symporter und der Norepinephrin-Transporter Verwendung gefunden.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir den Natrium-Iodid-Symporter in seiner Funktion als kardiales Reportergen untersuchen:

<u>Der Natrium-Iodid-Symporter</u>

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) wird physiologisch hauptsächlich im Schilddrüsengewebe exprimiert. In den bisherigen Studien (81) konnte auch eine geringere Expression in den Parietalzellen des Magens, den Speicheldrüsenzellen und im laktierendem Brustgewebe nachgewiesen werden. In vitro konnte 2008 Meischl et al erstmals eine sehr geringe Expression in H9C2 Kardiomyoblasten nachweisen (60). Als möglicher Hinweis auf eine geringe intrinsische Schilddrüsenhormonsyntheseleistung. Der in vivo Nachweis bleibt noch abzuwarten.

Der Natrium Iodid Symporter (NIS) ist ein intrinsisches transmembranöses Glykoprotein, welches den aktiven Transport von Iod und Natrium durch die Zellmembran bewerkstelligt.

Es transportiert ein I^- Ion mit zwei Na^+ Ionen in die Zelle (50). Der Natriumgradient liefert die Energie für diesen Transfer, welcher durch die Na^+/K^+-Adenosin-Triphosphatase (27) aufrecht erhalten wird. Der NIS ermöglicht auch den Transport von anderen Anionen, wie Pertechnetat (26, 27) oder dem kompetitivem Inhibitor Perchlorat (ClO_4-). Dohan et al. (25) konnte erstmals nachweisen, dass der Natrium-Iodid-Symporter Perchlorat zusammen mit nur einem und nicht wie bisher angenommen zwei Na+ Ionen in die Zelle transportiert.

In der Schilddrüse, wo der NIS physiologisch am stärksten exprimiert wird, fördert er die Iodakkumulation in die Follikelzellen, welche das 20 bis 40-fache der Plasmakonzentration erreichen kann und für die Produktion der Schilddrüsenhormone essentiell ist (17). Die Fähigkeit der Schilddrüsenzellen Iod zu akkumulieren, ermöglicht die diagnostische Szintigraphie mit ^{123}I, ^{131}I und ^{99m}Tc-Pertechnetat.

Das Natrium Iodid Symportergen des Menschen (hNIS) und der Ratte (rNIS) konnte 1996 erstmals erfolgreich kloniert werden und ermöglichte es erstmalig die Fähigkeit Radioiod zu akkumulieren auf nicht thyroidale Zellen übertragen zu können (23, 84). Bereits 1997 gelang es Shimura et al die Natrium-Iodide-Symporter Funktion in malignen entarteten Schilddrüsenzellen der Ratte wiederherzustellen (82). Er transfizierten die Zellen in-vitro mit einer für NIS kodierenden Plasmid-DNS, retransplantierte diese Zellen und demonstrierte anschließend eine erfolgreiche in-vivo Radioiodtherapie.

Mit geringeren Radioioddosen bzw. anderen Nukliden besteht auch die Möglichkeiten die Genexpression zu visualisieren (22, 75). Viele Forscher berichten über eine erfolgreiche Radioiod- (14, 57, 88) oder ^{99m}Tc-Anreicherung (51, 66) in den unterschiedlichsten Tumorzelllinien, welche vorher mit dem NIS Gen transfiziert wurden. Jedoch wurde bisher wenig über die Bildgebung von NIS transfizierten Kardiomyozyten im Tiermodel berichtet.

1.6.2 Die Gruppe der Enzyme

Ein gut erforschtes und beliebtes Reportergen in der tumorziden Therapieforschung ist die Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase (HSV1-Tk) und die mutierte Variante, die HSV1-s39Tk. Dabei wird der erfolgreiche Wirkmechanismus des Virostatikums Aciclovir auf die transfizierte Zelle übertragen. Das Aciclovir wird durch die HSV1-Tk, jedoch nicht durch die menschliche TK phosphoryliert, wodurch es nur den Zellmetabolismus der transfizierten Zelle hemmt. Gleichzeitig ist eine Bildgebung mit analogen Substraten möglich. Diese bedürfen jedoch einer aufwendigen Synthese.

Weitere gut erforschte Reporterenzyme sind die β-Galaktosidase des E-Coli Bakteriums und die Luciferase. Ersteres ermöglicht nur einen histologischen Nachweis und ist somit für die nicht invasive in-vivo Diagnostik ungeeignet. Die Luciferase modifiziert ihr Substrat, so dass es zu einer Photon-Emission kommt. Für die molekulare Bildgebung von Zellen unter dem Mikroskop oder sogar von Kleintieren ist sie sehr gut geeignet, jedoch aufgrund der eingeschränkten Gewebepenetration bei größeren Lebewesen ungeeignet.

1.6.3 Die Gruppe der Rezeptorproteine

In der Vergangenheit wurden Dopamin D2, Somatostatin Typ 2 und Transferritin-Rezeptoren in ihrer Funktion als Reportergen untersucht (11, 55).

1.7 Die Vektoren

In der vorliegenden Arbeit verwenden wir einen modifizierten Adenovirus als Genvektor[5].

Eine einfachere und kostengünstigere Methode mit der Möglichkeit beliebig große Gene einzuschleusen ist es die DNS als „nacktes Plasmid“ direkt zu injizieren, jedoch eignet sich diese Methode aufgrund der äußerst geringen Transfektionseffizienz und mangelnden spezifischen Gewebeaffinität nur bedingt (63, 79). Die Transduktionsrate lässt sich verbessern, indem die DNS in Liposome, Cholesterol-Lipopolymären, Poloaxime Nanosphären oder Gelatine verpackt wird. Die Permeabilität der Zellmembran lässt sich durch sog. Sono- oder Elektroporation verbessern (49, 91). Bei der Sonoporation verwendet man das Ultraschallgerät und bei der Elektroporation muss ein elektrisches Feld angelegt werden. Jedoch ist die Transduktionsrate weiterhin zu niedrig.

Das Virus ist prädestiniert dafür, sich möglichst effizient in eine Wirtszelle einzuschleusen und seinen Gencode dort exprimieren und vervielfältigen zulassen. Je nach Virusfamilie und -subtyp besteht eine mehr oder weniger spezifische Gewebeaffinität. Das Genmaterial wird von einem Proteinmantel umgeben, das sog. Kapsid, welches mit spezifischen Zelloberflächen-Rezeptoren interagiert, wodurch die Zellbindung und schließlich die Zellintegration vermittelt werden. Die vorwiegenden Nachteile der viralen Vektoren sind erstens die erheblichen Kosten in der Produktion (aufwendige Laborarbeiten), zweitens die deutliche Immunabwehr des Wirts mit Inflammation und Abtötung der transfizierten Zellen und drittens die Gefahr der Inserationsmutagenese. In der Erforschung der kardialen

[5] „Genfähre“ bzw. Methoden durch welche das Gen in die Wirtszelle eingeschleust wird.

Gentherapie kommen gewöhnlich drei Virusklassen zum Einsatz. Die Klasse der Retro/Lentiviren, der Adenoviren und der adeno-assoziierten Viren. Die Retro-/Lentiviren integrieren ihren Gencode ins Wirtsgenom. Der Code liegt in RNS Form vor und wird daher mit Hilfe der viralen Ribonuklid-Reduktase revers in die dsDNS Form transkribiert und kann dann durch die virale Integrase ins Wirtsgenom integriert werden. Die Wirtszelle muss sich hierfür in der Mitose befinden mit Ausnahme beim Lentivirus(76). Nach einem akuten Myokardinfarkt würden durch Retroviren vorwiegend Myofibroblasten transfiziert(16) werden. Das Risiko der Insertionsmutation ist hoch und eine Mutation der Lentivektoren ist schwer beherrschbar. Der Gencode verbleibt bei den Adenoviren und adeno-assoziierten Viren episomal und wird solange abgelesen bis die Wirtszelle vom Immunsystem abgetötet wird.

Die Adenovektoren wurden bereits in über 200 klinischen Studien verwendet und können bis zu 30 kb an Fremdgenen aufnehmen (ein Standard Gen mit Promoter besitzt ca. 3kb). Nachteil ist die sehr große konstitutionelle und erworbene Immunität, welche zum raschen Zelluntergang mit Enzündungsreaktion führt, hier zu einer adenoviralen Myokarditis. Die Wildviren besitzen einen Tropismus für den Respirationstrakt, den Gastrointestinaltrakt, die Leber, Nerven- und quergestreiftes Muskelgewebe. Die Molekulare Größe ist mit ca. 0,1-0,2 μm im Durchmesser relativ groß und behindert die endotheliale Transsudation, z.B. bei kathetervermittelter Koronarperfusion.

Der adeno-assozierten Vektor (Serotyp 9) besitzt den am höchsten bekannten Tropismus für das Herz. Jedoch ist das Virus selber nur 4,7 kb groß und kann dem entsprechend nur kleinere Gene aufnehmen. Auch sind die resultierenden Genexpressionsraten eher klein(21). Bei Applikation unterhalb einer Dosisschwelle und Antikörper-negativem Wirt (demographische Durchseuchung ca. 20-40%) kann das Transgen über Jahre persistieren. Es scheint, dass sich das Virus dem endothelialen Transzytose Mechanismus bedient, wodurch es sich daher sehr gut für die interkoronare Applikation eignet(24).

1.8 Der Promoter

Die Genexpression des Transgenes wird durch den sogenannten Promoter gesteuert. Virale Promoter besitzen eine hohe Expressionsrate, jedoch geringe Gewebespezifität. Gewebespezifische Promoter, z.B. α-Myosin Heavy Chain, Myosin Light Chain, kardiales Troponin T und cerebrales natriuretisches Peptid Promoter verhindert eine Expression in transfizierten extrakardialen Zellen, jedoch liegt die Genexpressionrate weit unterhalb der viraler Promoter (29, 30, 33).

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Gebrauch des hNIS als Reportergen für die Bildgebung kardialer Fremdgenexpression am lebenden Tiermodell zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Die Vektoren

2.1.1 Der Natrium-Iodid-Symporter-Vektor

Es handelte sich hier um einen replikationsdefizientes, rekombinantes humanes Typ 5 Adenovirus (AdH5). Ein Teil der E1 Region wurde durch das humane Natrium-Iodid-Symporter Gen (hNIS) in Verbindung mit dem Zytomegalievirus (CMV) Promoter ersetzt. Das für den humanen Natrium – Iodid – Symporter kodierende Gen hNIS wurde als cDNA3 mittels HindIII und NotI aus dem pcDNA3 Plasmid herausgeschnitten und in das Transportplasmid pAD5CMVK-NpA hinein geklont (86).
Der Vektor wurde gemeinsam von der Mayo Klinik in Rochester, USA, und von der Gen Transfer Vektor Kern Einrichtung der Universität Iowa in Iowa City, USA, hergestellt (86) und an die II. Medizinischen Klinik der Ludwig Maximilians Universität in München weitergegeben. Und diese stellte dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München den Vektor zur Verfügung.

Kurz: Ad5-CMV-hNIS

2.1.2 Der Kontrollvektor

Es wurde ein replikationsdefizientes, rekombinantes humanes Adenovirus verwendet, welches anstelle des E1 Gen das LacZ-Gen unter der transkriptionalen Kontrolle des Zytomegalievirus (CMV) Promotors in seinem Genom trug (12).

Kurz: Ad-CMV-LacZ

2.1.3 Die Vektorpräparation

Die Vermehrung der Viren in Zellen der 293-Zelllinie, sowie Reinigung und Konzentration erfolgte in dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der

Technischen Universität München des Klinikums rechts der Isar. Diese Schritte wurden nach dem Protokoll von HITT et al. (43) durchgeführt.

Es wurden während der gesamten Versuchsreihen Doppel Cäsium Chlorid-gereinigte Vektoren benutzt. Die Vektortiter wurden mit einer Plaque Probe auf 293 Zellen ermittelt. Das adenovirale Vektorgut wurde mittels PCR (forwärts primer 5'-GCC-AGGCCGCCAGTCTTTTG-3' rückwärts primer 5'-GCC-ATGCAAGTTAAACATTATC-3') auf replikationskompetente Adenoviren geprüft und bei $1x10^9$ Plaque bildenden Einheiten (plaque forming unit – pfu) als negativ bestätigt.

Das Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München lieferte uns die Virussuspension in den benötigten Dosen.

2.2 Die Tiere und ihre Haltung

2.2.1 Der Tierversuchsantrag

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 Absatz 1 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 17.02.1993, zuletzt geändert durch Artikel 86 des Gesetzes vom 27.04.1993, durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.2 Die Tiere

Es wurden ausschießlich männliche Wistar Ratten der Firma Charles-River Deutschland GmbH, Sulzfeld, verwendet. Die Tiere wurden eine Woche vor dem geplanten Eingriff geliefert, um sich vom Stress der Lieferung erholen zu können. Zum Zeitpunkt des Gentransfers wogen die Versuchstiere zwischen 220g und 250g.

2.2.3 Die Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung gehalten.

Es handelte sich um eine konventionelle Tierhaltung bei einer Raumtemperatur von 20-23 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70% und bei einem Beleuchtungswechsel von je 12 Stunden hell (maximal 500 Lux) und dunkel.

Futter (Alleinfutter-Pellets für Ratten und Mäuse, Altromin, Lage/Lippe) und Wasser standen den Tieren prä- und postoperativ aus einer Nippeltränke an allen Tagen zur freien Verfügung.

Die Versuchsgruppen bestanden jeweils aus drei Versuchstieren, und wurden prä- und postoperativ in ein und demselben Käfig vom Typ Makrolon 4 untergebracht. Als Einstreu in den Käfigen diente entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Altromin, Lage/Lippe).

2.3 Der Versuchsplan

2.3.1 Übersicht

Bei den Experimenten handelte es sich um eine orientierende Studie. Bei vorangegangenen Experimenten wurde ein Thymidinkinase-Gen (HSV1-TK[6]) tragender Vektor eingesetzt. Dieser machte eine aufwendige Tracerkonstruktion und eine Bildgebung mit dem PET Scanner nötig. In den folgenden Experimenten wurde ein Natrium-Iodid-Symporter-Gen tragender Vektor appliziert, welcher es ermöglichte mit konventioneller planarer Szintigraphie und einfachen Radionukliden eine Bildgebung zu generieren. Aus den vorangegangenen Exprimenten konnte geschlossen werden, dass die Genexpression ca. 1 Tag nach Gentranfektion am stärksten war. In kleinen Gruppen (n=3) sollte durch eine stufenweise Reduktion die für die Bildgebung minimal benötigte Vektorkonzentration gefunden werden. Ein Kinetikprofil sollte für beide Tracer, ^{99m}Technetium und ^{123}Iod, erstellt und verglichen werden. Außerdem sollte der Zeitverlauf der Genexpression, sowie die Inhibition des Genproduktes untersucht werden.

Zeitlicher Ablauf bei allen Tieren:

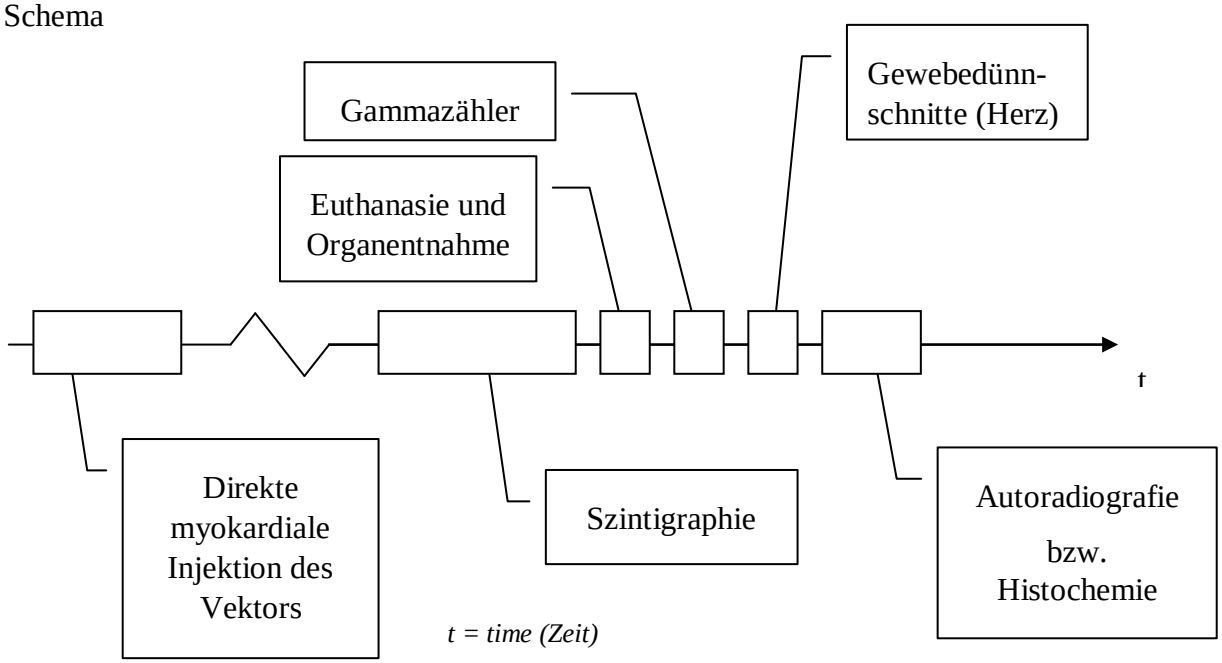
(1) Gentransfer durch ultraschallgesteuerte perkutane intramyokardiale (93) Injektion von 200 µl Vektorsuspension.
(2) Intravenöse Injektion des Radiotracers ^{123}Iod oder ^{99m}Technetium und Start der planaren Szintigraphie.
(3) Opferung der Tiere und anschließende Organentnahme.

---

[6] HSV1-TK = Thymidin Kinase des Herpes Simplex Virus Typ 1

(4) Gammacounter-Messung der Organe und Anfertigung von Gewebedünnschnitte der Herzen zur weiteren Untersuchung via Autoradiographie oder histochemischen Gewebefärbung.

Schema



Insgesamt wurden 42 Ratten in drei Studien untersucht:

2.3.2 Die Titrations- und Kinetikstudie (Studie I und II)

Ziel:

Feststellung der mindestens benötigten Vektordosis zur Detektion des Bildsignals in der Szintigraphie.

Bestimmung des optimalen Zeitpunktes nach Nuklidinjektion zur Bildgewinnung mit Radioiod oder –technetium.

Es wurde mit einer Vektorkonzentration von 2,5 x 10^9 pfu[7] bei einem Injektionsvolumen von 200 µl begonnen. In der jeweils nächsten Versuchsgruppe sollten die Vektorkonzentrationen

[7] Pfu = Plaque formende Einheit (durch das Adenovirus entstandene „Löcher“ im Kulturzellrasen)

ein Fünftel des vorangegangenen Versuchs betragen. Die Szintigraphieaufnahmen wurden am folgenden Tag (30h nach intramyokardialer Vektorinjektion) durchgeführt. Konnte keine spezifische kardiale Tracerakkumulation mehr festgestellt werden galt die Titrationsstudie als beendet.

Folgende Gruppen wurden untersucht:

Bildgebung mit ^{99m}Technetium:

- 15 Tiere mit unterschiedlichen Mengen AdH5-CMV-hNIS (je 3 mit 4,0 x 10^6, 2,0 x 10^7, 1,0 x 10^8, 5,0 x 10^8 und 2,5 x 10^9 pfu)
- 3 Kontrolltiere mit hNIS-negativem Adenovirus (AdH5-CMV-LacZ, 2,5 x 10^9 pfu)

Bildgebung mit ^{123}Iod:

- 12 Tiere mit unterschiedlichen Mengen AdH5-CMV-hNIS (je 3 mit 2,0 x 10^7, 1,0 x 10^8, 5,0 x 10^8 und 2,5 x 10^9 pfu)
- 3 Kontrolltiere mit hNIS-negativem Adenovirus (AdH5-CMV-LacZ, 2,5 x 10^9 pfu)

2.3.3 Der Zeitverlauf der hNIS Genexpression (Studie III)

Ziel: Es sollte der Verlauf der szintigraphisch detektierbaren Natrium – Iodid – Symporter Genexpression untersucht werden.

Szintigraphiert wurde mit ^{99m}Technetium. Die Bildgebung war für den Tag 0, 3, 5, 8, 12 und 14 nach erfolgter myokardialer Injektion vorgesehen. Bei negativer Bildgebung galt die Studie als beendet.

n=3, Vektor: AdH5-CMV-hNIS mit einer Vektordosis von 2,5 x 10^9 pfu in einem Volumen von 200 µl.

2.3.4 Die Inhibitionsstudie mit Natriumperchlorate (Studie IV)

Ziel: Demonstration der Möglichkeit das hNIS-Genprodukt spezifisch inhibieren zu können.

Den Tieren wurde 24, 8 und 4 Stunden vor der Bildgebung 0,1 ml Natriumperchlorate $NaClO_4$ (Irenat® Tropfen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) oral verabreicht. Szintigraphiert wurde mit ^{99m}Technetium und ^{123}Iod.

n=3, Vektor: AdH5-CMV-hNIS mit einer Vektordosis von 2,5 x 10^9 pfu in einem Volumen von 200 µl.

2.4 Die Anästhesie

Die Narkotisierung

Die Versuchstiere erhielten eine Injektionsnarkose, welche aus einer Dreierkombination (MMF) von Midazolam (Midazolam-ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Ulm) in einer Dosierung von 2 mg/kg/KGW[8], Medetomidin (Domitor®, Pfitzer GmbH, Karlsruhe) in einer Dosierung von 150 µg/kg/KGW und Fentanyl (Fentanyl25®, CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe) in einer Dosierung von 5 µg/kg/KGW bestand. Die Narkose erfolgte unter Spontanatmung und das Anästhetikum wurde in einen der Hinterläufe intramuskulär injiziert (M. biceps femoris, M. semitendinosus und –membranosus).

Für den Eingriff der direkten myokardialen Injektion war eine Bolusinjektion MMF ausreichend. Jedoch für den Zeitraum der Bildgebung musste nachgespritzt werden. Der Parameter zur Bestimmung der Narkose- und Analgesietiefe stellte die motorische Antwort auf einen Schmerzreiz dar. Der Schmerzreiz wurde durch Zwicken mit Daumen und Zeigefinger in einen der Hinterläufe ausgelöst. Etwa stündlich wurde mit 50-60% der Initialdosis nachgespritzt.

Die Antagonisierung nach intramyokardialer Vektorinjektion

Die Injektionsnarkose konnte durch eine Dreierkombination (FAN) antagonisiert werden, welche intraperitoneal injiziert wurde.

Diese bestand aus Flumazenil (Anexate®, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel) in einer Dosierung von 200 µg/kg KGW, Atipamezol (Antisedan®, Pfitzer GmbH, Karlsruhe) in einer Dosierung von 750 µg/kg KGW und Naloxon (Naloxon®, Deltaselect GmbH, Pfullingen) in einer Dosierung von 120 µg/kg KGW.

---

[8] KGW = Körpergewicht

2.5 Der myokardiale Gentransfer

Das Transgen wurde durch einen Vektor in die Zelle geschleust. Unter Narkose wurde der Vektor direkt in die inferiore Myokardwand der Ratte injiziert. Mit Hilfe des Ultraschallgerätes konnte die Nadelspitze genau platziert werden.

2.5.1 Das Ultraschallgerät

Zum Einsatz kamm das Ultraschallgerät Sonos 1000 der Firma Hewlett Packard mit zusätzlichem Printer, Videorekorder und MOD[9] Laufwerk. Mit Hilfe des Printers als auch MOD Laufwerk ließ sich das Injektionsergebnis gut festhalten. Bei den anatomischen Verhältnissen der Ratte konnten wir einen kleinen Schallkopf mit 7,5 Mhz (21275A, 7,5/5,5 Mhz, Hewlett Packard, München) gut benutzen. Dies ergab eine Darstellungstiefe von 4 cm bei einem Sektorwinkel von 90° (69). Die Bildgebung fand im B-Mode (zweidimensionale Darstellung) statt.

2.5.2 Die Vorbereitung der Tiere

Die Ratten der jeweiligen Versuchsgruppe wurden gewogen und am Schwanz mit einem Filsstift markiert. Die Vektorinjektion wurde an den Ratten nacheinander vorgenommen. Das erste Versuchstier wurde narkotisiert. Es folgte eine Rasur im Bereich der ventralen Thoraxwand und des Oberbauchs.

[9] MOD = magnetic optical drive (portables Datenträgerformat, ähnlich einer CD-ROM)

Die Ratte wurde in Rückenlage an allen vier Läufen mit Leukoplast® fixiert und über eine Maske mit Sauerstoff 2 $^{l}/_{min.}$ (Air Liquid GmbH, Düsseldorf) versorgt. Das Ultraschallkontaktgel (TMP Türhaus Medical Production GmbH, Velen-Ramsdorf) wurde auf die Thoraxwand aufgetragen und der Ultraschallkopf darüber platziert.

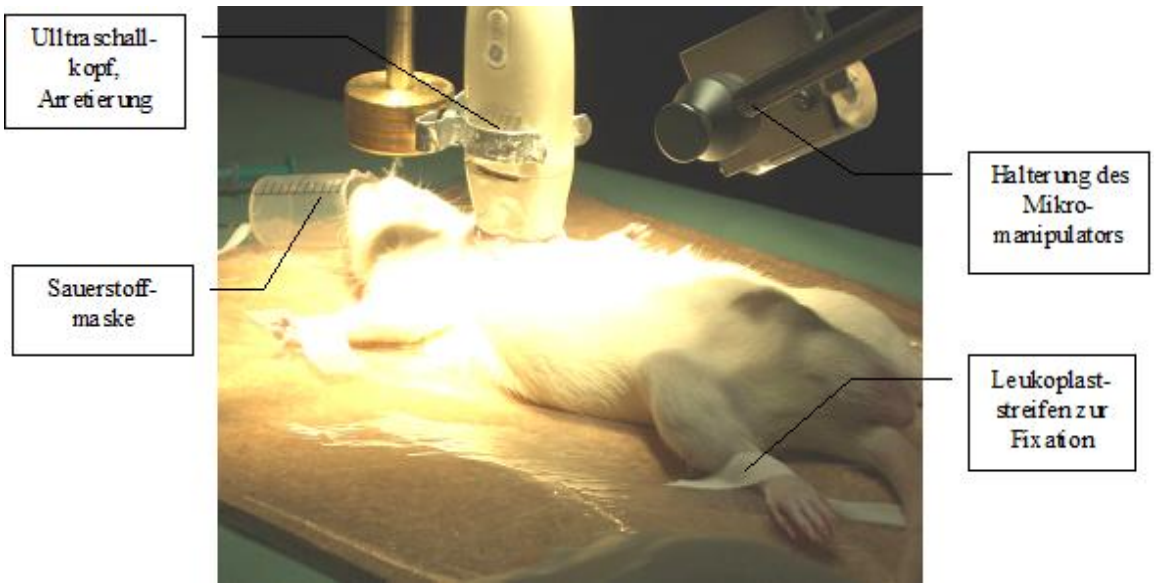


Abbildung 2-1 Versuchsaufbau für die direkte myokardiale Injektion unter sonographischer Kontrolle.

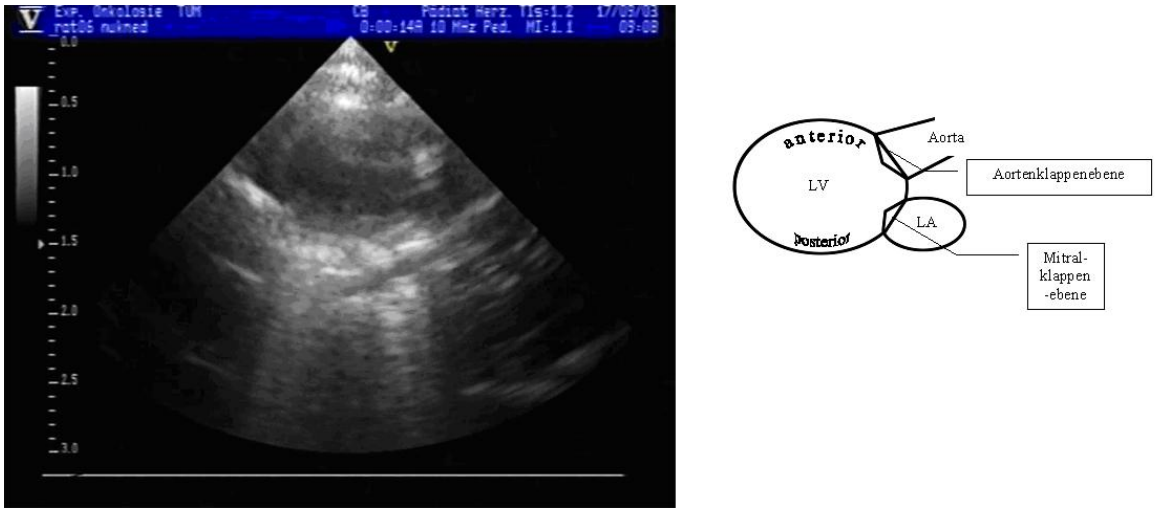


Abbildung 2-2 B-Mode[10] Ultraschallbild eines Rattenherzens (LV = linke Kammer und LA = linker Vorhof).

[10] B-Mode = Brightness Mode (2D Darstellung)

2.5.3 Die direkte myokardiale Injektion

Die Spritze (Injekt-F® Solo 1ml, Luer-Ansatz, B|Braun Melsungen AG, Melsungen), in welcher die Virussuspension aufgezogen war, wurde mit einer Kanüle (Sterican® Standardkanüle G 26, B|Braun Melsungen AG, Melsungen) versehen. Mit Hilfe des Mikromanipulators (Nr. 823710, Leitz, Wetzler) konnte die Kanüle parasternal, leicht linksseitig, kaudal der Cartilago Xiphoidea in einem Winkel von ca. 25-35° durch die Haut gestochen und weiter vorgeschoben werden. Im Ultraschall war die Kanülenspitze an der Herzspitze zu sehen und konnte weiter in die inferiore Wand des linken Ventrikels vorgeschoben werden. Die Virussuspension wurde injiziert und gleichzeitig wurde die Kanülenspitze zurückgezogen. Eine Kontrastverstärkung an der Injektionsstelle im Ultraschallbild gab einen Hinweis auf eine besonders erfolgreiche Injektion (93). Die Antagonistenkombination wurde gespritzt und die Ratte konnte von ihrer Fixierung befreit werden. Bis zum Aufwachen aus der Narkose wurde die Ratte mit einer Wärmelampe normotherm auf 38 °C gehalten und beobachtet.

2.6 Die Nuklide

2.6.1 ^{123}Iod

^{123}Iod besitzt eine Halbwertzeit von 13,2 Stunden. Die Gammalinie liegt bei 159 keV, und die Halbwertsschichtdicke HWS beträgt in H_2O 4,6 cm. Es zerfällt mit einem Elektroneneinfang (EC[11]), d.h. der Kern fängt ein Elektron von der K-Schale der Elektronenhülle ein und sendet ein Photon aus.

2.6.2 ^{99m}Technetium

^{99m}Technetium ist ein biochemisch irrelevantes Element und besitzt eine Halbwertzeit von 6 Stunden. Die Gammalinie liegt bei 141 keV, und die Halbwertsschichtdicke HWS beträgt in H_2O 4,5 cm.

---

[11] EC = Elektroneneinfang (Electron capture)

2.7 Die Präparation der Spritzen und Vorbereitung der Tiere

Die Spritzen wurden für die jeweilige Versuchsreihe aus demselben Nukliddepot aufgezogen. Es wurde eine Spritze pro Tier und zusätzlich eine für den Standard[12] der Biodistribution mit einem Volumen von 0,25 ml aufgezogen. Für ^{123}Iod verwendete man eine Radioaktivität von 20 MBq pro Ratte, dagegen ca. 40 MBq für ^{99m}Technetium.

Die Versuchstiere wurden gewogen, narkotisiert und bekamen einen Venenverweilkatheter (Introcan® 24 G $^{3}/_{4}$", B|Braun Melsungen AG, Melsungen) in eine der vier Schwanzvenen gelegt. Um seine ordnungsgemäße Lage überprüfen zu können, wurde der Katheter mit 0,1 ml isotonischer Kochsalzlösung (Deltaselect GmbH, Pfullingen) gespült. In der Zeit bis zur Bildgebung wurden die Ratten unter einer Wärmelampe normotherm auf ca. 38 °C gehalten.

2.8 Die konventionelle planare Szintigraphie

2.8.1 Die Gammakamera

Für die Bildgebung wurde eine Gammakamera (Skylight, ADAC/Philips, Hamburg) mit zwei Detektoren verwendet, welche mit sogenannten LEHR[13] Kollimatoren ausgerüstet waren. Aus hygienischen Gründen und als Kontaminationsschutz, wurde der untere Kollimator mit einer ca. 1 mm dünnen undurchlässigen und saugfähigen Unterlage abgedeckt. Es wurden bis zu 6 Ratten auf dem Kollimator in Bauchlage platziert. Der obere Kollimator wurde bis auf eine Entfernung von 5 mm an den Rattenrücken herangefahren. Es resultiert eine ventrodorsale Bildgebung mit einer intrinsischen Auflösung von 3,2 mm Halbwertbreite laut Herstellerangabe.

2.8.2 Die serielle Bildgebung

Den Ratten wurde das Radionuklid gespritzt. Die Venenkatheter wurden mit 0,1 ml isotoner Kochsalzlösung (Deltaselect GmbH, Pfullingen) gespült und sofort gezogen. Es wurde unverzüglich mit der Bildgebung begonnen. Insgesamt wurden jeweils 12 Serienaufnahmen aus der ventralen und 12 Serienaufnahmen aus der dorsalen Ansicht bei einer Belichtungszeit von 10 Minuten erfasst. Für die Auflösung wurde eine 512x512 Matrix benutzt. Bei einem

---

[12] Der Standard dient als Referenz bei den Berechnungen für die Organbiodistribution

[13] LEHR Low Energy High Resolution „Niedrige Energie Hohe Auflösung“

Zoomfaktor von 1,0 ergab dies eine Pixelgröße von 1,24mm. Das Photonenfenster wurde bei einer Größe von 15% über das Energiemaximum von ^{99m}Technetium (140 keV) bzw. ^{123}Iod (159 keV) eingestellt.

2.8.3 Die verwendete ROI Methodik

ROI ist eine Abkürzung für „interessante Region“ (Region of Interest). In diesen markierten Regionen konnten die Aktivitäten in Counts[14] für jede Aufnahme erfasst werden. Die ROI der Herzregion wurde entlang der vermuteten Herzkonturen gezeichnet und auf eine Größe von 200 Pixel vergrößert. Dies entsprach ungefähr 115-130% der tatsächlichen Herzgröße. Die Radioaktivität der Schilddrüse wurde mit einer ROI von 130 Pixel Größe erfasst. Die ROI Größen für den Magen wurden bei jedem Versuchstier individuell angepasst, wobei darauf zu achten war, dass sich die Magenkonturen innerhalb dieser ROIs für die gesamte Bildgebung befanden. Die Körper ROI wurde um die Körpersilhouette gelegt, jedoch wurde der Rattenschwanz nur proximal miterfasst.

2.8.4 Die Datenerfassung

Mit der Jetstream® SKYlight Version 3.0 Software (Philips Medizin Systeme GmbH Deutschland, Hamburg) wurden die Rohdaten erfasst. Anschließend wurden mit Hilfe der PegasysX Software (ADAC Laboratories, Inc., Hamburg) die ROI Werte akquiriert: Aktivitäten [counts] in den ROIs, Größe der jeweiligen ROI [Pixel], Datum der Aufnahme, Start der Frameaufnahme, Dateiname, Frame Name und den Namen des abgespeicherten ROI Sets[15]. Die Daten wurden mit den Versuchsdaten jeder Ratte vervollständigt und in die eigens für diesen Zweck programmierte Filemaker Pro Datenbank (siehe Abbildung 2-3) eingegeben. Alle Daten wurden übersichtlich dargestellt und konnten so überprüft werden. Die Ergebnisse wurden direkt in Prozent injizierter Dosis[16] (%ID) ausgegeben. Nach Eingabe aller Daten konnten die Daten inklusive der Ergebnisse den Bedürfnissen entsprechend exportiert werden und in z.B. Excel oder einem Statistikprogramm weiter verwendet werden.

---

[14] Counts Nuklidzerfall pro Zeiteinheit.

[15] ROI Set = gespeicherte Satz gezeichneter ROIs (Region of Interest Set)

[16] %ID = Prozentualer Anteil der Radioaktivität an der injizierten Dosis pro Tier

Seriennr. 3 Erstellungsdatum 26.12.2003

Gamma Kamera

Aufnahmedatum	04.09.2003
Gamma Kamera	Skylight
Dateiname	4 Ratten

Versuchsdaten

Nr. Ratte	3
Virus	◉ Ad-hNIS ○ Ad-LacZ
Dosis (pfu)	2,50E+09
Radionuklid	○ Tc-99m ◉ I-123
Injektionszeitpunkt	14:58

Skalakalibrierung auf die Body ROI

	Bild ventral	verwendet
Eingabe Prozent	0,1400	
= Skala Wert	925,21	

Frame Nr. ventral	2	
Frame Nr. dorsal	1	
Frame Start	15:03:55	
Frame Dauer (min.)	10	

ROI Verwaltung

ROI Set ventral	ROI V3 26.12.	
ROI Set dorsal		
Pixel Thyroid	128	
Pixel Heart	203	
Pixel Stomach	410	
Pixel Body	8468	

Notizen

- Herz ROI: Die Pixel Größe aller Herz ROI's muß ziemlich genau die selbe sein, z.B. 200.
- Herz ROI: ROI genau auf Randstrucktur zeichnen, später auf Standard Größe mit der RESIZE Funktion bringen.
- Frameskala auf Frame Maximum Wert einstellen, dann ROI's zeichnen (mit kleinen Rand; ca. 1mm).
- Blue_Red_Yellow Farbskala benutzen! ... oder Grey_Invert.
- Body ROI: Schwanz hinter Testis abschneiden.
- Thyroid ROI: auf ca. 130
- Stomach ROI: ... auf genügende Größe achten, sonst 'wachst' der Magen über das ROI hinaus....
- die ROIs bei Frame #3 zeichnen
- "Rand der Magen ROIs" gleich halten...

neuer Datensatz | alle Datensätze anzeigen | Sortierung aufheben | letzter Datensatz | Datensätze exportieren

Radioaktivität in der ROI [Counts]

Total Counts	ventral	dorsal	Geometr. Mittel	% ID (ROI RATIO)
Thyroid	11302	10780	11037,91	1,86
Heart	35335	34327	34827,35	5,86
Stomach	61722	58999	60345,14	10,15
Body	660866	534933	594574,66	

Anmerkungen

Total Counts / Pixel

	ventral	dorsal
Thyroid	88,2969	84,2188
Heart	174,0640	169,0985
Stomach	150,5415	143,9000
Body	78,0427	63,1711

Abbildung 2-3 Dateneingabe über die Arbeitsmaske der Datenbank.

2.8.5 Die Rechenformel der Szintigraphie

Die Organ Tracerakkumulation (%ID) wurde von der Datenbank nach folgender Formel berechnet:

Formel 1 zur Berechnung der Tracerakkumulation im Organ.

$$\%ID = \sqrt{\left(\frac{A_O}{A_K}\right)_{ant} \times \left(\frac{A_O}{A_K}\right)_{post}} \times 100$$

%ID = Prozentualer Anteil an der injizierten Dosis [%]

A_O = Aktivität der Organ ROI [counts]

A_K = Aktivität der Körper ROI [counts]

ant = anteriorer Frame

post = posteriorer Frame

Aus den Werten für den anterioren und posterioren Frame wurde der geometrische Mittelwert gebildet. Das Verhältnis der Counts innerhalb der Organ ROI zu der Körper ROI wurde als der prozentuale Anteil an der injizierten Dosis (%ID) definiert.

2.8.6 Die optische Ergebnisdarstellung der Szintigraphie

Die Aufnahmen sollten für die verschiedenen Viruskonzentrationen (hNIS) optimal vergleichbar sein, d.h. zum selben Zeitpunkt nach Tracerapplikation für den jeweiligen Tracer. Es wurde entschieden die Skalawerte auf die Gesamtaktivität in der Körper ROI zu beziehen.

Formel 2 zur Kalibrierung der Skalawerte auf die Gesamtaktivität.

$$I_{SK} = A_K \times PR_{SK},$$

mit PR_{SK} = konstant

I_{SK} = max. Aktivitätsintensität (Skalamaximalwert) [max. counts/pixel]

A_K = Gesamtaktivität in der Körper ROI [counts]

PR_{SK} = Prozentuales Verhältnis des Skalawertes zu der Gesamtaktivität der Körper ROI [%]

Mit dem Werkzeug „Skalakalibrierung auf die Body ROI“ ließ sich dies komfortabel durchführen. Die benutzten Werte konnten gespeichert und später wieder abrufen werden.

2.9 Die Biodistribution

2.9.1 Die Organentnahme

Nach der Szintigraphie standen die narkotisierten Versuchstiere mittels Kohlendioxid Inhalation (1013 CO_2, Klasse 2, Air Liquid GmbH, Düsseldorf) geopfert. Es folgte die Eröffnung des Thorax und Abdomens mit einer gebogenen stumpfen Schere (Artikel Nr. BC772R, Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen). Das Rattenherzens wurde mit einem Skalpell (Einmalskalpell, steril, Fig. 18, Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen) an der Herzbasis abgesetzt. Folgende Organe wurden entnommen, mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (Deltaselect GmbH, Pfullingen) gespült und mit einer digitalen Waage (Sartorius La 2309, Sartorius AG, Göttingen) gewogen: Teil der Lunge, Leber und des M. quadrizeps femoris, sowie in toto das Herz, der Magen, die Milz und die linke Niere. Die Organteile wurden nach Größe und Lokalisation standardisiert entnommen.

2.9.2 Der Bezugsstandard

Es wurde die gleiche Nuklidtierdosis in einen Erlenmeyer-Kolben entleert. Mit destilliertem Wasser wurde der Erlenmeyerkolben auf genau 100 ml aufgefüllt. Mit der Pipette wurde genau 1 ml aus demselben Kolben in ein Plastikröhrchen (No./REF 55.475, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht) appliziert. Es befand sich jetzt genau 1% der injizierten Dosis in der Röhre.

2.9.3 Der Gamma Zähler

Die entnommenen Organe bzw. Organteile wurden in Plastikröhrchen (No./REF 55.475, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht) verschlossen und deren Aktivität [cpm] wurde in dem Gamma Counter (Wallac 1480 Wizard®, Perkin Elmer™, Zaventem, Belgien) gemessen. Zur weiteren Verarbeitung der Ergebnisse wurden diese ausgedruckt und auf einer Diskette gespeichert. Die Daten wurden mit Hilfe der Tabellenkalkulation MS Excel und der Filemaker Pro Datenbank weiterarbeitet.

2.9.4 Die Rechenformel der Biodistribution

Die Ergebnisse wurden als %ID/g (Prozent injizierte Dosis pro Gramm) berechnet. Der Gamma Zähler lieferte für jede Organprobe die Aktivität [cpm]. Mit folgender Formel wurden die Ergebnisse berechnet:

Formel 3 zur Berechnung der %ID/g Organ.

$$\%ID/g = \frac{\left(\frac{A_O}{A_S} \times PR_S\right)}{G_O}$$

%ID/g	= Prozentualer Anteil an der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe	[%]
A_O	= Aktivität der Organprobe	[cpm]
A_S	= Aktivität der Standardprobe	[cpm]
G_O	= Organgewicht	[g]
PR_S	= Prozentualer Anteil der Standardprobe an der ID	[%]

Damit mit den verschiedenen Aktivitäten [cpm] gerechnet werden konnte, mussten sie sich auf denselben Zeitpunkt beziehen. Dies ermöglichte folgende Formel:

Formel 4 zur Korrektur des Aktivitätszerfalls nach Zeit.

$$A(t) = A_0 \times 0{,}5^n\,, \quad \Rightarrow n = \left(\frac{T_1 - T_0}{T_{1/2}}\right)$$

n	= Anzahl Halbwertzeiten des verwendeten Nuklids	
A(t)	= Aktivität zum Zeitpunkt t	[cpm]
A_0	= Ausgangsaktivität	[cpm]
T_0	= Erster Zeitpunkt	[min]
T_1	= Zweiter Zeitpunkt	[min]
$T_{1/2}$	= Halbwertzeit des Nuklids	[min]

2.10 Die Histologie

2.10.1 Die Gewebedünnschnitte mit dem Mikrotom

Die Herzen wurden mit einem Skalpell (Einmalskalpell, steril, Fig. 18, Aesculap AG & CO. KG, Tuttlingen) auf Höhe der Klappenebene durchtrennt, so dass ein Konus entstand.

Der Gewebeträger des Gewebeschneidegerätes Mikrotom-Kyrostat HM 500 OM (MICROM Laborgeräte GmbH, Walldorf) wurde mit einer ca. 1 mm dicken Schicht Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwonde, Niederlande) bedeckt. Die Herzkammern wurden vollständig mit Tissue-Tek gefüllt. Das Herz wurde mit der Basis mittig auf den Gewebeträger platziert und mit einer Schicht Tissue-Tek ummantelt. Es wurden 40µm dicke transversale (Kurzachse) Schnitte des Herzen angefertigt und auf Objektträgern getrocknet. Die Schnitte der LacZ transfizierten Herzen wurden in 20 µm Dicke auf Objektträgern fixiert und bei –10 °C in einem Gefrierschrank für die spätere Histochemie aufbewahrt.

2.10.2 Der Natrium-Iodid-Symporter Nachweis in der Autoradiographie

Die Objektträger der hNIS Herzschnitte wurden für die Belichtung auf die Phosphorplatte des Phosphorimager 445 SI (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) für ca. 20 Stunden platziert und anschließend wurde diese ausgelesen. Die Aktivitätsakkumulation im Bereich der Injektionsstelle berechnete sich durch das Verhältnis der maximalen Aktivität pro Pixel zu einer entfernt gelegenen Stelle desselben Gewebeschnittes. Mit der Software ImageQuant (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA) wurden die hierfür nötigen ROIs eingezeichnet und ausgelesen.

2.10.3 Der histologische β-Galaktosidase Nachweis

Das LacZ-Gen kodierte für das β-Galaktosidase Enzym, welches mit Hilfe der Verbindung 5-Chlor-4-brom-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid (X-Gal-Lösung, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nachgewiesen werden konnte. Dies ist eine farblose Substanz, bei der durch die β-Gal vermittelte Abspaltung eines Galaktosemoleküls eine chromophore Gruppe freigesetzt wird, welche durch Verbindung mit Sauerstoff eine Blaufärbung hervorruft. Hierdurch ist ein einfacher Nachweis der β-Galaktosidase-Expression möglich (31, 48, 72).

2.11 Die statistische Auswertung der Ergebnisse

Aus den Ergebnissen werden zuerst die Mittelwerte und deren Standardabweichungen bzw. Standardfehler berechnet. Die Kontrollgruppen, die Titrationsgruppen und die Versuchsgruppen mit und ohne vorherige orale Perchloratgabe wurden mit Hilfe der univarianten Varianzanalyse (ANOVA) / Post-Hoc Test geprüft.

Mit Hilfe der ROC (Receiver operated characteristics) Methode (46) wurde der Grenzwert der in der Szintigraphie visuell detektierbaren spezifischen Nuklidakkumulation festgelegt. Die Organakkumulationswerte in der Szintigraphie wurden nach Spearman Rank mit den Gammazähler Ergebnissen korreliert. P-Werte von <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Ergebnisse lieferte das Statistikprogramm SPSS© V12.0 (SPSS GmbH, München).

3 Ergebnisse

3.1 Die dynamische Szintigraphie (Studie I)

3.1.1 Das Herz

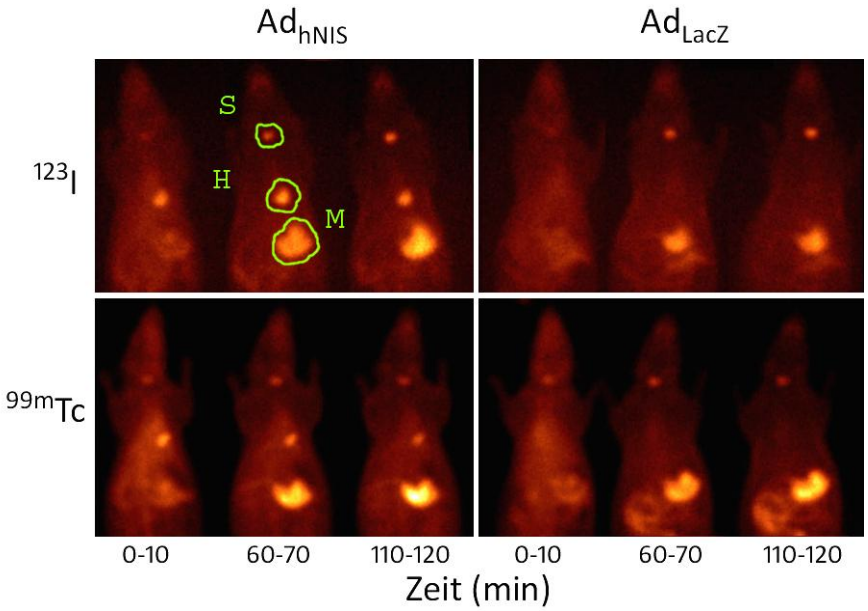


Abbildung 3-1 Ganzkörper Aufnahmen repräsentativer Ratten 0-10, 60-70, und 110-120 Minuten nach i.v. Injektion von ^{123}I (oben) oder ^{99m}Technetium (unten). Den Tieren wurde 30h vor Aufnahme entweder der Ad_{hNIS} (links) oder der Ad_{LacZ} (rechts) Vektor mit dem höchsten Titer von 2,5 x 10^9 pfu intramyokardial appliziert. Die Bilder zeigen die Aktivitätsverteilung von ^{123}I oder ^{99m}Tc. S: Schilddrüse, H: Herz, M: Magen.

Abbildung 3-1 stellt die Ganzkörperaktivitätsverteilung repräsentativer Ratten 0-10, 60-70, und 110-120 Minuten nach i.v. Injektion von ^{123}I (oben) oder ^{99m}Tc (unten) dar. Den Tieren wurde 30h vor Aufnahme entweder der Ad_{hNIS} (links) oder der Ad_{LacZ} (rechts) Vektor mit einem Titer von 2,5 x 10^9 pfu intramyokardial appliziert.

Bereits 10 Minuten nach ^{123}I Injektion ist bei den Ad_{hNIS} –infizierten Tieren in der Herzregion eine spezifische Akkumulation zu sehen und verbleibt bis zum Ende der Bildgebung nach 120 Minuten auf den Aufnahmen sichtbar. In den Kontrolltieren (Ad_{LacZ}-infiziert) konnte zu keinem Zeitpunkt eine spezifische Nuklidanreicherung in der Herzregion identifiziert werden.

Die Ad_{hNIS}-transfizierten Ratten zeigen ebenfalls bereits 10 Minuten nach ^{99m}Tc Injektion eine spezifische kardiale Aufnahme, welche über den beobachteten Zeitraum von 120

Minuten sichtbar bleibt. Dagegen weisen die Kontrolltiere (Ad_{LacZ}-infiziert) nur während der Blutpoolphase eine diffuse Nuklidanreicherung in der Herzregion, jedoch auf weiteren Sequenzaufnahmen keine persistierende fokale Akkumulation auf.

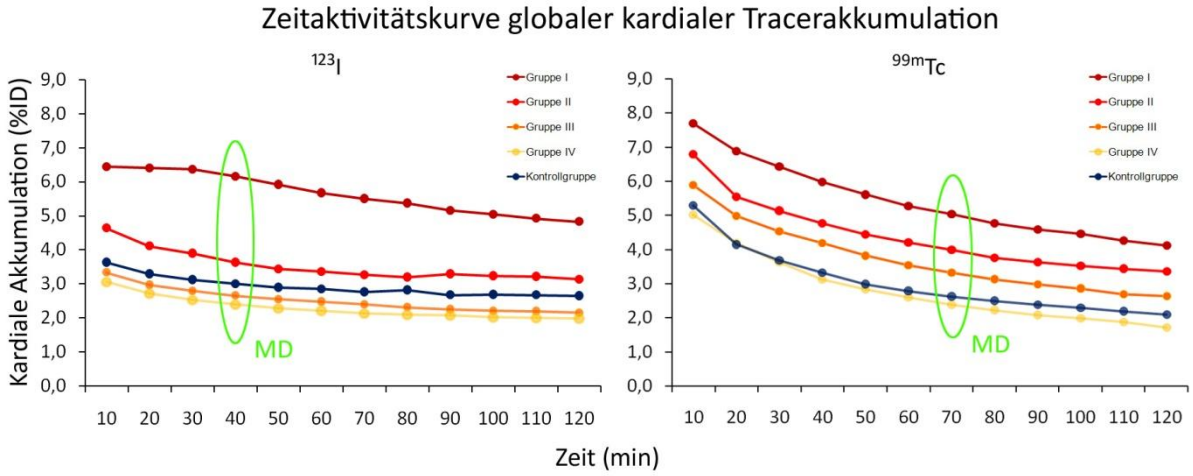


Abbildung 3-2 Kardiale Nuklidakkumulationskurve 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I (links) od. ^{99m}Tc (rechts). Gruppe I-IV: Ad_{hNIS}-infiziert in absteigender Dosis 2,5 x 10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^9 pfu, Kontrollgruppe: Ad_{LacZ}-infiziert in 2,5 x 10^9 pfu (n=3). Die Werte wurden durch eine ROI Analyse ermittelt (Mittelwerte in %ID). MD: Zeitpunkt mit der max. Differenz zw. Gruppe I und der Kontrollgruppe.

Abbildung 3-2 zeigt die Zeitaktivitätskurven der globalen kardialen Traceranreicherung links von Radioiod und rechts von Technetium über einen Zeitraum von 2 Stunden nach Injektion für die jeweilige Versuchsgruppe. Die Gruppen I-IV wurden 30 Stunden vorher mit Ad_{hNIS} in absteigender Dosis (2,5x10^9, 5,0x10^8, 1,0x10^8 und 2,0x10^7 pfu) infiziert. Die Kontrollgruppe erhielt das Ad_{LacZ} in 2,5x10^9 pfu. Die kardiale Nuklidakkumulation ist nach Radioiodgabe in den Gruppen I und II und nach Technetium-Pertechnetat-Gabe in den Gruppen I bis III signifikant höher als in den Kontrollegruppen (siehe Tabelle 3-1). Die kardiale Radiotraceranreicherung ist in diesen Gruppen bereits 10 Minuten nach i.v. Nuklidinjektion signifikant erhöht und verbleibt erhöht bis zum Ende der Bildgebung 120 Minuten nach Nuklidinjektion. In der Studiengruppe I mit der höchsten Vektordosis zeigt die kardiale Radioiod- bzw. Technetiumanreicherung 10 Minuten nach Tracerapplikation ihr absolutes Maximum mit 6,44±0,33%ID bzw. 7,70±0,62%ID. Das Beste Verhältnis zwischen spezifischer (Ad_{hNIS} Gruppe) und unspezifischer (Ad_{LacZ} Gruppe) kardialer Radiotraceranreicherung wird 30-40 Minuten nach i.v. Radioiodinjektion und 60-70 Minuten nach i.v. Technetium-Pertechnetat-Injektion erreicht (für ^{123}I 6,16±0,51%ID und für ^{99m}Tc 5,03±0,43%ID). Dies entspricht bei Radioiod einer 2,06±0,18fachen und bei Technetium einer 1,92±0,12fachen Akkumulation. Die Aktivitätskurve der Gruppe II ist nach ^{123}I Applikation im Gegensatz nach ^{99m}Tc Applikation deutlich niedriger und unterscheidet sich zur Kontrollgruppe mit p=0,1 nur noch schwach signifikant. Die Aktivitätskurven nach ^{99m}Tc i.v. Injektion liegen entsprechend der applizierten Ad_{hNIS} Dosis graduell niedriger. Während

in der Radioiodszintigraphie die Aktivitätskurven der Gruppen III und IV unterhalb Kontrollgruppenniveau liegen, verläuft in der Technetiumszintigraphie die Aktivitätskurve der Gruppe III oberhalb und der Gruppe IV auf Höhe Kontrollgruppenniveau. Mit Ausnahme der Gruppe I nach i.v. Radioiodinjektion weisen die Aktivitätskurven für ^{123}I und ^{99m}Tc anfänglich einen starken Abfall auf und erreichen am Ende der Bildgebung annähernd ein Plateau. Die Gruppen nach i.v. Technetium-Pertechnetat zeigen einen steileren Aktivitätsabfall, welcher sich in den Wash-Out Werten spiegelt. Die Aktivitätskurve der Gruppe I nach i.v. Radioiodinjektion zeigt in den ersten 30 Minuten nur einen schwachen Abfall und fällt dann kontinuierlich bis zum Ende der Bildgebung 120 Minuten nach i.v. Nuklidinjektion, wobei eine Plateaubildung sich nicht abzeichnet.

Über den gesamten Zeitraum zeigt der kardiale Radioiod Wash-Out für die Studiengruppen I-IV und der Kontrollgruppe Auswaschraten von 25±0,03%, 29±0,03%, 37±0,03%, 35±0,01% und 27±0,06%. Der kardiale Technetium Wash-Out über 120 min beträgt für die Studiengruppen I-IV und die Kontrollgruppe 47±0,02%, 50±0,02%, 55±0,03%, 61±0,02% und 60±0,01%.

Tabelle 3-1 Kardiale Traceranreicherung über den Aufnahmezeitraum von 120 min in %ID

Studien-gruppen	Aufnahme 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
						^{123}I						
Gruppe I	6,44 ±0,33	6,41 ±0,50	6,37 ±0,55	6,16 ±0,51	5,92 ±0,48	5,68 ±0,46	5,51 ±0,44	5,37 ±0,39	5,16 ±0,41	5,05 ±0,39	4,92 ±0,36	4,83 ±0,37
Gruppe II	4,64 ±0,02	4,11 ±0,09	3,90 ±0,12	3,63 ±0,10	3,43 ±0,08	3,36 ±0,09	3,27 ±0,09	3,20 ±0,10	3,30 ±0,11	3,24 ±0,08	3,22 ±0,09	3,13 ±0,09
Gruppe III	3,34 ±0,23	2,97 ±0,17	2,80 ±0,12	2,65 ±0,14	2,55 ±0,12	2,48 ±0,13	2,40 ±0,13	2,31 ±0,14	2,25 ±0,15	2,21 ±0,15	2,19 ±0,15	2,15 ±0,15
Gruppe IV	3,07 ±0,08	2,72 ±0,11	2,53 ±0,11	2,40 ±0,11	2,29 ±0,12	2,21 ±0,11	2,14 ±0,11	2,10 ±0,09	2,08 ±0,09	2,03 ±0,09	2,01 ±0,09	1,98 ±0,07
Kontroll-gruppe*	3,63 ±0,13	3,29 ±0,04	3,12 ±0,03	3,00 ±0,02	2,89 ±0,06	2,85 ±0,09	2,77 ±0,10	2,82 ±0,18	2,67 ±0,13	2,69 ±0,15	2,67 ±0,14	2,65 ±0,14
						^{99m}Tc						

Gruppe I	7,70 ±0,62	6,89 ±0,71	6,43 ±0,63	5,99 ±0,60	5,62 ±0,57	5,28 ±0,55	5,03 ±0,43	4,77 ±0,49	4,60 ±0,49	4,47 ±0,47	4,26 ±0,48	4,13 ±0,48
Gruppe II	6,80 ±0,31	5,55 ±0,34	5,14 ±0,28	4,77 ±0,24	4,45 ±0,22	4,20 ±0,19	3,99 ±0,15	3,76 ±0,10	3,64 ±0,10	3,53 ±0,10	3,44 ±0,10	3,36 ±0,10
Gruppe III	5,89 ±0,23	4,99 ±0,20	4,54 ±0,25	4,20 ±0,28	3,82 ±0,30	3,55 ±0,29	3,33 ±0,27	3,13 ±0,26	2,98 ±0,22	2,86 ±0,22	2,69 ±0,21	2,64 ±0,18
Gruppe IV	5,03 ±0,21	4,20 ±0,12	3,64 ±0,11	3,12 ±0,14	2,85 ±0,11	2,60 ±0,13	2,39 ±0,12	2,23 ±0,12	2,09 ±0,12	1,99 ±0,12	1,88 ±0,13	1,72 ±0,11
Kontroll-gruppe^{+}	5,30 ±0,27	4,16 ±0,11	3,70 ±0,10	3,33 ±0,09	2,99 ±0,10	2,80 ±0,11	2,62 ±0,10	2,51 ±0,13	2,39 ±0,12	2,30 ±0,14	2,20 ±0,14	2,10 ±0,13

Kontrollgruppe: Ad_{LacZ} 2,5 x 10^9 pfu, Gruppe I-IV: Ad_{hNIS} 2,5 x10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^7 pfu. Mittelwerte ± SEM in %ID, * p <0,0001 vs. Gruppe I, p=0,1 vs. Gruppe II, $^{+}$ p<0,0001 vs. Gruppe I, p=0,003 vs. Gruppe II und p=0,07 vs. Gruppe III.

3.1.2 Die Schilddrüse

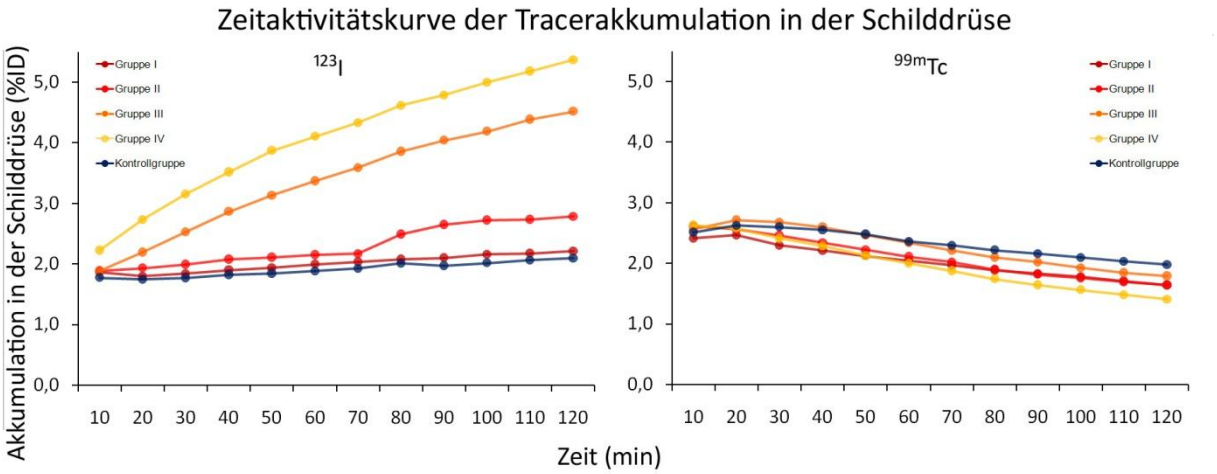


Abbildung 3-3 Nuklidakkumulationskurve in der Schilddrüse 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). Gruppe I-IV: Ad_{hNIS}-infiziert in absteigender Dosis 2,5 x 10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^9 pfu, Kontrollgruppe: Ad_{LacZ}-infiziert in 2,5 x 10^9 pfu. Die Werte wurden durch ROI Analyse ermittelt (Mittelwerte in %ID).

Außerhalb der Herzregion wurden relevante Nuklidanreicherungen nur in der Schilddrüse und im Magen gefunden. Beide Organe dienen aufgrund der bekannten physiologischen

NIS Expression als Referenz für die vektorvermittelte NIS Expression im Herzen.

Abbildung 3-3 zeigt den Zeitaktivitätsverlauf im Bereich der Schilddrüse für die jeweilige Versuchsgruppe links von Radioiod und rechts von Technetium-Pertechnetat über den gesamten Zeitraum von 2 Stunden nach Nuklidinjektion. Den Gruppen I-IV wurden 30 Stunden vorher der Ad_{hNIS} Vektor in absteigender Dosis ($2{,}5x10^9$, $5{,}0x10^8$, $1{,}0x10^8$ und $2{,}0x10^7$ pfu) und der Kontrollgruppe der Ad_{LacZ} Vektor in $2{,}5x10^9$ pfu gespritzt.

Bei allen Radioiodgruppen steigt die Traceranreicherung kontinuierlich an und hat am Ende der sequentiellen Szintigraphie nach 120 min ihr Maximum nicht erreicht. In der Radioiodszintigraphie verlaufen die Aktivitätskurven der Gruppe III und IV deutlich steiler als in den übrigen Gruppen.

Die Aktivitätskurven nach i.v. ^{99m}Tc Injektion steigen in den ersten 20 Minuten noch gering an, um dann bis zum Ende der Bildgebung kontinuierlich abzufallen. Die Aktivitätskurven nach Technetiumszintigraphie verlaufen gleichsinnig. Und es ist kein Unterschied zu den Kontrollgruppen festzustellen.

Tabelle 3-2 Traceranreicherung in der Schilddrüse 0-120 min nach i.v. Injektion in %ID

Studien-gruppen	Aufnahme											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	^{123}I											
Gruppe I	1,87 ±0,01	1,80 ±0,07	1,84 ±0,07	1,90 ±0,10	1,94 ±0,09	2,00 ±0,11	2,04 ±0,10	2,08 ±0,10	2,10 ±0,10	2,16 ±0,11	2,18 ±0,10	2,21 ±0,10
Gruppe II	1,89 ±0,09	1,93 ±0,16	1,99 ±0,19	2,08 ±0,26	2,11 ±0,28	2,15 ±0,30	2,17 ±0,30	2,49 ±0,27	2,65 ±0,23	2,73 ±0,17	2,74 ±0,14	2,79 ±0,12
Gruppe III	1,88 ±0,19	2,19 ±0,27	2,53 ±0,41	2,87 ±0,53	3,13 ±0,64	3,37 ±0,73	3,59 ±0,82	3,86 ±0,90	4,04 ±0,96	4,19 ±1,02	4,39 ±1,09	4,52 ±1,14
Gruppe IV	2,23 ±0,25	2,73 ±0,35	3,16 ±0,45	3,52 ±0,52	3,87 ±0,59	4,11 ±0,65	4,33 ±0,69	4,62 ±0,75	4,79 ±0,79	5,00 ±0,84	5,19 ±0,89	5,37 ±1,00
Kontroll-gruppe	1,77 ±0,12	1,74 ±0,14	1,77 ±0,14	1,82 ±0,12	1,85 ±0,12	1,88 ±0,10	1,92 ±0,07	2,01 ±0,11	1,97 ±0,12	2,02 ±0,12	2,06 ±0,12	2,10 ±0,13

	^{99m}Tc											
Gruppe I	2,41 ±0,05	2,46 ±0,09	2,30 ±0,06	2,21 ±0,06	2,12 ±0,07	2,04 ±0,08	1,97 ±0,07	1,89 ±0,07	1,83 ±0,08	1,78 ±0,07	1,71 ±0,08	1,64 ±0,08
Gruppe II	2,61 ±0,09	2,56 ±0,13	2,46 ±0,11	2,34 ±0,10	2,22 ±0,10	2,11 ±0,10	2,02 ±0,09	1,90 ±0,09	1,82 ±0,09	1,76 ±0,07	1,69 ±0,06	1,64 ±0,06
Gruppe III	2,56 ±0,18	2,72 ±0,24	2,68 ±0,24	2,60 ±0,24	2,46 ±0,22	2,34 ±0,20	2,21 ±0,20	2,10 ±0,20	2,02 ±0,19	1,92 ±0,18	1,84 ±0,20	1,79 ±0,20
Gruppe IV	2,63 ±0,25	2,58 ±0,28	2,41 ±0,27	2,28 ±0,25	2,13 ±0,25	2,00 ±0,24	1,88 ±0,21	1,74 ±0,21	1,64 ±0,20	1,56 ±0,20	1,48 ±0,17	1,41 ±0,16
Kontroll-gruppe	2,51 ±0,13	2,62 ±0,11	2,60 ±0,09	2,55 ±0,04	2,48 ±0,08	2,36 ±0,10	2,29 ±0,12	2,22 ±0,12	2,16 ±0,12	2,10 ±0,12	2,03 ±0,12	1,98 ±0,12

Kontrollgruppe: Ad_{LacZ} 2,5 x 10^9 pfu, Gruppe I-IV: Ad_{hNIS} 2,5 x10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^7 pfu, 30h nach intramyokardialen Gentransfer, Mittelwerte ± SEM in %ID.

Die Radioiodanreicherung über 120 Minuten nach i.v. Nuklidinjektion beträgt für die Gruppen I-IV und die Kontrollgruppe: 18±0,05%, 48±0,05%, 128±0,66%, 137±0,21% und 19±0,12% ID.

Der Technetium Wash-out im Bereich der Schilddrüse über 120 min beträgt für die Studiengruppen I-IV und Kontrollgruppe 34±0,07%, 37±0,02%, 30±0,07%, 47±0,01% und 23±0,13%. . Insgesamt gibt es keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen.

3.1.3 Der Magen

Abbildung 3-4 zeigt den Zeitaktivitätsverlauf im Bereich des Magens für die jeweilige Versuchsgruppe links von Radioiod und rechts von Technetium über den gesamten Zeitraum von 2 Stunden nach Injektion. Den Gruppen I-IV wurden 30 Stunden vorher der Ad_{hNIS} Vektor in absteigender Dosis ($2{,}5x10^9$, $5{,}0x10^8$, $1{,}0x10^8$ und $2{,}0x10^7$ pfu) und der Kontrollgruppe der Ad_{LacZ} Vektor in $2{,}5x10^9$ pfu gespritzt.

Sowohl bei allen Radioiod- wie auch Technetium-Pertechnetat-Gruppen steigt die Traceranreicherung kontinuierlich an, wobei sie anfänglich am steilsten ist. Am Ende der Szintigraphie ist weder ein Plateau noch ein Maximum erreicht.

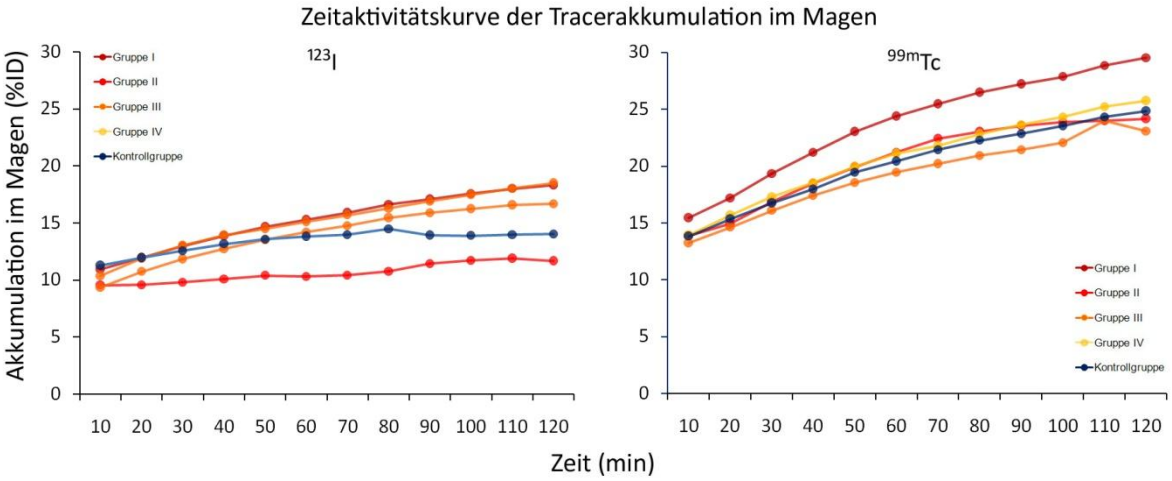


Abbildung 3-4 Nuklidakkumulationskurve im Magen 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). Gruppe I-IV: Ad_{hNIS}-infiziert in absteigender Dosis 2,5 x 10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^9 pfu, Kontrollgruppe: Ad_{LacZ}-infiziert in 2,5 x 10^9 pfu. Die Werte wurden durch ROI Analyse ermittelt (Mittelwerte in %ID).

Insgesamt verlaufen die Aktivitätskurven nach i.v. Technetium-Pertechnetat Injektion steiler und erreichen einen höhere %ID am Ende der Bildgebung als nach i.v. Radioiodinjektion. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen (Tabelle 3-3). Im Mittel beträgt die Radioiodanreicherung anfänglich 10,29±0,22%ID und 120 Minuten nach i.v. Nuklidapplikation 16,31±0,57%ID. Das entspricht einer Steigerung von 58%. Für Technetium-Pertechnetat ergeben sich folgende Werte: 14,27±0,22%ID in der ersten Aufnahme und 25,67±0,63%ID in der letzten Aufnahme. Das entspricht einer Steigerung von 80%.

Tabelle 3-3 Traceranreicherung im Magen 0-120 min nach i.v. Injektion in %ID

Studien-gruppen	Aufnahme											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	^{123}I											
Gruppe I	10,95 ±0,40	11,97 ±0,90	12,95 ±1,01	13,88 ±1,08	14,68 ±1,10	15,30 ±1,28	15,92 ±1,34	16,62 ±1,64	17,10 ±1,83	17,58 ±2,00	18,01 ±2,13	18,30 ±2,24

Gruppe II	9,54 ±1,18	9,57 ±1,50	9,80 ±1,76	10,08 ±1,92	10,40 ±2,14	10,31 ±2,18	10,41 ±2,16	10,76 ±2,23	11,44 ±2,31	11,71 ±2,38	11,91 ±2,56	11,68 ±2,78
Gruppe III	10,35 ±0,51	11,87 ±0,61	13,03 ±0,66	13,94 ±0,68	14,49 ±0,68	15,12 ±0,73	15,69 ±0,74	16,28 ±0,77	16,89 ±0,79	17,49 ±0,85	18,02 ±0,86	18,52 ±0,90
Gruppe IV	9,33 ±0,62	10,74 ±0,78	11,85 ±0,88	12,73 ±1,00	13,52 ±1,10	14,19 ±1,25	14,75 ±1,31	15,45 ±1,37	15,89 ±1,40	16,24 ±1,40	16,59 ±1,47	16,68 ±1,64
Kontroll-gruppe	11,29 ±1,81	11,97 ±2,33	12,55 ±2,60	13,16 ±2,83	13,57 ±3,01	13,81 ±3,12	13,98 ±3,37	14,48 ±2,84	13,93 ±2,84	13,89 ±2,84	13,96 ±2,85	14,04 ±2,87
						^{99m}Tc						
Gruppe I	15,45 ±0,25	17,17 ±1,01	19,32 ±1,21	21,20 ±1,55	23,03 ±1,70	24,38 ±1,82	25,47 ±1,95	26,48 ±2,07	27,22 ±2,24	27,84 ±2,23	28,83 ±2,62	29,51 ±2,84
Gruppe II	13,86 ±0,43	14,92 ±0,42	16,87 ±0,61	18,48 ±0,82	19,91 ±1,07	21,19 ±1,24	22,42 ±1,36	23,04 ±1,20	23,53 ±1,04	23,84 ±0,64	23,99 ±0,76	24,17 ±0,84
Gruppe III	13,25 ±0,39	14,62 ±0,87	16,09 ±1,06	17,41 ±1,15	18,53 ±1,20	19,44 ±1,16	20,21 ±1,08	20,92 ±1,06	21,43 ±0,98	22,05 ±0,99	24,01 ±2,04	23,07 ±0,92
Gruppe IV	13,94 ±0,02	15,68 ±0,22	17,28 ±0,76	18,53 ±0,94	19,97 ±1,12	21,10 ±1,19	21,80 ±1,12	22,82 ±1,27	23,63 ±1,46	24,30 ±1,54	25,20 ±1,77	25,74 ±1,94
Kontroll-gruppe	13,83 ±0,97	15,35 ±1,25	16,76 ±1,52	17,97 ±1,72	19,45 ±1,67	20,43 ±1,77	21,41 ±1,79	22,25 ±1,88	22,85 ±1,91	23,54 ±1,98	24,31 ±2,02	24,84 ±2,12

Kontrollgruppe: Ad_{LacZ} 2,5 x 10^9 pfu, Gruppe I-IV: Ad_{hNIS} 2,5 x10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^7 pfu, 30h nach intramyokardialen Gentransfer, Mittelwerte ± SEM in %ID.

3.2 Die Korrelation von Reportersignalstärke und Vektordosis (Studie II)

Eine fokale Nuklidanreicherung in der Herzregion konnte szintigraphisch mit ^{123}I 30 Stunden nach Vektorapplikation in einem Titer von 2,5 x 10^9, 5 x 10^8 pfu und in 2 von 3 Ratten von 1 x 10^8 pfu visuell identifiziert werden. Mit ^{99m}Tc als Radiotracer wurde bei einem viralen Titer von 2,5 x 10^9, 5 x 10^8 und 1 x 10^8 pfu eine fokale Nuklidakkumulation in der Herzregion bei allen Tieren gesehen. Bei einem viralen Titer von 2 x 10^7 pfu konnte szintigraphisch weder mit ^{123}I noch mit ^{99m}Tc eine fokale Akkumulation in der Herzregion visuell identifiziert werden (**Abbildung 3-5**).

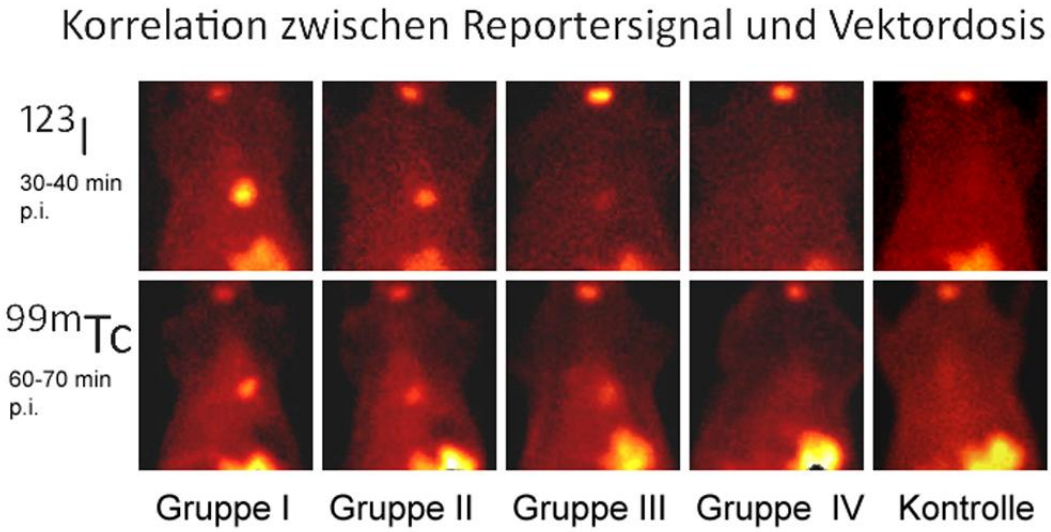


Abbildung 3-5 Thoraxszintigraphien repräsentativer Rattenherzen, in der oberen Reihe 30-40 Minuten nach ^{123}Iod Injektion, in der unteren Reihe 60-70 Minuten nach ^{99m}Tc Injektion und 30 Stunden nach Vektorinjektion. Von links nach rechts die Gruppen I-IV und die Kontrollegruppe (Ad_{hNIS} 2,5 x 10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8, 2,0 x 10^7 und Ad_{LacZ} 2,5 x 10^9 pfu). Die gewählten Aufnahmezeitpunkte zeigen das Beste Signal-Rausch-Verhältnis.

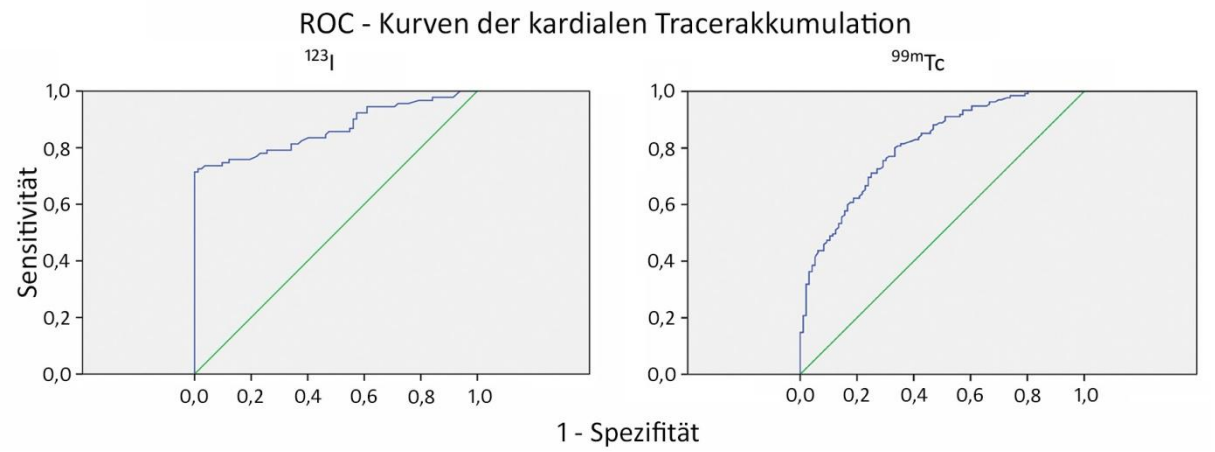


Abbildung 3-6 zeigt die ROC Kurven der visuell identifizierbaren spezifischen kardialen Traceranreicherung für ^{123}I (links) und für ^{99m}Tc (rechts).

Die visuell noch identifizierbare spezifische kardiale Akkumulation wurde mit Zuhilfenahme der ROC Kurven Analyse für ^{123}I auf einen Wert von 2,40 %ID und für ^{99m}Tc auf einen Wert von 2,50 %ID festgelegt. Der Grenzwert von 2,40 %ID besitzt eine Sensitivität von 0,89 und Spezifität von 0,439 für Radioiod. Der Grenzwert für Technetium besitzt eine Sensitivität von 0,91 und einer Spezifität von 0,448.

Die szintigraphisch erfasste Nuklidanreicherung in der Herzregion korrelierte gut mit der vorher applizierten Vektordosis. Die statistische Auswertung ergab eine signifikant höhere kardiale Anreicherung bei den Ad_{hNIS}-gespritzten Tieren mit einem Titer von 2,5 x 10^9, 5 x 10^8 pfu als bei den Kontrolltieren (**Tabelle 3-4**).

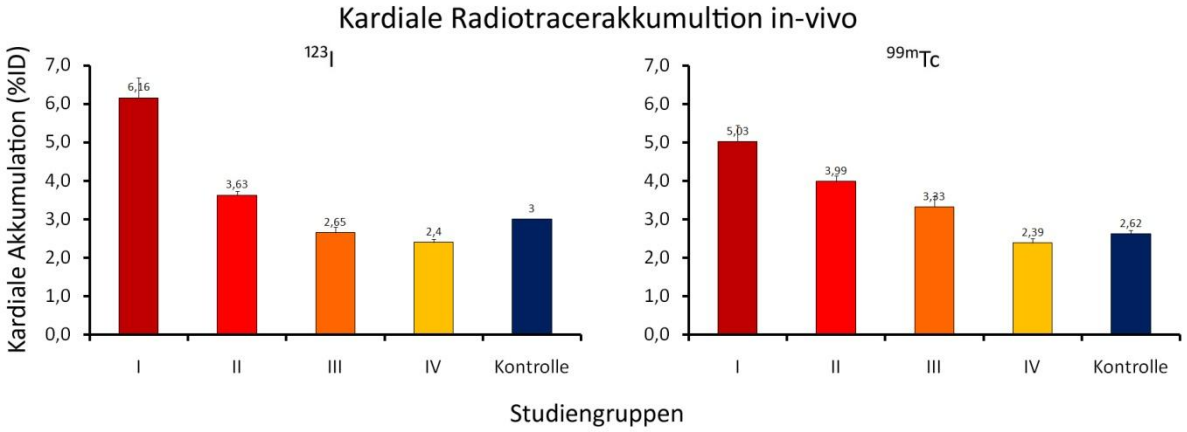


Abbildung 3-7 Die Nuklidakkumulation im Bereich der Herzregion wurde szintigraphisch 30h nach Vektorapplikation erfasst. Links für ^{123}I 30-40 min und rechts für ^{99m}Tc 60-70 min nach Tracerapplikation. Gruppen I-IV: Ad_{hNIS}, 2,5 x 10^9 pfu, 5,0 x 10^8 pfu, 1,0 x 10^8 pfu, 2,0 x 10^7 pfu und Kontrolle: Ad_{LacZ}, 2,5 x 10^9 pfu. Mittelwerte ± SEM in %ID (siehe Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4 Kardiale Traceraufnahme in %ID

		Tracer	
Studiengruppen	Vektordosis (pfu)	^{123}I	^{99m}Tc
Gruppe I (Ad_{hNIS})	2,5 x 10^9	6,16 ± 0,51	5,03 ± 0,43
Gruppe II (Ad_{hNIS})	5,0 x 10^8	3,63 ± 0,10	3,99 ± 0,15
Gruppe III (Ad_{hNIS})	1,0 x 10^8	2,65 ± 0,14	3,33 ± 0,27
Gruppe IV (Ad_{hNIS})	2,0 x 10^7	2,40 ± 0,08	2,39 ± 0,12

Inhibitionsgruppe (Ad_{hNIS} + i.v. Perchlorat)	2,5 x 10^9	2,86±0,03	2,91±0,11
Kontrollgruppe (Ad_{LacZ})	2,5 x 10^9	3,00 ± 0,02$^+$	2,62 ± 0,10*

Mittelwerte ± SEM in %ID; n=3, * p<0,0001 vs. Gruppe I, p=0,003 vs. Gruppe II, p=0,07 vs. Gruppe III

$^+$ p<0,0001 vs. Gruppe I, p=0,10 vs. Gruppe II. 30-40 min nach Radioiod und 60-70 min nach Technetium Pertechnetat Injektion.

3.3 Der Zeitverlauf der hNIS Genexpression (Studie III)

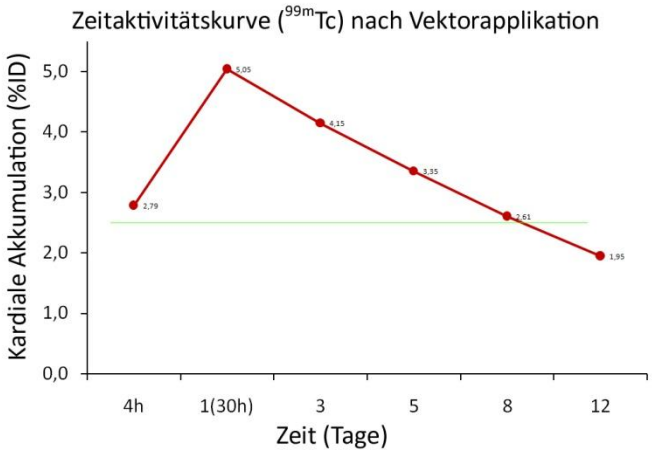


Abbildung 3-8 Kardiale Aktivitätskurve in Prozent injizierter Dose nach sequentieller i.v. ^{99m}Tc Applikation in Tagen bzw. Stunden nach direkter Ad_{hNIS} Vektorinjektion (2,5 x 10^9 pfu). Aufnahmezeitpunkt 60-70 min. nach Nuklidinjektion. Grüne Linie = Festgelegter Grenzwert für visuell identifizierbare ^{99m}Tc Akkumulation nach ROC Analyse; Mittelwert ± SEM; n=3.

Tabelle 3-5 Kardiale Aktivität in %ID in der ^{99m}Tc Szintigraphie nach Ad_{hNIS} Infektion

Zeitpunkt (d(h))	0 (4h)	1 (30h)	3d	5d	8d	12d
nach intramyokardiale Injektion	2,79 ± 0,24	5,03 ± 0,43	4,15 ± 0,51	3,35 ± 0,52	2,61 ± 0,03	1,95 ± 0,18

Mittelwerte ± SEM in %ID; n=3, Grenzwert für visuell identifizierbare ^{99m}Tc Akkumulation = 2,5 %ID.

Sequenzielle Aufnahmen mit der Gammakamera wurden bis zum 12ten Tag nach intramyokardialer Injektion des Ad_{hNIS} akquiriert, um den Zeitverlauf der hNIS Expression evaluieren zu können (**Abbildung 3-8**). Die kardiale ^{99m}Tc Akkumulation gipfelte am 2. Tag nach intramyokardialer Vektorinjektion und sank dann bis zum 12ten Tag. Eine spezifische kardiale Akkumulation konnte bis zum 8ten Tag, aber nicht mehr am 12ten Tag beobachtet werden. Die Kontrollgruppe wurde nur am ersten Tag nach Vektorapplikation szintigraphiert. Im Vergleich zu den Werten der Kontrolltiere ist die spezifische kardiale Technetiumanreicherung am 1, 3 und 5 Tag nach Vektorapplikation signifikant erhöht.

3.4 Die spezifische Blockade der Nuklidaufnahme mit Natriumperchlorat (Studie IV)

Die Szintigraphie erfolgte 30 Stunden nach Ad_{hNIS} in 2,5 x 109 pfu Vektorapplikation mit jeweils Radioiod und ^{99m}Technetium Pertechnetat. Bei den mit Natriumperchlorat vorbehandelten Ratten konnte visuell keine fokale kardiale Nuklidanreicherung identifiziert werden (**Abbildung 3-9**).

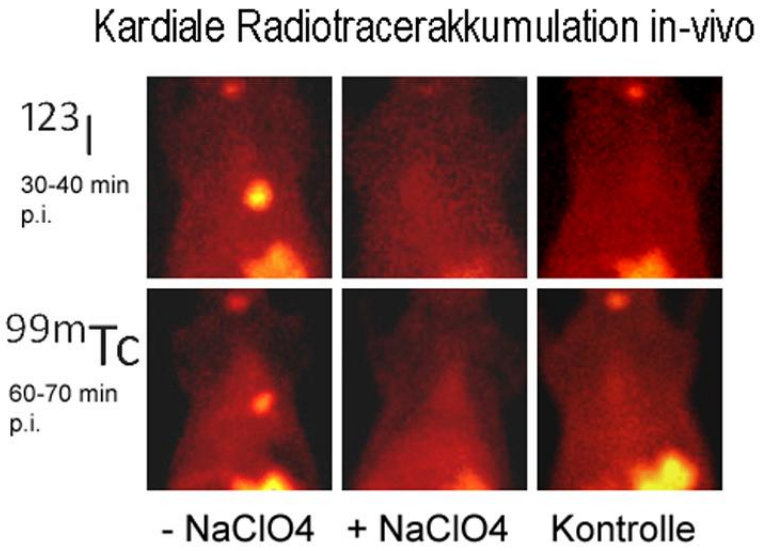


Abbildung 3-9 Thoraxszintigraphien repräsentativer Rattenherzen, in der oberen Reihe 30-40 Minuten nach ^{123}Iod Injektion, in der unteren Reihe 60-70 Minuten nach ^{99m}Tc Injektion. Von links nach rechts Ad_{hNIS} (2,5 x 10^9 pfu) ohne (-) Perchlorat-Gabe, Ad_{hNIS} (2,5 x 10^9 pfu) mit (+) Perchlorat-Gabe und Ad_{LacZ} (2,5 x 10^9 pfu) (Kontrolle). Die gewählten Aufnahmezeitpunkte zeigen das Beste Signal-Rausch-Verhältnis.

Quantitativ war die Nuklidaufnahme in der Herzregion bei den mit Natriumperchlorat vorbehandelten Tieren signifikant niedriger als bei den nicht vorbehandelten Tieren (Tabelle 3-6). Die Radioiodszintigraphie ergab bei den mit Natriumperchlorat vorbehandelten Ratten eine Nuklidakkumulation in der Herzregion von 2,86 ± 0,03 %ID gegenüber 6,2 ± 0,5 %ID bei den nicht vorbehandelten Tieren (P<0,0001). In der ^{99m}Tc Szintigraphie zeigten die mit Natriumperchlorat vorbehandelten Ratten eine kardiale Nuklidanreicherung von 2,54 ± 0,01 %ID gegenüber 5,03 ± 0,4 %ID bei den nicht vorbehandelten Tieren (P<0,0001).

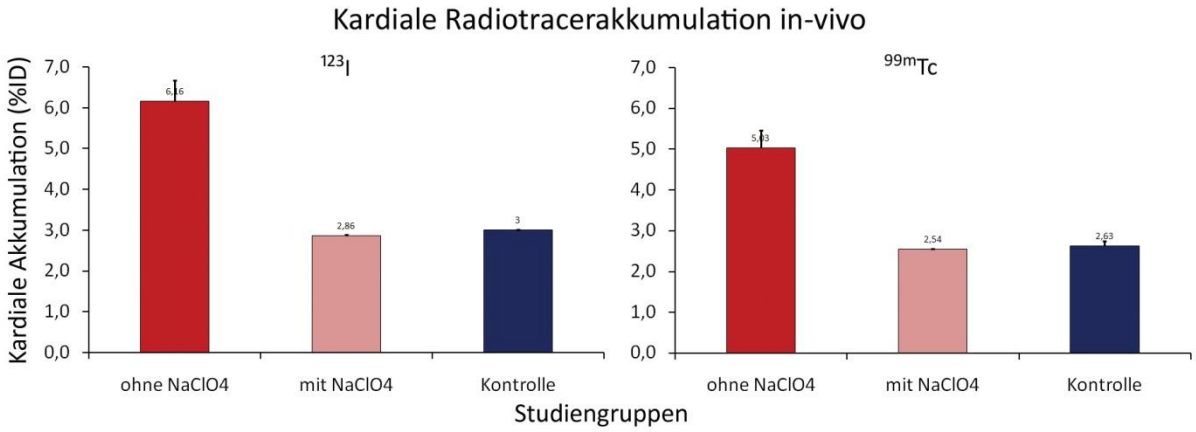


Abbildung 3-10 Die Nuklidakkumulation in der Herzregion wurde szintigraphisch 30h nach Vektorinjektion erfasst. Links ^{123}I 30-40 min und rechts ^{99m}Tc 60-70 min nach Tracerapplikation. Gruppen: Ohne/nach 3x oraler Natrium-Perchlorat ($NaClO^4$) Gabe, Ad_{hNIS} in 2,5 x 10^9 pfu und Kontrollgruppe mit Ad_{LacZ} in 2,5 x 10^9 pfu. Mittelwerte ± SEM in %ID.

Tabelle 3-6 Kardiale Nuklidakkumulation in der Szintigraphie in %ID

		Tracer	
Studiengruppen	Vektordosis (pfu)	^{123}I	^{99m}Tc
Ohne Perchlorat	$2,5 \times 10^9$	6,16 ± 0,51	5,03 ± 0,43
Mit Perchlorat	$2,5 \times 10^9$	2,86 ± 0,03*	2,54 ± 0,14+
Kontrollgruppe	$2,5 \times 10^9$	3,00 ± 0,02	2,63 ± 0,11

Für ^{123}I 40 min und ^{99m}Tc 70 min nach Tracerinjektion; Gruppen ohne/mit Perchlorat Vorbehandlung: Ad_{hNIS}: $2,5 \times 10^9$ pfu; Kontrolle: Ad_{LacZ}, $2,5 \times 10^9$ pfu. Mittelwerte ± SEM; n=3.

* p<0,0001 vs. Gruppe I (Ohne Perchlorat), p=1,0 vs. Kontrollgruppe, + p<0,0001 vs. Gruppe I (Ohne Perchlorat), p=1,0 vs. Kontrollgruppe.

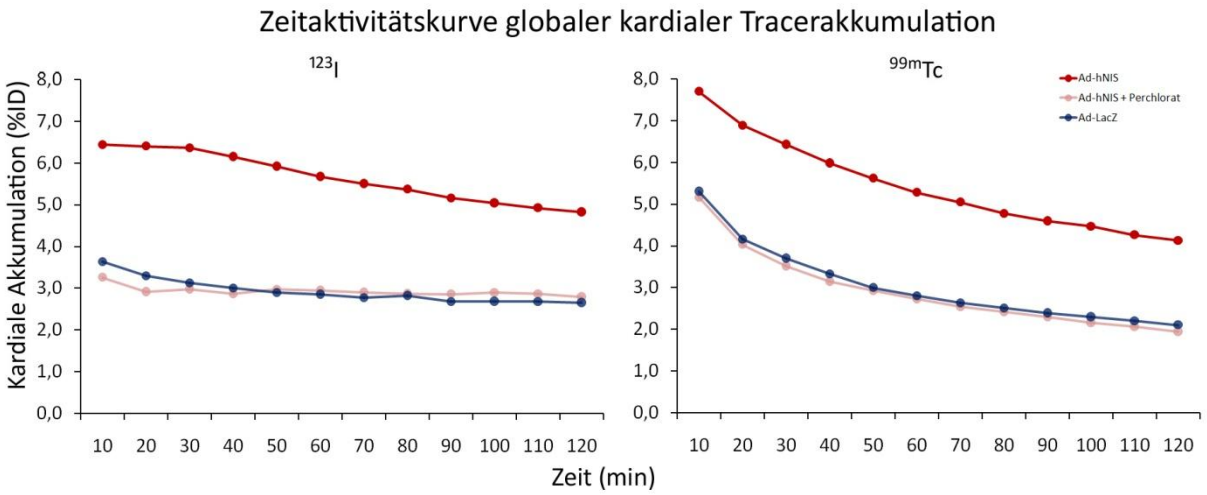


Abbildung 3-11 Kardiale Nuklidakkumulationskurve 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). Allen Gruppen wurde der entsprechende Vektor in 2,5 x 10^9 pfu 30h vorher gespritzt. Die Ad_{hNIS} + Perchlorat Gruppe erhielt 24, 8 und 4 Stunden vor Bildgebung Perchlorat oral (n=3). Mittelwerte ± SEM in %ID.

Abbildung 3-11 zeigt die Zeitaktivitätskurven in der Herzregion für die jeweilige Versuchsgruppe links von Radioiod und rechts von Technetium-Pertechnetat bis 2 Stunden nach Injektion. Allen Gruppen wurden 30 Stunden vor der Szintigraphie der jeweilige Vektor

in der Höchstdosis von 2,5 x 10^9 pfu injiziert (n=3). Die Gruppen „Ad-hNIS + Perchlorat“ erhielt oral Natrium-Perchlorat 24, 8 und 4 Stunden vor der Bildgebung. Die kardiale Radioiod- oder Technetium-Pertechnetat-Anreicherung unterscheidet von der mit Natrium-Perchlorat vorbehandelten Gruppe und der Kontrollgruppe mit p<0,0001 hochsignifikant. Die Werte in der Kontrollgruppe unterscheiden sich von den Werten in der mit Natrium-Perchlorat vorbehandelten Gruppe nicht signifikant (p=1,0). Die Zeitaktivitätskurven beider Radiotracer verlaufen in der mit Perchlorat vorbehandelten Gruppe auf Niveau der jeweiligen Kontrollgruppe. Über die gesamten 120 min der Bildgebung zeigen die mit Perchlorat vorbehandelten Tiere einen Wash-Out von 16±1,28% (^{123}I) bzw. 62±0,65% (^{99m}Tc). Die Werte der nicht mit Perchlorat vorbehandelten Gruppen sowie der Kontrollgruppen sind in Tabelle 3-1 auf Seite 35 zu finden.

Tabelle 3-7 Zeitaktivitätsverlauf 0-120 min in der Szintigraphie nach oraler Perchlorat-Gabe (%ID)

	Aufnahme											
Ad_{hNIS} + Perchlorat ($2{,}5x10^9$ pfu)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
						^{123}I						
Herz	3,26 ±0,02	2,92 ±0,06	2,98 ±0,03	2,86 ±0,03	2,97 ±0,02	2,95 ±0,03	2,90 ±0,01	2,87 ±0,01	2,86 ±0,01	2,89 ±0,03	2,87 ±0,08	2,79 ±0,09
Schilddrüse	1,43 ±0,05	1,42 ±0,05	1,37 ±0,04	1,37 ±0,05	1,36 ±0,04	1,35 ±0,04	1,34 ±0,05	1,33 ±0,04	1,32 ±0,06	1,32 ±0,07	1,33 ±0,06	1,32 ±0,06
Magen	8,21 ±0,59	8,55 ±0,56	9,20 ±0,65	9,68 ±0,63	10,47 ±0,48	11,19 ±0,55	11,62 ±0,61	12,07 ±0,77	12,13 ±0,64	12,19 ±0,64	12,32 ±0,71	12,35 ±0,67
						^{99m}Tc						
Herz	5,16 ±0,31	4,03 ±0,23	3,52 ±0,15	3,15 ±0,11	2,92 ±0,13	2,72 0,14±	2,54 ±0,14	2,41 ±0,12	2,30 ±0,90	2,16 ±0,40	2,06 ±0,80	1,94 ±0,15
Schilddrüse	1,79 ±0,06	1,68 ±0,10	1,61 ±0,11	1,49 ±0,11	1,35 0,10	1,29 ±0,07	1,24 ±0,05	1,20 ±0,05	1,17 ±0,05	1,13 ±0,05	1,10 ±0,04	1,06 ±0,01
Magen	9,86 ±0,15	10,89 ±0,27	11,79 ±0,25	12,85 ±0,40	13,46 ±0,54	13,58 ±0,46	13,96 ±0,16	14,48 ±0,11	14,84 ±0,29	15,25 ±0,32	15,52 ±0,49	15,78 ±0,65

Nuklidanreicherung 30h nach $Ad_{CMV\text{-}hNIS}$ und 4, 8, und 24 Stunden nach oraler Natrium-Perchlorat Gabe, Mittelwerte ± SEM in %ID.

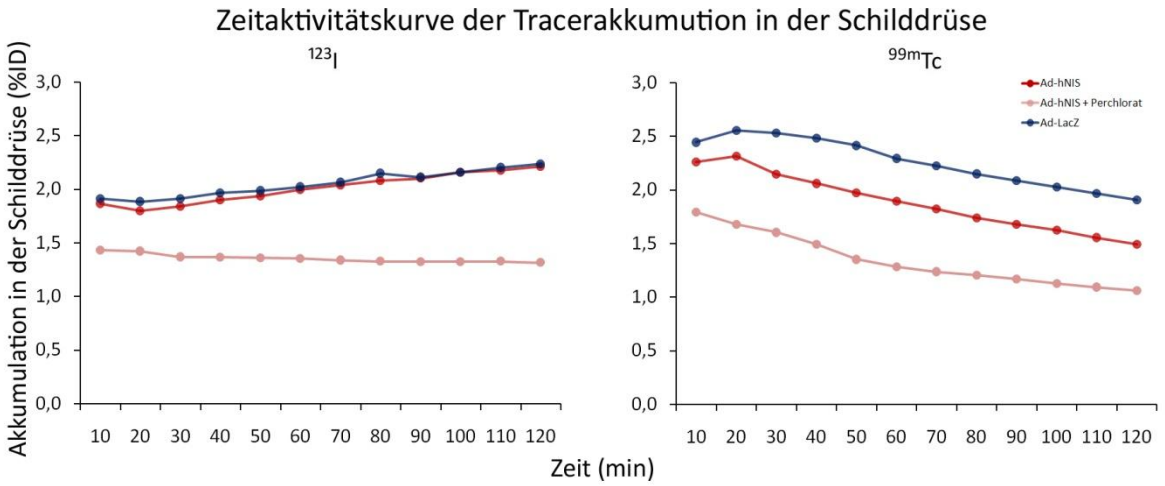


Abbildung 3-12 Nuklidakkumulationskurve der Schilddrüse 0-120 min p.i. in der Szintigraphie mit ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). Die Vektorinjektion erfolgte 30h vorher. Gruppen: Ad_{hNIS} ohne und nach oraler Natrium-Perchlorat-Gabe (4,8, 24h vorher) und Ad_{LacZ}, jeweils in 2,5 x 10^9 pfu. n=3, Mittelwerte ± SEM in %ID.

Abbildung 3-12 zeigt die Zeitaktivitätskurven in der Schilddrüse links von Radioiod und rechts von Technetium-Pertechnetat bis 2 Stunden p.i. für die jeweilige Versuchsgruppe.

Die Radioiodakkumulation in der Schilddrüse zwischen der mit Perchlorat vorbehandelten Gruppe und der nicht vorbehandelten Gruppen (inkl. Kontrollgruppe) unterscheidet sich signifikant ($p<0,0001$). Zwischen allen 3 Gruppen unterscheidet sich die thyroidale Technetiumanreicherung statistisch signifikant mit $p<0,0001$.

Die mit Natrium-Perchlorat vorbehandelten Tiere zeigen in der Szintigraphie mit Radioiod oder Technetium einen kontinuierlichen Akkumulationsabfall. Außerdem kann kein Anreicherungsmaxima 0-20 min nach Technetium Injektion beobachten werden. Der Wash-Out in der Schilddrüse für die vorbehandelten Gruppen beträgt über den gesamten Zeitraum von 120 min 8±3,03% für ^{123}I und 41±1,52% für ^{99m}Tc. Die Ergebnisse der nicht vorbehandelten Gruppen und der Kontrollgruppen, sind in Tabelle 3-2, auf Seite 37 zu finden.

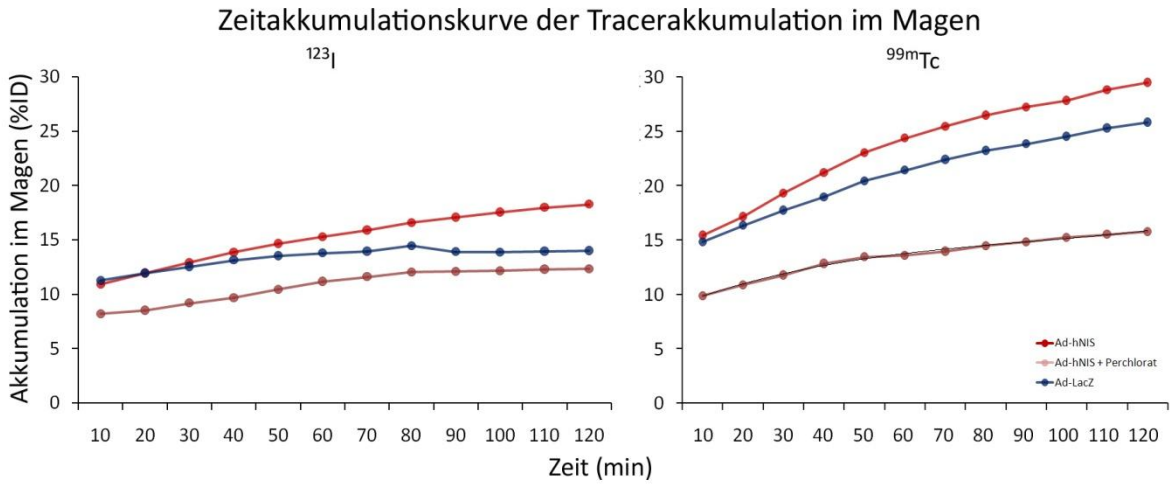


Abbildung 3-13 Nuklidakkumulationskurve des Magens 0-120 min p.i. in der Szintigraphie mit ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). Die Vektorinjektion erfolgte 30h vorher. Gruppen: Ad_{hNIS} ohne und nach oraler Natrium-Perchlorat-Gabe (4,8, 24h vorher) und Ad_{LacZ}, jeweils in 2,5 x 10^9 pfu. n=3, Mittelwerte ± SEM in %ID.

Abbildung 3-13 zeigt die Zeitaktivitätskurven des Magens links von Radioiod und rechts von Technetium-Pertechnetat bis 120 min p.i. für die jeweilige Versuchsgruppe.

Die Radioiodakkumulation im Magen unterscheidet sich stark signifikant zwischen der mit Natrium-Perchlorat vorbehandelten Gruppe, der nicht vorbehandelten Gruppe ($p<0,0001$) und der Kontrollgruppe ($p=0,003$). Zwischen den nicht vorbehandelten Tieren gibt es einen schwach signifikanten Unterschied ($p=0,04$).

Die Technetiumanreicherung im Magen der mit Perchlorat vorbehandelten Tiere weicht signifikant von den nicht vorbehandelten Gruppen, der Ad_{hNIS} wie auch der Ad_{LacZ} Gruppe, mit $p<0,0001$ ab. Zwischen den nicht vorbehandelten Tieren gibt es einen schwach signifikanten Unterschied ($p=0,026$).

Die Zeitaktivitätskurve nach ^{123}I-Injektion verläuft bei den mit Natrium-Perchlorat vorbehandelten Tieren im Gegensatz zu den nicht vorbehandelten Tieren auf einem niedrigeren Niveau mit Plateaubildung bei 120 min p.i..

Die Technetiumanreicherung im Magen sinkt über die gesamten 120 min und hat ihr Minimum am Ende der Bildgebung nicht erreicht.

In der Radioiodszintigraphie beträgt der Wash-Out der Natrium-Perchlorat vorbehandelten Tieren im Magen über 120 min p.i. 51±3,26%. In der Technetium-Pertechnetat-Szintigraphie nimmt die Nuklidanreicherung im Magen der vorbehandelten Tiere über 120 min p.i. um 60±5,97% zu. Die Werte der nicht mit Natrium-Perchlorat vorbehandelten Gruppen, inklusive der Kontrollgruppen, sind in Tabelle 3-3 auf Seite 39 zu finden.

3.5 Die kardiale in-vivo / ex-vivo Korrelationsanalyse

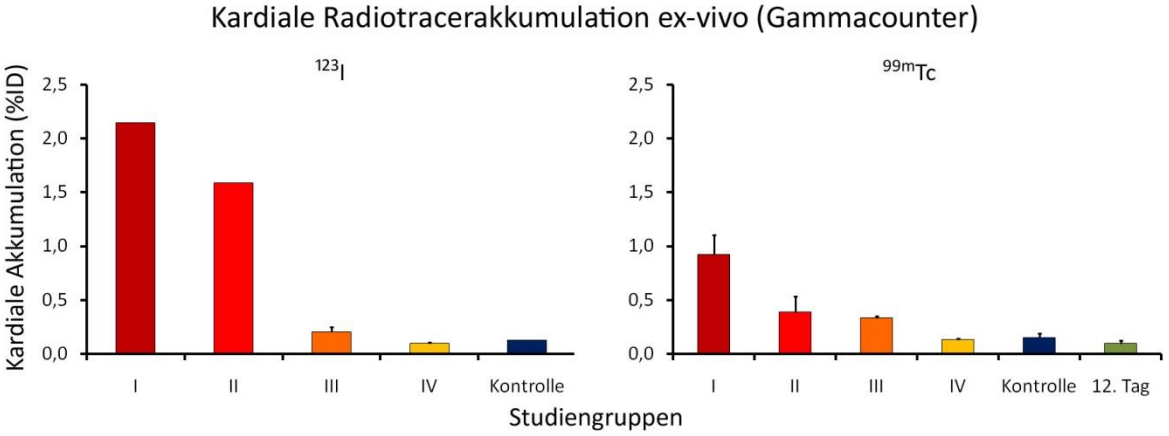


Abbildung 3-14 Kardiale Nuklidanreicherung ca. 3h nach Nuklidinjektion und ca. 30h nach intramyokardialer Vektorinjektion, links für I^{123} und rechts für Tc^{99m}. Gruppen I-IV: Ad_{hNIS}, I: 2,5 x 10^9 pfu II: 5,0 x 10^8 pfu III: 1,0 x 10^8 pfu IV: 2,0 x 10^7 pfu. Kontrolle: Ad_{LacZ}, 2,5 x 10^9 pfu. 12. Tag: Ad_{hNIS} 2,5 x 10^9 pfu 12 Tage nach Vektortransfektion. Gemessen im Gammacounter. Mittelwerte ± SEM in %ID; n=3; * n=1, + n=2.

Abbildung 3-14 zeigt ein Balkendiagramm, welches die Aktivität in der Herzprobe in Prozent injizierter Dosis für Radioiod links und für Technetium-Pertechnetat rechts wiedergibt. Die Messungen erfolgten ex-vivo im Gammacounter gut 3 Stunden nach Tracerinjektion. Das Balkendiagramm zeigt die kardiale Nuklidaktivität der Gruppen I-IV und der Kontrollgruppe von links nach rechts. Die quantitativen Werte sind in Tabelle 3-8 aufgeführt. Die in-vivo und ex-vivo Werte für die kardiale Nuklidanreicherung korrelieren gut.

Tabelle 3-8 Kardiale Nuklidakkumulation gemessen im Gammacounter in %ID

		Tracer	
Studiengruppen	Vektordosis (pfu)	^{123}I	^{99m}Tc
Gruppe I	2,5 x 10^9	2,15*	0,92 ± 0,18
Gruppe II	5,0 x 10^8	1,16*	0,39 ± 0,15
Gruppe III	1,0 x 10^8	0,21 ± 0,04	0,33 ± 0,02

Gruppe IV	$2{,}0 \times 10^7$	0,10 ± 0,01	0,13 ± 0,01
Zeitverlaufsgruppe (12. Tag nach Vektortransfer)	$2{,}5 \times 10^9$	-	0,10 ± 0,02
Kontrollgruppe	$2{,}5 \times 10^9$	0,13± 0,01$^+$	0,15 ± 0,03

Gruppen I-IV: Ad_{hNIS}, I: $2{,}5 \times 10^9$ pfu II: $5{,}0 \times 10^8$ pfu III: $1{,}0 \times 10^8$ pfu IV: $2{,}0 \times 10^7$ pfu Zeitverlaufsgruppe: $2{,}5 \times 10^9$ pfu. Kontrolle: Ad_{LacZ}, $2{,}5 \times 10^9$ pfu. Mittelwerte ± SEM; n=3, * n=1 $^+$ n=2 (Gammacounter Fehler).

Die postmortem Analyse ergab eine signifikante Korrelation der In-vivo-Szintigraphie mit der Ex-vivo-Gammacountermessung für die kardiale ^{99m}Tc Akkumulation (R_S=0,88 P<0,0001; n=18). Auch für die kardiale ^{123}I Akkumulation korrelierte die In-vivo-Szintigraphie hochsignifikant mit der Ex-vivo-Gammacountermessung (R_S=0,90 P<0,0002; n=10).

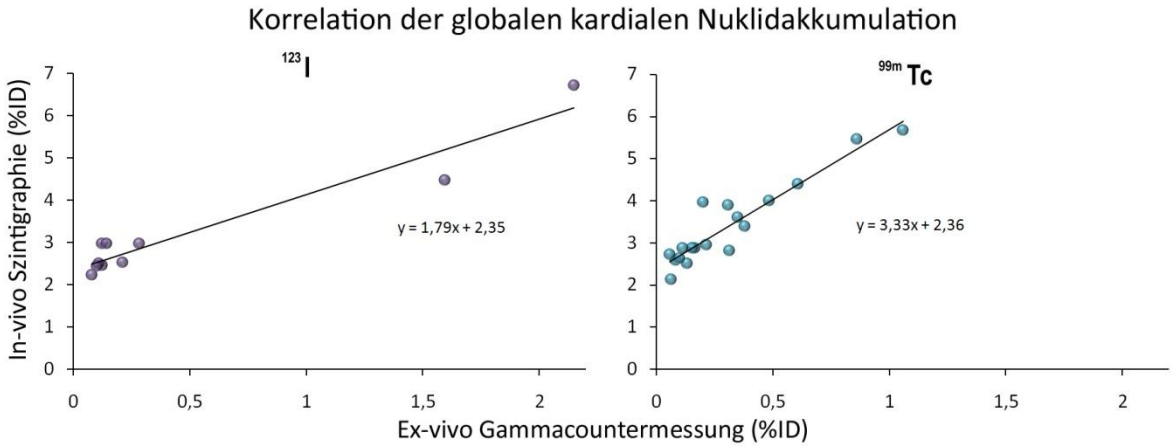


Abbildung 3-15 Korrelationsgraphen der kardialen Nuklidakkumulation für das jeweilige Nuklid. Szintigraphie (%ID) versus Gammacountermessung (%ID). Spearman Korrelationskoeffizient für ^{123}I: R_s=0,90 P<0,0002 n=10 und für ^{99m}Tc: R_s=0,88 P<0,0001.

Tabelle 3-9 Korrelation in-vivo zu ex-vivo (Herzen)

Studien-gruppen	Radiotracer ^{123}I In-vivo Szinitigraphie (%ID)	Radiotracer ^{123}I Ex-vivo Gammacounter (%ID)	Radiotracer ^{99m}Tc In-vivo Szinitigraphie (%ID)	Radiotracer ^{99m}Tc Ex-vivo Gammacounter (%ID)
Gruppe I	6,71*	2,149	5,68	1,06
			5,46	0,86
			4,00	0,485
Gruppe II	4,47*	1,159	3,6	0,349
			4,4	0,609
			3,96	0,202
Gruppe III	2,46	0,124	2,82	0,313
	2,53	0,211	3,4	0,38
	2,98	0,283	3,9	0,308
Gruppe IV	2,23	0,081	2,87	0,155
	2,51	0,109	2,51	0,132
	2,44	0,101	2,87	0,112
Gruppe V	keine Gruppen		2,63	0,099
			2,13	0,062
			2,72	0,057
Kontroll-gruppe	2,98*	0,124	2,95	0,214
	2,97*	0,142	2,87	0,165
			2,58	0,083

Kontrollgruppe: Ad_{LacZ} 2,5 x 10^9 pfu, Gruppe I-IV: Ad_{hNIS} 2,5 x10^9, 5,0 x 10^8, 1,0 x 10^8 und 2,0 x 10^7 pfu. Mittelwerte ± SEM in %ID; *ausgeschlossen aufgrund eines Gammacounterfehlers.

3.6 Die Organbiodistribution

Auf Abbildung 3-16 ist die Biodistribution ausgewählter Gewebeproben für Radioiod (links) und Technetium-Pertechnetat (rechts) zu sehen. Die Tiere wurden im Mittel 3 Stunden nach Tracerapplikation geopfert. Die Organproben wurden sofort entnommen und die Aktivität im Gammacounter gemessen. Die Aktivität wird in Prozent injizierter Dosis pro Gramm Gewebe angegeben. Die Schilddrüsenwerte werden wegen Gründen der besseren Übersichtlichkeit weggelassen, sind jedoch in Tabelle 3-10 aufgeführt.

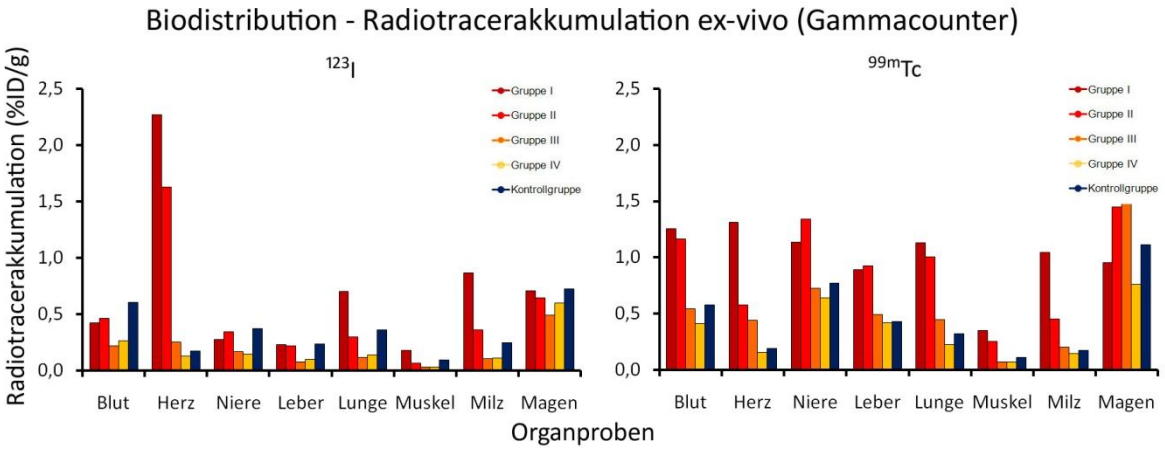


Abbildung 3-16 Nuklidanreicherung in den jeweiligen Organproben und Studiengruppe, gemessen im Gammacounter ca. 3 Stunden nach Nuklidinjektion und 33-34 Stunden nach Vektorapplikation. Links für ^{123}I und rechts für ^{99m}Tc. Gruppen I-IV: Ad_{hNIS}, I: 2,5 x 10^9 pfu II: 5,0 x 10^8 pfu III: 1,0 x 10^8 pfu IV: 2,0 x 10^7 pfu und Kontrolle: Ad_{LacZ}, 2,5 x 10^9 pfu. Mittelwerte in %ID/g, n=3.

Bemerkung: Aufgrund mangelnder Probenzahl in der Kontrollgruppe sowie in den Studiengruppen I und II nach Radioiodinjektion ist die Prüfung dieser Gruppen mit einem statistischen Test nicht möglich bzw. sinnvoll.

Tabelle 3-10 Biodistribution nach abgeschlossener Szintigraphie in %ID/g

	Proben								
Studiengruppe	Blut	Herz	Niere	Leber	Lunge	Muskel	Milz	Magen	Schild-drüse
				^{123}Iod					
Gruppe I* ($Ad_{hNIS,}$ 2,5x10^9 pfu)	0,43	2,27	0,28	0,23	0,70	0,18	0,87	0,71	50,18
Gruppe II* ($Ad_{hNIS,}$ 5,0x10^8 pfu)	0,46	1,63	0,35	0,22	0,30	0,07	0,36	0,65	51,63
Gruppe III ($Ad_{hNIS,}$ 1,0x10^8 pfu)	0,22 ± 0,03	0,25 ± 0,06	0,17± 0,02	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,03 ± 0,003	0,11 ± 0,01	0,49 ± 0,08	28,57 ± 2,24
Gruppe IV ($Ad_{hNIS,}$ 2,0x10^7 pfu)	0,26 ± 0,02	0,13 ± 0,008	0,15 ± 0,003	0,10 ± 0,01	0,14 ± 0,006	0,03 ± 0,002	0,11 ± 0,006	0,60 ± 0,11	47,27 ± 9,31
Kontrollgruppe+ ($Ad_{LacZ,}$ 2,5x10^9 pfu)	0,61 ±0,01	0,17 ±0,00	0,37 ±0,03	0,24 ±0,01	0,36 ±0,01	0,09 ±0,01	0,25 ±0,00	0,72 ±0,22	49,88 ± 18,23
				^{99m}Tc					
Gruppe I ($Ad_{hNIS,}$ 2,5x10^9 pfu)	1,26 ± 0,10	1,31 ± 0,28	1,14 ± 0,04	0,89 ± 0,13	1,13 ± 0,37	0,35 ± 0,08	1,05 ± 0,29	0,95 ± 0,10	37,88 ± 4,64
Gruppe II ($Ad_{hNIS,}$ 5,0x10^8 pfu)	1,17 ± 0,05	0,58 ± 0,19	1,34 ± 0,05	0,93 ± 0,05	1,00 ± 0,17	0,25 ± 0,051	0,45 ± 0,02	1,45 ± 0,60	49,77 ± 5,30
Gruppe III ($Ad_{hNIS,}$ 1,0x10^8 pfu)	0,55 ± 0,07	0,44 ± 0,02	0,73 ± 0,02	0,49 ± 0,05	0,45 ± 0,12	0,07 ± 0,002	0,20 ± 0,01	1,48 ± 0,12	32,34 ± 4,34
Gruppe IV ($Ad_{hNIS,}$ 2,0x10^7 pfu)	0,41 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,42 ± 0,08	0,22 ± 0,03	0,07 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,76 ± 0,10	28,43 ± 1,63
Gruppe V ($Ad_{hNIS,}$ 4,0x10^6 pfu)	0,33 ± 0,04	0,09 ± 0,02	0,70 ± 0,05	0,40 ± 0,07	0,17 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,84 ± 0,07	30,78 ± 7,90
Kontrollgruppe ($Ad_{LacZ,}$ 2,5x10^9 pfu)	0,58 ± 0,09	0,19 ± 0,04	0,77 ± 0,02	0,43 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,03	1,11 ± 0,18	30,79 ± 8,53

Organproben wurden im Gammacounter gemessen, Mittelwerte ± SEM in %ID/g; n=3, * n=1, + n=2

Die Vektordosis zwischen den Gruppen I-V verringert sich jeweils um den Faktor 5 mit max. $Ad_{CMV\text{-}hNIS}$ in 2,5 x 10^9 pfu in der Gruppe I und min. 4,0 x 10^6 pfu in der Gruppe V. Für die Kontrollgruppe wurde der $Ad_{CMV\text{-}LacZ}$ in 2,5 x 10^9 pfu benutzt. Die Gruppe V wurde nur nach ^{99m}Tc Injektion untersucht.

Blutproben

Die Radioioddosis im Blut der Gruppe I liegt auf dem Niveau der Gruppe II und die Nuklidkonzentration der Gruppen III und IV ist um 50% niedriger, wohingegen die Radioioddosis in der Kontrollgruppe mit 0,61±0,01%ID/g 50% größer ist als in der Gruppe I und II.

Die Nuklidkonzentrationen unterscheiden sich deutlich und es ist keine Korrelation zum applizierten Vektor oder der Vektordosis erkennbar.

Die Technetium-Pertechnetat Konzentration im Blut der Studiengruppe I und II unterscheidet sich zu den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe signifikant ($p<0,001$). Jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe I und II und zwischen den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe.

Herzproben

Die Radioiodkonzentration liegt in der Gruppe II um ca. 30% niedriger als in der Gruppe I und ca. 650% höher als in der Gruppe III. Die Radioiodkonzentration in der Gruppe IV ist 25% niedriger und in der Gruppe III 50% höher als in der Kontrollgruppe. So lässt sich eine niedrige Ad_{hNIS} spezifische Nuklidanreicherung in der Gruppe III noch vermuten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität mit dem applizierten Vektor und dessen Dosis korrelieren. Der Unterschied zwischen der Gruppe I und II fällt geringer aus als erwartet und die Radioiodkonzentration der Gruppe IV liegt unterhalb des Kontrollniveaus.

Im Post-Hoc-Mehrfachvergleich unterscheidet sich die Technetiumkonzentration in den Herzproben nach ^{99m}Technetium-Injektion der Studiengruppen I, II und III zu der Gruppe IV und der Kontrollgruppe signifikant ($p<0,03$). Jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe II und III und zwischen den Gruppen IV, V und der Kontrollgruppe. Die Aktivität korreliert mit dem applizierten Vektor und dessen Dosis und ist Ad_{hNIS} spezifisch. Der Unterschied zwischen der Gruppe II und III fällt geringer aus als erwartet.

Die kardiale Nuklidanreicherung ist in der Gruppe I nach i.v. Radioiodinjektion um das 1,7 fache höher als nach i.v. Technetium-Pertechnetat-Injektion und die Radioiodgruppe II liegt mit 1,63%ID/g zu 1,31±0,28%ID/g in der Technetium-Pertechnetat-Gruppe I oberhalb dieser. Hingegen ist die kardiale Technetiumakkumulation im Gegensatz zur Radioiodakkumulation

in der Gruppe III mit 0,44±0,02%ID/g zu 0,25±0,06%ID/g um das 2fache höher und liegt um 130% über dem der Kontrollgruppe.

Nieren- und Leberproben

In den Radioiodgruppen liegt die Nuklidanreicherung in den Gruppen I und II bereits auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Die Akkumulation in den Gruppen III und IV ist 50% niedriger. Es ist keine Korrelation mit dem applizierten Vektor oder der Vektordosis erkennbar.

Nach i.v. ^{99m}Technetiuminjektion unterscheidet sich die Aktivität in den Nierenproben ($p<0,007$) und Leberproben ($p<0,03$) der Studiengruppe I und II zu den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe signifikant ($p<0,03$). Jedoch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe I und II und zwischen den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe.

Damit verhalten sich die Werte ähnlich der Blutwerte und eine sichere Korrelation zur applizierten Vektordosis bzw. Vektortyp ist nicht möglich.

Die Radioiodanreicherung in den Nieren- und Leberproben liegt unterhalb der Blutwerte. Und die Technetium-Pertechnetat-Anreicherung liegt auf dem Niveau der Blutwerte.

Muskelprobe

Die Radioiodakkumulation der Gruppe I ist ca. das 2-fache der Gruppe II und der Kontrollgruppe, welche ihrerseits ca. das 2-fache der Gruppen III und IV sind.

Es ist keine Korrelation mit dem applizierten Vektor oder der Vektordosis erkennbar.

Die Technetium-Pertechnetat Konzentration im Muskel der Studiengruppen I und II unterscheidet sich zu den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe signifikant ($p<0,039$). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe I und II und zwischen den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe. Die Werte liegen unterhalb der Blutwerte.

Es ist keine Korrelation mit dem applizierten Vektor oder der Vektordosis erkennbar.

Lungenproben

Die Radioiodkonzentration in der Gruppe I ist das 2,3-fache als in der Gruppe II, welche mit 0,30%ID/g auf dem Niveau der Kontrollgruppe (0,36±0,01%ID/g) liegt. Die Nuklidanreicherung der beiden Gruppen III und IV ist um 50% niedriger. Die Radioiodkonzentration in der Gruppe I ist mit 0,70%ID/g auf Niveau der Magenakkumulation (0,71%ID/g).

Die Aktivität in den Proben nach i.v. ^{99m}Technetiumapplikation ist in der Gruppe I und II signifikant zu den übrigen Gruppen erhöht ($p<0.044$), wobei sich die Gruppe I und II nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Die Ergebnisse nach Radioiod- und Technetiuminjektion sprechen für eine Ad_{hNIS} spezifische Nuklidanreicherung in der Radioiodgruppe I und den Technetiumgruppen I und II.

Milzproben

Die Radioiodkonzentration in der Gruppe I ist das 2,4-fache der Gruppe II, welche mit 0,36%ID/g oberhalb der Kontrollgruppe (0,25±0,00%ID/g) liegt. Die Nuklidanreicherung der Gruppen III und IV ist um 56% niedriger. Die Radioiodkonzentration in der Gruppe I ist mit 0,87%ID/g oberhalb der Magenakkumulation (0,71%ID/g).

Im Post-Hoc-Mehrfachvergleich unterscheidet sich die Aktivität in den Milzproben nach ^{99m}Technetium-Injektion der Studiengruppe I und II zu den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe signifikant ($p<0,023$). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen III-V und der Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse nach Radioiod- und Technetiuminjektion sprechen für eine Ad_{hNIS} spezifische Nuklidanreicherung in den Gruppen I und II.

Magenproben

Die Radioiodanreicherung in den Magenproben unterscheiden sich mit ca. ±15% nur gering. Das entspricht der Streuung innerhalb derselben Gruppe.

Die Technetiumakkumulation zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppe mit $p=0,383$.

Schilddrüsenproben

Die Radioiodanreicherung der Schilddrüsenproben in der Gruppe III entspricht ca. der Hälfte der übrigen Gruppen.

Die Technetiumakkumulation zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen I-IV und der Kontrollgruppe $p>0,7$.

Zusammenfassung der Biodistribution:

- In Abhängigkeit vom Vektor und dessen Dosis findet sich eine gesteigerte Nuklidanreicherung kardial in den Gruppen I-III.
- Die kardiale Nuklidakkumulation ist in der Gruppe I nach Radioiodinjektion am höchsten mit 2,27%ID/g (1,31+/-0,28%ID/g nach ^{99m}Technetium-Injektion).
- In der Gruppe III ist die kardiale Nuklidanreicherung nach Radioiod gering oberhalb dem Kontrollniveau, wohingegen nach Technetiuminjektion diese gut das 2fache beträgt.
- Die Ergebnisse korrelieren gut mit den in vivo Werten.
- Nur in der Milz und der Lunge kann eine Ad_{hNIS} spezifische Nuklidanreicherung in den Guppen I und II nachgewiesen werden, wobei die Radioiodanreicherung in der Lunge nur in Gruppe I erhöht ist.
- Die Nuklidanreicherung im Magen und der Schilddrüse ist erwartungsgemäß hoch und ohne Korrelation zum applizierten Vektor und dessen Dosis.

3.7 Die Histologie

3.7.1 Der visuelle Vektornachweis

Die Autoradiographie zeigt in den Herzen der Ad_{hNIS}-injizierten Tiere Areale mit spezifischer Traceranreicherung, wohingegen diese Areale in den Herzen der Ad_{LacZ}-injizierten Kontrolltiere fehlen (Abbildung 3-17).

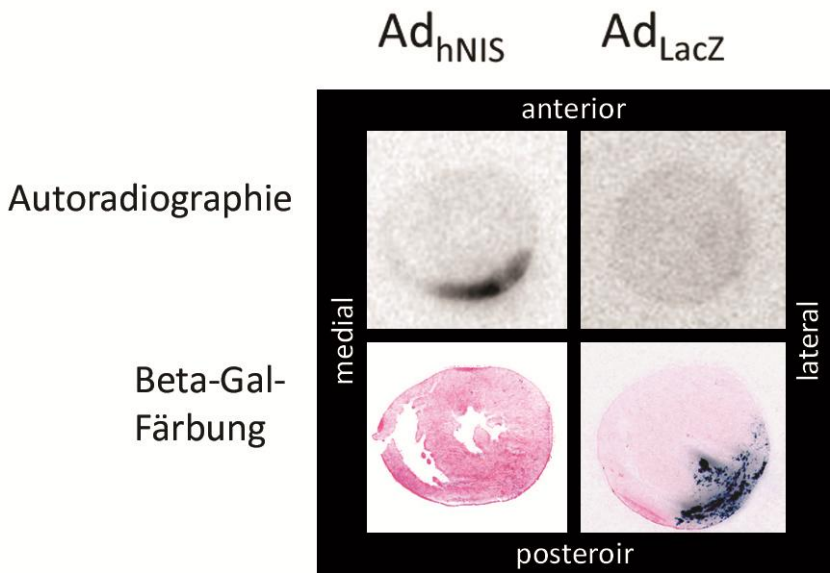


Abbildung 3-17 Koronare Gewebeschnitte von zwei repräsentativen Rattenherzen 33-34 Stunden nach intramyokardialer Ad_{hNIS}- (1,0x10^8 pfu, links) und nach Ad_{LacZ}- (2,5x10^9 pfu rechts) Injektion. In der oberen Reihe sind die Autoradiographiebilder und in der unteren Reihe der dazugehörige H.E Gewebeschnitt nach X-Gal Inkubation zu sehen. 3-4 Stunden vor der Gewebepräparation wurde mit ^{99m}Tc szintigraphiert.

Abbildung 3-17 zeigt benachbarte repräsentative koronare Gewebeschnitte von zwei Rattenherzen, in der oberen Reihe das Autoradiographiebild und in der unteren Reihe die dazugehörige Fotographie nach H.E. Gewebefärbung und X-Gal Inkubation. Die Bilder auf der linken Seite zeigen Gewebeschnitte nach intramyokardialer Ad_{hNIS}- (1,0x10^8 pfu) und auf der rechten Seite nach Ad_{LacZ}- (2,5x10^9 pfu) Injektion. Die Vektoren wurden 34 Stunden vor der Gewebepräparation gespritzt. Es wurde 3,5 Stunden vor der Gewebepräparation mit ^{99m}Tc szintigraphiert.

Auf dem Autoradiographiebild des Ad_{hNIS}-transfizierten Tieres ist im Bereich der lateralen Herzhinterwand eine deutliche Nuklidanreicherung zu sehen, jedoch auf dem dazugehörigen H.E. gefärbten Gewebeschnitt keine β-Gal Färbung. Spiegelbildlich verhält es sich bei dem Ad_{LacZ}-transfizierten Rattenherz. Auf dem Autoradiographiebild ist keine fokale oder spezifische Nuklidakkumulation zu erkennen, jedoch der H.E. gefärbte Gewebeschnitt zeigt das β-Galaktosidase Farbprodukt.

3.7.2 Die Korrelation von Nuklidanreicherung und Vektordosis in der Autoradiographie

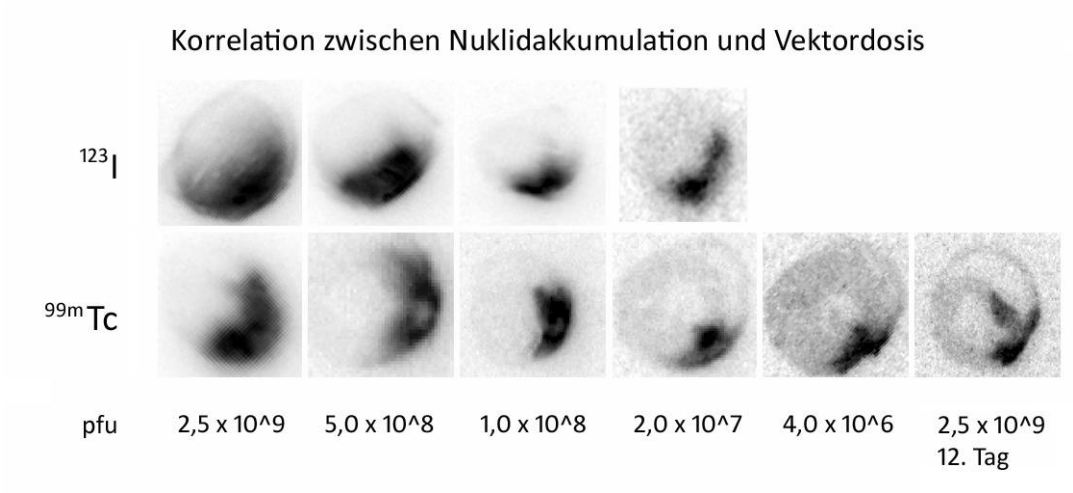


Abbildung 3-18: Autoradiographiebilder koronarer Gewebeschnitte von repräsentativen Rattenherzen für ^{123}I in der oberen Reihe und für ^{99m}Tc in der unteren Reihe. 34 Stunden nach intramyokardialer Injektion von Ad_{hNIS} von links nach rechts mit absteigendem Titer. Die Gewebeschnitte wurden 3-4 Stunden nach Nuklidinjektion gefroren und geschnitten. Das letzte Bild in der unteren Reihe zeigt einen koronaren Gewebeschnitt eines Rattenherzens aus der Zeitverlaufsstudie. Es wurde zuletzt am 12. Tag nach Transfektion mit ^{99m}Tc szintigraphiert und anschließend das Rattenherz präpariert. Belichtungszeit ca. 20 Stunden.

Abbildung 3-18 zeigt Autoradiographiebilder koronarer Gewebeschnitte repräsentativer Rattenherzen 34 Stunden nach myokardialer Injektion des Ad_{hNIS} Vektors in abnehmender Konzentration von links nach rechts (Ausnahme letztes Bildes rechts unten, hier wurde der Vektor in maximaler Dosis bereits 12 Tage vorher injiziert). Die obere Reihe stellt die Autoradiographiebilder nach Szintigraphie mit ^{123}I und die untere mit ^{99m}Tc dar. Die Herzen wurden 3,5 Stunden nach Nuklidinjektion präpariert. Der Autoradiographiefilm wurde für 20 Stunden belichtet.

Die Autoradiographiebilder nach Szintigraphie, sowohl mit ^{123}I, als auch mit ^{99m}Tc zeigen eine fokale Nuklidanreicherung, welche mit abnehmendem Vektortiter sowohl in der

maximalen Konzentration als auch transversalen Ausdehnung abnimmt. Es kann eine fokale Nuklidanreicherung nach Ad_{hNIS}-Infektion mit $2{,}5x10^9$, $5{,}0x10^8$, $1{,}0x10^8$, $2{,}0x10^7$, $4{,}0x10^6$ pfu beobachtet werden. Ebenfalls kann eine fokale ^{99m}Tc-Anreicherung 12 Tage nach Infektion von Ad_{hNIS} in maximaler Dosis von $2{,}5 \times 10^9$ pfu detektiert werden.

Die lokale Nuklidanreicherung zeigt bei höheren Ad_{hNIS} Vektortitern betont unscharfe Grenzen. Am stärksten ist dieser Effekt nach Radioiodszintigraphie in der höchsten Ad_{hNIS}-Dosis Gruppe ($2{,}5x10^9$-pfu)zu beobachten.

In Tabelle 3-11 sind die Mittelwerte für die Studiengruppen I-V, inklusive der Zeitverlaufsstudie, aufgeführt, welche das Verhältnis der maximalen Filmschwärzung im Bereich der Injektionsstelle zum benachbarten Gewebe repräsentieren.

Tabelle 3-11 Autoradiographie Injektionsregion / Hintergrund Quotient

		Tracer	
Studiengruppen Ad_{hNIS}	Zeit nach Opferung [h]	^{123}I	^{99m}Tc
Gruppe I ($2{,}5 \times 10^9$ pfu)	3,5	15,50 ± 0,72	15,32 ± 3,62
Gruppe II ($5{,}0 \times 10^8$ pfu)	3,5	18,81 *	9,99 ± 3,57 +
Gruppe III ($1{,}0 \times 10^8$ pfu)	3,5	17,62 ± 3,03	18,10 ± 0,46
Gruppe IV ($2{,}0 \times 10^7$ pfu)	3,5	7,91 ± 0,13	6,14 ± 1,18 +
Gruppe V ($4{,}0 \times 10^6$ pfu)	3,5	-	2,35 ± 0,64
Zeitverlaufsgruppe ($2{,}5 \times 10^9$ pfu)	3,5	-	2,03 ± 0,66 +

Mittelwerte ± SEM; n=3, + n=2, * n=1.

34 Stunden nach der intramyokardialen Ad_{hNIS}-Injektion beträgt im Mittel der Quotient „injection to remote region“ nach Szintigraphie mit Radioiod für die Studiengruppen I-IV 15,50 ± 0,72, 18,81*, 17,62 ± 3,03 und 7,91 ±0,13. Der Post-Hoc-Mehrfachvergleich nach

Bonferroni zeigt zwischen den Gruppen I-III keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe III und IV unterscheiden sich signifikant mit p=0,026.

Nach Szintigraphie mit ^{99m}Tc betragen die Werte der Gruppen I-V und der Zeitverlaufsstudie-Gruppe im Mittel 15,32 ± 3,62, 9,99 ± 3,57, 18,10 ± 0,46, 6,14 ± 1,18, 2,35 ± 0,64 und 2,03 ± 0,66. Der Post-Hoc-Mehrfachvergleich nach Bonferroni zeigt zwischen den Gruppen I-III keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppe III und IV unterscheiden sich signifikant mit p=0,026.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie gut eignet sich das Natrium Iodid Symporter Gene zur Überwachung einer Genexpression im Rattenherz?

In der dynamischen Szintigraphie bis 2 Stunden nach Nuklidinjektion konnte sowohl nach Radioiod- als auch Technetium 99m-Pertechnetatinjektion eine signifikant höhere Nuklidanreicherung in der Herz ROI der NIS transfizierten Ratten als in der Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Zeitaktivitätskurven in den Schilddrüsen- und Magen-ROI zeigten den zu erwartenden Verlauf ohne Nachweis eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Vektortiter Gruppen der jeweiligen Nuklidgruppe

Die höher der Nuklidanreicherung in der Herz ROI korreliert mit dem applizierten Vektortiter.

Die minimal nötige Vektordosis zur Visualisierung der NIS Expression lag im aktuellen Versuchsaufbau in der Radioiodszintigraphie bei 5,0 x 10^8 pfu und in der Szintigraphie mit Technetium 99m-Pertechnetat bei 1,0 x 10^8 pfu.

In der Szintigraphie mit Technetium 99m-Pertechnetat konnte eine signifikant erhöhte kardiale Nuklidanreicherung vom 1 bis 5 Tag nach Vektorinjektion nachgewiesen werden, welche am 1. Tag p.i. ihr Maximum erreichte.

Die spezifische NIS Inhibition mit Perchlorat-Pertechnetat ließ sich ebenfalls nachweisen.

Die in-vivo Ergebnisse korrelierten gut mit den ex-vivo Ergebnissen.

In der Biodistribution konnte für beide Nuklide in den beiden höchsten Titergruppen (2,5 x 10^9 und 5,0 x 10^8 pfu) eine nachweislich vektorabhängige Nuklidanreicherung (exklusive der Herzproben) in der Lunge und der Milz gefunden werden.

In der Autoradiographie und histologischen Färbung konnte der Kontrollvektor bzw. der NIS Vektor nachgewiesen bzw. eine versehentliche Kontamination ausgeschlossen werden.

Die maximale Nuklidanreicherung in den Autoradiographiebildern korrelierte nicht sehr gut mit den applizierten Vektortitern, welches bei fehlendem Nuklidtrapping in der Zelle auf ein rasches Wash-out zurück zu führen ist.

Somit hat die vorliegende Studie sehr gut die Machbarkeit NIS Genexpression mit konventioneller Szintigraphie Technik zu überwachen gezeigt. Auch eine nicht spezifische Nuklidanreicherung konnte in-vivo und ex-vivo ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse passen zu den Ergebnissen ähnlicher Studien.

4 Diskussion

Die Möglichkeit das Natrium-Iodid-Symporter-Gen auf beliebige Zellen zu übertragen ermöglicht die spezifische Bildgebung und in der Onkologie sogar tumorizide Therapie (19, 36, 85). Zunächst konzentrierte sich die Forschung auf Krebszellen, weil das Iodisotop 131 (^{131}I) neben der Gammastrahlung auch eine Betastrahlung besitzt, welche sich bereits zur tumorziden Therapie einiger Schilddrüsenkrebtypen bewährt hat. Unsere Arbeit zeigt jedoch, dass das Natrium-Iodid-Symporter-Gen auch in der kardiovaskulären Forschung als Reportergen zur molekularen Bildgebung eingesetzt werden kann.

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Die spezifische Nuklidanreicherung durch NIS nach Gentransfer

In der vorliegenden Arbeit konnte zu Beginn der Radioiodszintigraphie eine kardiale Nuklidanreicherung von 6,4 %ID und zu Beginn der Technetiumszintigraphie von 7,7 %ID nachgewiesen werden. Im Gammacounter ergab das für Radioiod eine 2,3%ID/g und für Technetium eine 1,3%ID/g Anreicherung. Es handelt sich um ein Rattenmodell. Die Bildgebung erfolgte ca. 30 Stunden nach intramyokardialer Adenovektorinjektion (AdhNIS in max. 2,5 x 109 pfu).

Es ist möglich, den Verlauf der humanen Natrium-Iodid-Symporter Aktivität durch wiederholte Szintigrafie darzustellen. Bekannter Weise werden die transfizierten Zellen von dem Wirtsimmunsystem eliminiert. Der Adenovektor selbst, der Zytomegalie-Promoter und in der Ratte das artfremde humane Natrium-Iodid-Symporter-Gen rufen eine Immunreaktion hervor und resultieren damit in einer späteren Elimination des Genproduktes. Eine spezifische kardiale Technetiumanreicherung konnte gut bis zum fünften und gerade noch am achten Tag nach AdhNIS-Injektion registriert werden.

Boland et al. (15) untersuchte den adenoviral-vermittelten NIS Gentransfer in Tumorzellen zur zielgerichteten Radioiodtherapie u.a. im Mausmodell. Im Gegensatz zu unserer Studie verwendete er den Natrium-Iodid-Symporter der Ratte rNIS. Der AdrNIS Vektor wurde in einer Konzentration von 2 x 10^9 pfu direkt in den Tumor der Mäuse injiziert. Es resultierte 90 min nach i.p. Nuklidinjektion eine 10,5 %ID/g Radioiodanreicherung im Tumorgewebe

(SiHa[17] und MCF7[18] Zellen), gemessen ex-vivo im Gammacounter. Heltemes et al (39) konnten zeigen, dass der Natrium-Iodid-Symporter der Ratte je nach Gewebe eine 1,3 bis 5,1-fach stärkere Radioiodanreicherung als der Natrium-Iodid-Symporter des Menschen erreicht. Und Mitrofanova et al (61) konnte zeigen, dass das rNIS somit eine deutliche Nuklidreduktion zur erfolgreichen tumorziden Therapie im Mausmodell ermöglicht. Spitzweg et al. (86) konnte erstmals nachweisen, dass es möglich ist, eine therapeutische Radioioddosis nach hNIS Gentransfer auch in Prostatakarzinom Xenotransplantaten im Nacktmausmodell zu erreichen. Sie injizierte den gleichen Vektor wie in unserer Studie, $Ad_{5CMV\text{-}hNIS}$ in die Prostatakarzinom Xenotransplantate. Es resultierte eine in vivo Radioiodanreicherung von 20,2±11,4 %ID in der Szintigraphie. Barton et al (6, 7) untersuchte 2003 die Genexpression nach Injektion des replikationskompetenten $Ad_{yCD/mutTKsr39rep\text{-}hNIS}$[19] und des replikationsinkompetenten $Ad_{CMV\text{-}FlhNIS}$ in die Prostata im Hunde- und Mausmodell. Die Bildgebung erfolgte 4 Stunden nach i.v. ^{99m}Tc Applikation mit der SPECT/CT und der planaren Szintigrafie. Die Genexpression gipfelte am 2. Tag nach Vektorinjektion und konnte am 7. Tag nicht mehr in-vivo festgestellt werden. Die minimal benötigte Vektordosis lag bei $1{,}0 \times 10^8$ vp[20]. Im Vergleich zur nicht infizierten Prostata lag die Nuklidakkumulation um das 3 bis 6 fache höher und im Vergleich zum replikationsinkompetenten Adenovektor um das 3 fache höher. In der in-vivo Bildgebung konnte bereits am 5. Tag nach Injektion des $Ad_{CMV\text{-}FlhNIS}$ keine spezifische Nuklidakkumulation mehr festgestellt werden. In einer folgenden klinischen Phase I Studie untersuchte Barton et al 2008 die Sicherheit und Machbarkeit den Gentransfers durch hNIS Expression am Menschenmodell zu überwachen. Die Ergebnisse sprechen für eine gute Machbarkeit und Sicherheit (6).

Groot-Wassink et al. (34) konnte erstmals im Rattentiermodel mit der PET eine Radioiodanreicherung in verschiedenen Tumorxenotransplantaten von 3,48 bis 7,55 %ID/g Tumorgewebe nachweisen. Der Vektor $Ad_{CMV\text{-}hNIS}$ wurde intravenös in einer Dosis von 1,0 x 107 – 108 gfu[21] injiziert.

In einer anderen Arbeit von K.H. Lee et al (53) erfolgte die $Ad_{hNIS.EGFP}$[22] Injektion nach Sternotomie direkt myokardial (Rattenmodell). Die hNIS Gene Expression wurde ebenfalls durch den Zytomegalie-Virus-Promoter (CMV) reguliert. Die in vivo Bildgebung wurde am 4. Tag (unsere Studie: 2.Tag) nach intramyokardialer Injektion mit der konventionellen Szintigrafie durchgeführt. Im Vergleich zu unserer Studie wurde die 2,5 fache Radioioddosis

---

[17] SiHa Plattenepithelkarzinom der Zervix

[18] MCF7 Adenokarzinom der Mamma

[19] $Ad_{yCD/mutTKsr39rep\text{-}hNIS}$ Replikations kompetenter Adenovektor, welcher für die Hefe Cytosin Desaminase/das mutierte Thymidinkinasegen sr39 und hNIS kodiert.

[20] VP Gesamtheit der Virus Partikel (infektiöse und defekte) Verhältnis vp/pfu beträgt gewöhnlich 20-50:1

[21] GFU Green Fluorescence Units (Einheit der Vektormenge, ähnlich pfu)

[22] $Ad_{hNIS.EGFP}$ Adenovektor, welcher für NIS und EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) kodiert.

pro Gram Körpergewicht injiziert. Die Aufnahmezeit pro Bild war 50% länger und der sensitivere Pinhole-Kollimator wurde verwendet. Quantitativ lassen sich die Ergebnisse nicht vergleichen. Lee et al berechnete die spezifische kardiale Nuklidakkumulation als Quotient aus der Aktivität der kardial zu der mediastinal gelegenen ROI. Der erste Messwert wurde 5 Minuten nach Nuklidinjektion erfasst und als 100% definiert. Der durchschnittliche Radioiodefflux über 180 Minuten nach Nuklidinjektion wird mit 3,3±0,8%/h angegeben, das entspricht ca. 1/9 unserer Werte. Jedoch zeigt die Grafik, dass der Efflux in der ersten Stunde am größten ist und 2 Stunden nach Nuklidinjektion nahezu sistiert. Das Kurvenverhalten ähnelt insgesamt unseren Ergebnissen. In der Pinhole-Szintigraphie konnten Vektordosen von minimal $3x10^6$ pfu nachgewiesen werden. Die szintigraphische Nachweisschwelle liegt um zwei Zehnerpotenzen bzw. $^1/_{300}$ niedriger als in unseren Versuchen. Die Genexpression gipfelte am 4. Tag (unsere Studie: 2. Tag) und es konnte am 9. Tag nach Vektorapplikation keine hNIS Aktivität mit der Szintigraphie in vivo mehr beobachtete werden.

In einer weiteren Arbeit (52) untersuchte K.H. Lee et al die Auswirkung auf die Herzzellfunktion. Es gab keinen Anhalt für eine beeinträchtigte Zellfunktion.

Inubushi et al (46) untersuchten die spezifische kardiale Nuklidanreicherung von 18F-FHBG23 nach Thorakotomie und myokardialer Injektion von AdCMV-HSV1-sr39tk in einer Dosis von $1,0 \times 10^6$ bis 10^9 pfu. Die Bildbebung erfolgte am 3. bis 17. Tag nach myokardialer Vektorinjektion mit der Micro-PET[24]. Die kardiale Nuklidakkumulation gipfelte zwischen dem 3. und 5. Tag. Am 10. Tag nach Vektorinjektion konnte keine spezifische kardiale Nuklidanreicherung mehr beobachtet werden. Der minimal erfassbare Vektortiter lag bei einer Dosis von $1,0 \times 10^7$ pfu.

Miyagawa et al (62) untersuchte im gleichen Versuchsmodell (wie in dieser Arbeit) die Bildgebung mit der ^{124}I PET und verglich die Ergebnisse für den Natrium-Iodid-Symporter mit den Ergebnissen für das HSV1-TK und HSV1-sr39Tk. In den ersten 30 min nach Radioiodapplikation wurde nur ein sehr geringer kardialer Nuklidefflux beobachtet. Ein gleichsinniger Kurvenverlauf wurde in der vorliegenden Arbeit in der Ad_{hNIS} in $2,5 \times 10^9$ pfu Gruppe beobachtet.

Die PET akquirierte kardial eine spezifische Radioiodakkumulation (^{124}I) von ca. 2,5 %ID/mL (Kontrolltiere ca. 0,8 %ID/mL) (unsere Studie 6,4 %ID Körperdosis) bereits in der ersten Aufnahme (10 min p.i.), welche ihr absolutes und relatives Maximum in der vierten Aufnahme (30-40 Minuten) mit ca. 3,6 %ID/ml (Kontrolltiere ca. 0,6 %ID/ml) erreichte und 120 Minuten nach Nuklidinjektion einen Efflux von 22,3±6,9% (unsere Studie: 25±0,06%) aufweist. In der PET lässt sich gegenüber den Kontrolltieren eine um den Faktor 6,88 (unsere Studie: Faktor 2,06) gesteigerte kardiale Nuklidakkumulation feststellen. Die PET ist wesentlich sensitiver und die Szintigrafie ist als 2-dimensionelles Bildverfahren immer ein Summationsbild aus spezifischer und benachbart unspezifischer Aktivität.

---

[23] ^{18}F-FHBG 9-(4-^{18}Fluoro-3-Hydroxymethylbutyl)-Guanin

[24] Micro-PET Kleintier Positron-Emissions-Tomographie

Ricci et al (74) untersuchte wie gut sich der Natrium-Iodid-Symporter als Reporter Gen beim transplantierten Herzen im Rattenmodel eignet. Er verwendete einen Adenovektor, welcher zusätzlich zum hNIS entweder hCEA[25] oder βhCG[26] trug. Die Bildgebung erfolgte mit der SPECT/CT am 5., 10. und 15. Tag postoperativ. Die Transplantatherzen wurden 30 min vor Implantation mit der Vektorlösung perfundiert. Es resultierte eine maximale Nuklidanreicherung von 1,1 bis 1,2 %ID/g ^{123}I am 5. Tag. Eine spezifische Nuklidakkumulation konnte noch am 10. Tag, jedoch nicht mehr am 15. Tag nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich das NIS vor allem gegenüber dem Serummarker βhCG überlegen.

Yang et al (98) konnte im Rattenmodell in der ^{99m}Tc Szintigraphie die Natrium-Iodid-Symporter Aktivität nach Injektion des $Ad_{CMV\text{-}hNIS}$ in einer Dosis von 1,0 x 10^9 pfu, jedoch nicht mehr bei einer Konzentration von 2,0 x 10^8 pfu nachweisen.

4.1.2 Die physiologische Nuklidanreicherung in der Schilddrüse und im Magen

In den dynamischen Aufnahmen über 2 Stunden nach intravenöser Nuklidinjektion zeigte die Iod- und Technetiumanreicherung in der Schilddrüsen und der Magen-ROI bei allen Versuchsgruppen den zu erwartenden Verlauf (1, 23, 70, 87).

Während nach Iod Applikation die Nuklidanreicherung in der Schilddrüse kontinuierlich ansteigt, fällt diese nach Technetium Applikation. Iod wird in den Schilddrüsenzellen metabolisiert und verbleibt im Gegensatz zum Technetium in der Zelle. Im Magen zeigten beide Nuklidgruppen eine deutliche Nuklidanreicherung, welche 2 Stunden nach Injektion ihr Maximum bzw. Plateau noch nicht erreicht hatte. Insgesamt war die Technetiumakkumulation im Magen stärker als die Radioiodakkumulation.

4.1.3 Organbiodistribution

Die Messergebnisse für die Blut- und Schilddrüsengewebeproben weichen von Gruppe zu Gruppe erheblich voneinander ab. Bei dem Studiendesign mit der Gruppengröße n=3 ist das

---

[25] hCEA humanes karkinoembryonisches Antigen

[26] βhCG beta humanes chorionisches Gonadotropin

nicht unerwartet. Die unterschiedlichen Schilddrüsen- und Blutwerte sprechen für eine unterschiedliche Stoffwechsellage der Versuchstiere. Es wurde eine extrakardiale Ad_{hNIS} spezifische Nuklidanreicherung in der Milz und der Lunge in den Ad_{hNIS} Gruppen in 2,5 x 10^9 und 5,0 x 10^8 pfu, jedoch nicht mehr bei 1,0 x 10^8 pfu, beobachtet. Diese korrelierte mit der Vektordosis. Eine nicht Vektor induzierte erhöhte Nuklidanreicherung wurde wie erwartet im Magen und in der Schilddrüse gesehen. Die kardiale Ad_{hNIS} spezifische Nuklidakkumulation korreliert gut mit der applizierten Vektordosis für Radioiod und Technetium Pertechnetat. Die Technetiumgruppen I-III liegen signifikant über dem Kontrollniveau ($p<0.03$). Aufgrund fehlender Gammacounterwerte ist eine statistische Auswertung nach Radioiodapplikation nicht möglich. Im Gegensatz zu den Technetiumgruppen ist die kardiale Radioiodanreicherung in der Gruppe I um das 1,7-fache höher (2,27%ID/g zu 1,31±0,28%ID/g), jedoch in der Gruppe III nur noch gering über dem Kontrollniveau. Diese Ergebnisse decken sich mit den in vivo Werten.

Groot-Wassink (34) und Kollegen injizierten den $Ad_{CMV\text{-}hNIS}$ Vektor intravenös in einer Dosis von 1,0 x 10^7 bis 10^8 gfu über die Schwanzvene im Nacktmausmodell. Den Tieren waren vorher Pankreastumor (HPAF Zelllinie[27]) Xenotransplantate implantiert worden. 48 Stunden nach der Adenovektorapplikation wurde das Nuklid ^{125}I i.v. injiziert und nach 1 Stunde wurden die Tiere für die Biodistributionsstudie geopfert. Die Ergebnisse wurden als %ID/g Gewebe/g Plasma berechnet. In den Kontrolltieren wurde eine erhöhte Nuklidanreicherung nur in der Schilddrüse, im Magen und in der Harnblase gefunden, jedoch in den $Ad_{CMV\text{-}hNIS}$ transfizierten Tieren in der Leber, den Nebennieren, der Lunge, der Milz und dem Pankreas. Die Organnuklidanreicherung war Vektordosis abhängig. Das Pankreas und die Nebennieren haben wir in unserer Studie nicht untersucht. Die erhöhte Nuklidanreicherung in der Leber lässt sich im Gegensatz zur unserer Studie möglicherweise durch die systemische intravenöse Vektorapplikation erklären. Die Ergebnisse für die Lungen- und Milzproben sind mit unseren Ergebnissen gut vereinbar.

Zinn und Kollegen (100) untersuchten die Gewebe Biodistribution nach intravenöser Injektion eines Adenovektor Typ 5, welcher durch ^{99}Tc direkt markiert war, im Mausmodell. Die größte Nuklidanreicherung wurde in der Leber gefunden, welche Vektordosis-abhängig war. In der Lunge, Milz, Niere und im Herz wurden ebenfalls erhöhte Nuklidanreicherungen gefunden.

Alemany und Curiel (2) verglich die Gewebe Biodistribution nach i.v. Vektorinjektion zwischen Ad_{GFPLuc}[28] und $Ad_{GFPLucY477A}$[29] in 5,0 x 10^{10} vp[30] im Mausmodell. Im Gegensatz

---

[27] HPAF Zelllinie Humane mittelgradig differenzierte Pankreaskarzinomzelllinie.

[28] Ad_{GFPLuc} Adenovektor, welcher für das Green-Fluoreszenz-Protein und die Luciferase kodiert.

[29] $Ad_{GFPLucY477A}$ Ad_{GFPLuc} mit funktionsloser CAR Bindungsstelle.

[30] VP Gesamtheit der Virus Partikel (infektiöse und defekte) Verhältnis vp/pfu beträgt gewöhnlich 20-50:1.

zum Ad_{GFPLuc} wurde beim $Ad_{GFPLucY477A}$ die CAR[31] Bindungsstelle funktionslos gemacht. Die PCR lieferte eine erhöhte Genexpression für die GFP und Luc im Herz, in der Lunge, Niere, Milz und Leber. Lediglich im Herz resultierte eine deutlich niedrigere Genexpression nach Transfektion mit dem $Ad_{GFPLucY477A}$.

Weitere Autoren unterstützen diese Ergebnisse (5, 45, 95).

4.2 Histologie

In der Autoradiografie konnte die fokale myokardiale Nuklidakkumulation nach Ad_{hNIS} Injektion dargestellt werden. Diese fehlte bei den Gruppen nach Ad_{LacZ} Injektion. Umgedreht konnte exemplarisch die erfolgreiche LacZ Aktivität mit der histologischen Färbung nachgewiesen werden.

Eine Korrelation der Autoradiographiebilder mit der applizierten Vektordosis ist nur eingeschränkt möglich. Das Autoradiographiebild korreliert mit der Vektordosis nur innerhalb der gleichen Versuchsgruppencharge.

Barton und Kollegen (8) injizierten das replikationskompetente $Ad_{yCD/mutTKsr39rep-hNIS}$ in die Prostata im Hundemodell. 24 Stunden später erfolgte die i.v. Technetium-Pertechnetat Gabe und weitere 2 Stunden später die Opferung, Anfertigung der 100 µm dicken Prostatagewebeschnitte und Belichtung des Autoradiographiefilms. Die Kollegen beobachteten außerhalb der infizierten Areale weitere Areale, welche eine signifikant höhere Nuklidanreicherung zum Hintergrund zeigten und nicht entlang des Injektionspfades lagen.

Haberkorn und Kollegen (37) untersuchten Prostatakarzinomzelllinien in vitro und im Rattenmodell nach hNIS Gentransfer. Sie beobachteten in der in vitro Studie nach Ausstauch des Zellkulturmediums einen 80 prozentigen Iodefflux innerhalb der ersten 20 min. Die in vitro Ergebnisse bestätigen den starken Efflux. Auch in Schilddrüsenkarzinomzelllinien (35) wurde ein ähnlich hoher Iodefflux beobachtet.

In unserer Studie wurde die maximale Schwärzung des Autoradiographiefilms ausgewertet. Aufgrund des starken Iodefflux ist es möglich, dass die Nuklidanreicherung pro Gewebefläche, trotz Infektion mit dem $Ad_{CMV-hNIS}$ in einer höheren Dosis niedriger ausfällt.

---

[31] CAR Cox-Sackie Adenovirus Rezeptor, dieser wird auf verschiedenen Zelloberflächen exprimiert.

4.3 Fazit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich das Gen des Natrium-Iodid-Symporters gut in seiner Funktion als Reporter Gen zur nichtinvasiven Bildgebung von Genexpression im Rattenherzen eignet. Mit einer gewöhnlichen Gammakamera können Aufnahmen gemacht werden, welche eine spezifische Mehranreicherung von Radioiod oder seines analogen Substrates Technetium Pertechnetat im Herzen nach Ad_{hNIS} Transfektion quantitativ nachweisen. Hingegen kann nach intramyokardialer Applikation des Kontrollvirus keine spezifische Nuklidmehranreicherung festgestellt werden. Eine Korrelation zwischen Vektordosis und Signalstärke konnte demonstriert werden. Die spezifische Geninhibition mittels oraler Natriumperchlorat Gabe ist möglich. Der Verlauf der Genexpression konnte bis zum 8. Tag nach Transfektion nachgewiesen werden. Die in vivo Werte korrelieren gut mit den ex vivo Werten. Extrakardial findet sich eine Vektordosis-abhängige Nuklidanreicherung in der Milz und Lunge. Für die Ergebnisse der Autoradiographie wurde die maximale Filmschwärzung pro Pixel beurteilt ohne das Volumen zu berücksichtigen, welche aufgrund des starken Nuklidefflux zu Ergebnissen geführt hat, welche nicht immer mit den applizierten Vektordosen korrelieren.

Die Spezifität und Sensitivität lässt sich in der Szintigrafie durch die SPECT erhöhen. Im Gegensatz zur PET gibt es keine Schwächungskorrektur, möglich wäre dies jedoch mit einem SPECT/CT Gerät (67, 73). Vinay P. et al perfundierte Spenderrattenherzen mit Ad_{hNIS}, transplantierte diese und startet eine SPECT/CT Bildgebung nach ^{123}I Injektion. Die Ad_{hNIS} transfizierten Rattenherzen akkumulierten mit 0,9±0,2%ID/g in etwa das Doppelte wie die Kontrollherzen (0,5±0,14%ID/g).

Müller und Kollegen (64) verglichen die Biodistribution des Luciferase Gens 3 Wochen nach intravenöser Applikation des $AAV_{CMV\text{-}Luc}$[32] und $AAV_{CMVenc/MLC1.5\text{-}Luc}$[33] im Mausmodell. In der $AAV_{cmvenc/MLC1.5\text{-}Luc}$ Gruppe war die Luciferase Expression im Herzen 50 mal höher als im Skelettmuskel oder in der Leber, entsprechend eines erhöhten Kardiotropismus.

Huang und Kollegen (44) konnten in vitro zeigen, dass die Kombination von hNIS und TPO in einem verringertem Iodefflux und in einer erhöhten Iodanreicherung resultiert. Auch Boland und Kollegen (14) konnten dies Ergebnisse bestätigen.

Franz und Kollegen (30) untersuchten die Möglichkeiten der gewebespezifischen Transfektion mit dem Adenovektor. Sie verglichen die Organbiodistribution des

---

[32] $AAV_{CMV\text{-}Luc}$ Adeno-assoziierter Virus, welcher das Luciferasegen unter der Kontrolle des Zytomegalievirus Promoters trägt.

[33] $AAV_{CMVenc/MCL1.5\text{-}Luc}$ AAV Vektor, welcher einen Promoter mit erhöhtem Kardiotropismus trägt.

Luciferasegens mittels der PCR verschiedener Adenovektoren im Rattenmodell. Hierbei handelte es sich um: $Ad_{rsv\text{-}Luc}$, $Ad_{mhc\text{-}Luc}$, $Ad_{mlc\text{-}Luc}$ und Ad_{Luc}[34]. Die Vektoren wurden jeweils in einer Dosis von 2,0 x 10^9 pfu in die Herzhöhle injiziert. Der Adenovektor mit dem Myosin Light-Chain Promoter ($Ad_{mlc\text{-}Luc}$) zeigte im Vergleich zu dem Adenovektor ohne Promoter (Ad_{Luc}) einen erhöhten kardialen Tropismus bei gleichzeitig reduzierter Transfektion der Milz und Lunge. Su H und Kollegen (89) konnten die gute Transfektionsrate bei gleichzeitigem Kardiotropismus bestätigen.

Auch in der Stammzelltherapie (40, 41, 90) kann der Natrium-Iodid-Symporter gut zur nicht invasiven Verlaufskontrolle der Stammzellen eingesetzt werden.

Die durchgeführten Studien haben gezeigt, dass sich das Natrium-Iodid-Symporter Gen im Adenovektor gut zur Bildgebung von Genexpression am Herzen eignet. Außerdem ermöglicht das NIS Reportersystem eine Bildgebung mit einfachen planaren Gammakameras und in der Klinik gewöhnlich verwendetem Radioiod und Technetium Pertechnetat.

Unter der Verwendung des Myosin-Light-Chain Promoters lässt sich der kardiale Tropismus deutlich verbessern sowie die Immunreaktion vermindert. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob der Promoter in Verbindung mit dem NIS Reportersystem eine für die Bildgebung ausreichend starke Genexpression ermöglicht. Nach wie vor muss ein Vektorsystem gefunden werden, welches weder eine Immunabwehr des Wirts hervor ruft noch das Risiko der Mutagenese in sich birgt und auch eine dauerhafte Genexpression ermöglicht. Ein denkbares Verfahren wäre es den Gentransfer in vitro unter kontrollierten Laborverhältnissen, z.B. mit einem Lenti- oder Retrovirus durchzuführen und anschließend die Zellen zu implantieren. Das theoretische Risiko einer Herzrhythmusstörung, welche durch den beim Natrium-Iodid-Symporter vermittelten Natriumeinstrom verursacht werden kann, muss gründlich abgeklärt werden.

---

[34] Ad_{rsv} – Ad_{Luc} Adenovektoren mit verschiedenen Promoters bzw. keinen Promoter (Ad_{Luc}): rsv Rous Sarkom Virus, mhc myosin heavy chain und mlc myosin light chain.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Grundlagenforschung im Bereich der kardialen Molekularbildgebung. Wir analysierten den von der Schilddrüse bekannten Natrium Iodid Symporter hinsichtlich seiner Eignung als sogenanntes Reportergen. Ein Reportergen ermöglicht es einen Effekt auf molekularer Ebene nicht invasiv zu messen. In diesem Fall wurde die Machbarkeit Stärke und Dauer der kardialen Reportergenexpression im Rattentiermodel unter der Verwendung einer gewöhnlichen klinischen Gammakamera darstellen zu können untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass sich das Natrium Iodid Symporter Gen sehr gut als kardiales Reportergen eignet und auch ökonomische Aspekte berücksichtigt werden können, weil die benötigten klinischen Scanner und Nuklide breitflächig und günstig zur Verfügung stehen.

This present study represents a basic research approachment in the field of cardiac molecular imaging. We studied the sodium iodide symporter, which is a known protein of the thyroid, towards its usage as a cardiac reporter gene. With a reporter gene you are able to detect effects on a molecular level non invasively. In this case we studied the feasibility to image signal strength and duration with a clinical gamma camera. The results suggest that the sodium iodide symporter gene suits very well as a cardiac reporter gene and is convenient, because the necessary scanners and radionuclides are widely available and relatively cheap.

6 Literaturverzeichnis

1. Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP. Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene. Clin Endocrinol (Oxf) 49 (4): 517-23, 1998.
2. Alemany R, Curiel DT. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. Gene Ther 8 (17): 1347-53, 2001.
3. Anson DS. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. Genet Vaccines Ther 2 (1): 9, 2004.
4. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. 1944. Mol Med 1 (4): 344-65, 1995.
5. Awasthi V, Meinken G, Springer K, Srivastava SC, Freimuth P. Biodistribution of radioiodinated adenovirus fiber protein knob domain after intravenous injection in mice. J Virol 78 (12): 6431-8, 2004.
6. Barton KN, Stricker H, Brown SL, Elshaikh M, Aref I, Lu M, Pegg J, Zhang Y, Karvelis KC, Siddiqui F, Kim JH, Freytag SO, Movsas B. Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate. Mol Ther 16 (10): 1761-9, 2008.
7. Barton KN, Tyson D, Stricker H, Lew YS, Heisey G, Koul S, de la Zerda A, Yin FF, Yan H, Nagaraja TN, Randall KA, Jin GK, Fenstermacher JD, Jhiang S, Ho Kim J, Freytag SO, Brown SL. GENIS: gene expression of sodium iodide symporter for noninvasive imaging of gene therapy vectors and quantification of gene expression in vivo. Mol Ther 8 (3): 508-18, 2003.
8. Barton KN, Xia X, Yan H, Stricker H, Heisey G, Yin FF, Nagaraja TN, Zhu G, Kolozsvary A, Fenstermacher JD, Lu M, Kim JH, Freytag SO, Brown SL. A quantitative method for measuring gene expression magnitude and volume delivered by gene therapy vectors. Mol Ther 9 (4): 625-31, 2004.
9. Bauer S, Maier SK, Neyses L, Maass AH. Optimization of gene transfer into neonatal rat cardiomyocytes and unmasking of cytomegalovirus promoter silencing. DNA Cell Biol 24 (6): 381-7, 2005.
10. Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J, Atsma DE, Hill JM, Vanderheyden M, Penicka M, Schalij MJ, Wijns W, Bax JJ. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. J Am Coll Cardiol 49 (11): 1137-48, 2007.
11. Bengel FM. Noninvasive imaging of cardiac gene expression and its future implications for molecular therapy. Mol Imaging Biol 7 (1): 22-9, 2005.
12. Bengel FM, Anton M, Avril N, Brill T, Nguyen N, Haubner R, Gleiter E, Gansbacher B, Schwaiger M. Uptake of radiolabeled 2'-fluoro-2'-deoxy-5-iodo-1-beta-D-arabinofuranosyluracil in cardiac cells after adenoviral transfer of the herpesvirus thymidine kinase gene: the cellular basis for cardiac gene imaging. Circulation 102 (9): 948-50, 2000.
13. Bengel FM, Anton M, Richter T, Simoes MV, Haubner R, Henke J, Erhardt W, Reder S, Lehner T, Brandau W, Boekstegers P, Nekolla SG, Gansbacher B, Schwaiger M.

Noninvasive imaging of transgene expression by use of positron emission tomography in a pig model of myocardial gene transfer. Circulation 108 (17): 2127-33, 2003.

14. Boland A, Magnon C, Filetti S, Bidart JM, Schlumberger M, Yeh P, Perricaudet M. Transposition of the thyroid iodide uptake and organification system in nonthyroid tumor cells by adenoviral vector-mediated gene transfers. Thyroid 12 (1): 19-26, 2002.

15. Boland A, Ricard M, Opolon P, Bidart JM, Yeh P, Filetti S, Schlumberger M, Perricaudet M. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. Cancer Res 60 (13): 3484-92, 2000.

16. Byun J, Huh JE, Park SJ, Jang JE, Suh YL, Lee JS, Gwon HC, Lee WR, Cosset FL, Kim DK. Myocardial injury-induced fibroblast proliferation facilitates retroviral-mediated gene transfer to the rat heart in vivo. J Gene Med 2 (1): 2-10, 2000.

17. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim Biophys Acta 1154 (1): 65-82, 1993.

18. Check E. Sanctions agreed over teenager's gene-therapy death. Nature 433 (7027): 674, 2005.

19. Cho JY. A transporter gene (sodium iodide symporter) for dual purposes in gene therapy: imaging and therapy. Curr Gene Ther 2 (4): 393-402, 2002.

20. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. J Virol 80 (21): 10346-56, 2006.

21. Chu D, Sullivan CC, Weitzman MD, Du L, Wolf PL, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors. J Thorac Cardiovasc Surg 126 (3): 671-9, 2003.

22. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. J Nucl Med 43 (9): 1188-200, 2002.

23. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. Nature 379 (6564): 458-60, 1996.

24. Di Pasquale G, Chiorini JA. AAV transcytosis through barrier epithelia and endothelium. Mol Ther 13 (3): 506-16, 2006.

25. Dohan O, Portulano C, Basquin C, Reyna-Neyra A, Amzel LM, Carrasco N. The Na+/I symporter (NIS) mediates electroneutral active transport of the environmental pollutant perchlorate. Proc Natl Acad Sci U S A 104 (51): 20250-5, 2007.

26. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na+/I-symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. J Biol Chem 272 (43): 27230-8, 1997.

27. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. Eur J Endocrinol 141 (5): 443-57, 1999.

28. Forrester JS, Price MJ, Makkar RR. Stem cell repair of infarcted myocardium: an overview for clinicians. Circulation 108 (9): 1139-45, 2003.

29. Franz WM, Breves D, Klingel K, Brem G, Hofschneider PH, Kandolf R. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. Circ Res 73 (4): 629-38, 1993.

30. Franz WM, Rothmann T, Frey N, Katus HA. Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. Cardiovasc Res 35 (3): 560-6, 1997.

31. Gassen HG. Die Suche nach dem richtigen Klon. In: Gassen HG, Minol K, eds. Gentechnik. 4 ed. Stuttgart: Gustav Fischer, pp. 209 - 23, 1996.

32. Gregory SG, Barlow KF, McLay KE, Kaul R, Swarbreck D, Dunham A, Scott CE, Howe KL, Woodfine K, Spencer CC, Jones MC, Gillson C, Searle S, Zhou Y, Kokocinski F, McDonald L, Evans R, Phillips K, Atkinson A, Cooper R, Jones C, Hall RE, Andrews TD, Lloyd C, Ainscough R, Almeida JP, Ambrose KD, Anderson F, Andrew RW, Ashwell RI, Aubin K, Babbage AK, Bagguley CL, Bailey J, Beasley H, Bethel G, Bird CP, Bray-Allen S, Brown JY, Brown AJ, Buckley D, Burton J, Bye J, Carder C, Chapman JC, Clark SY, Clarke G, Clee C, Cobley V, Collier RE, Corby N, Coville GJ, Davies J, Deadman R, Dunn M, Earthrowl M, Ellington AG, Errington H, Frankish A, Frankland J, French L, Garner P, Garnett J, Gay L, Ghori MR, Gibson R, Gilby LM, Gillett W, Glithero RJ, Grafham DV, Griffiths C, Griffiths-Jones S, Grocock R, Hammond S, Harrison ES, Hart E, Haugen E, Heath PD, Holmes S, Holt K, Howden PJ, Hunt AR, Hunt SE, Hunter G, Isherwood J, James R, Johnson C, Johnson D, Joy A, Kay M, Kershaw JK, Kibukawa M, Kimberley AM, King A, Knights AJ, Lad H, Laird G, Lawlor S, Leongamornlert DA, Lloyd DM, et al. The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. Nature 441 (7091): 315-21, 2006.

33. Griscelli F, Gilardi-Hebenstreit P, Hanania N, Franz WM, Opolon P, Perricaudet M, Ragot T. Heart-specific targeting of beta-galactosidase by the ventricle-specific cardiac myosin light chain 2 promoter using adenovirus vectors. Hum Gene Ther 9 (13): 1919-28, 1998.

34. Groot-Wassink T, Aboagye EO, Glaser M, Lemoine NR, Vassaux G. Adenovirus biodistribution and noninvasive imaging of gene expression in vivo by positron emission tomography using human sodium/iodide symporter as reporter gene. Hum Gene Ther 13 (14): 1723-35, 2002.

35. Haberkorn U, Beuter P, Kubler W, Eskerski H, Eisenhut M, Kinscherf R, Zitzmann S, Strauss LG, Dimitrakopoulou-Strauss A, Altmann A. Iodide kinetics and dosimetry in vivo after transfer of the human sodium iodide symporter gene in rat thyroid carcinoma cells. J Nucl Med 45 (5): 827-33, 2004.

36. Haberkorn U, Henze M, Altmann A, Jiang S, Morr I, Mahmut M, Peschke P, Kubler W, Debus J, Eisenhut M. Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells. J Nucl Med 42 (2): 317-25, 2001.

37. Haberkorn U, Kinscherf R, Kissel M, Kubler W, Mahmut M, Sieger S, Eisenhut M, Peschke P, Altmann A. Enhanced iodide transport after transfer of the human sodium iodide symporter gene is associated with lack of retention and low absorbed dose. Gene Ther 10 (9): 774-80, 2003.

38. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 302 (5644): 415-9, 2003.

39. Heltemes LM, Hagan CR, Mitrofanova EE, Panchal RG, Guo J, Link CJ. The rat sodium iodide symporter gene permits more effective radioisotope concentration than the human sodium iodide symporter gene in human and rodent cancer cells. Cancer Gene Ther 10 (1): 14-22, 2003.

40. Higuchi T, Anton M, Dumler K, Seidl S, Pelisek J, Saraste A, Welling A, Hofmann F, Oostendorp RA, Gansbacher B, Nekolla SG, Bengel FM, Botnar RM, Schwaiger M.

Combined reporter gene PET and iron oxide MRI for monitoring survival and localization of transplanted cells in the rat heart. J Nucl Med 50 (7): 1088-94, 2009.

41. Higuchi T, Anton M, Saraste A, Dumler K, Pelisek J, Nekolla SG, Bengel FM, Schwaiger M. Reporter gene PET for monitoring survival of transplanted endothelial progenitor cells in the rat heart after pretreatment with VEGF and atorvastatin. J Nucl Med 50 (11): 1881-6, 2009.

42. Hinkel R, Trenkwalder T, Kupatt C. Gene therapy for ischemic heart disease. Expert Opin Biol Ther, 2011.

43. Hitt M, Bett AJ, Addison CL, Prevec L, Graham FL. Techniques for Human Adenovirus Vector Construction and Characterization. Methods in Molecular Genetics. Vol. 7: Academic Press, Inc, pp. 13-30, 1995.

44. Huang M, Batra RK, Kogai T, Lin YQ, Hershman JM, Lichtenstein A, Sharma S, Zhu LX, Brent GA, Dubinett SM. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. Cancer Gene Ther 8 (8): 612-8, 2001.

45. Hwang do W, Kang JH, Chang YS, Jeong JM, Chung JK, Lee MC, Kim S, Lee DS. Development of a dual membrane protein reporter system using sodium iodide symporter and mutant dopamine D2 receptor transgenes. J Nucl Med 48 (4): 588-95, 2007.

46. Inubushi M, Wu JC, Gambhir SS, Sundaresan G, Satyamurthy N, Namavari M, Yee S, Barrio JR, Stout D, Chatziioannou AF, Wu L, Schelbert HR. Positron-emission tomography reporter gene expression imaging in rat myocardium. Circulation 107 (2): 326-32, 2003.

47. Isner JM. Myocardial gene therapy. Nature 415 (6868): 234-9, 2002.

48. Jacobs A, Tjuvajev JG, Dubrovin M, Akhurst T, Balatoni J, Beattie B, Joshi R, Finn R, Larson SM, Herrlinger U, Pechan PA, Chiocca EA, Breakefield XO, Blasberg RG. Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo. Cancer Res 61 (7): 2983-95, 2001.

49. Kim JM, Lim BK, Ho SH, Yun SH, Shin JO, Park EM, Kim DK, Kim S, Jeon ES. TNFR-Fc fusion protein expressed by in vivo electroporation improves survival rates and myocardial injury in coxsackievirus induced murine myocarditis. Biochem Biophys Res Commun 344 (3): 765-71, 2006.

50. Kotzerke J, Fenchel S, Guhlmann A, Stabin M, Rentschler M, Knapp FF, Jr., Reske SN. Pharmacokinetics of 99Tcm-pertechnetate and 188Re-perrhenate after oral administration of perchlorate: option for subsequent care after the use of liquid 188Re in a balloon catheter. Nucl Med Commun 19 (8): 795-801, 1998.

51. La Perle KM, Shen D, Buckwalter TL, Williams B, Haynam A, Hinkle G, Pozderac R, Capen CC, Jhiang SM. In vivo expression and function of the sodium iodide symporter following gene transfer in the MATLyLu rat model of metastatic prostate cancer. Prostate 50 (3): 170-8, 2002.

52. Lee KH, Bae JS, Lee SC, Paik JY, Matsui T, Jung KH, Ko BH, Kim BT. Evidence that myocardial Na/I symporter gene imaging does not perturb cardiac function. J Nucl Med 47 (11): 1851-7, 2006.

53. Lee KH, Kim HK, Paik JY, Matsui T, Choe YS, Choi Y, Kim BT. Accuracy of myocardial sodium/iodide symporter gene expression imaging with radioiodide: evaluation with a dual-gene adenovirus vector. J Nucl Med 46 (4): 652-7, 2005.

54. Lehrman S. Virus treatment questioned after gene therapy death. Nature 401 (6753): 517-8, 1999.

55. Liu J, Cheng EC, Long Jr RC, Yang SH, Wang L, Cheng PH, Yang JJ, Wu D, Mao H, Chan AW. Noninvasive Monitoring of Embryonic Stem Cells in vivo with MRI Transgene Reporter. Tissue Eng Part C Methods, 2009.

56. Lufino MM, Edser PA, Wade-Martins R. Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. Mol Ther 16 (9): 1525-38, 2008.

57. Mandell RB, Mandell LZ, Link CJ, Jr. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. Cancer Res 59 (3): 661-8, 1999.

58. May D, Gilon D, Djonov V, Itin A, Lazarus A, Gordon O, Rosenberger C, Keshet E. Transgenic system for conditional induction and rescue of chronic myocardial hibernation provides insights into genomic programs of hibernation. Proc Natl Acad Sci U S A 105 (1): 282-7, 2008.

59. Mayr M, May D, Gordon O, Madhu B, Gilon D, Yin X, Xing Q, Drozdov I, Ainali C, Tsoka S, Xu Q, Griffiths J, Horrevoets A, Keshet E. Metabolic homeostasis is maintained in myocardial hibernation by adaptive changes in the transcriptome and proteome. J Mol Cell Cardiol, 2011.

60. Meischl C, Buermans HP, Hazes T, Zuidwijk MJ, Musters RJ, Boer C, van Lingen A, Simonides WS, Blankenstein MA, Dupuy C, Paulus WJ, Hack CE, Ris-Stalpers C, Roos D, Niessen HW. H9c2 cardiomyoblasts produce thyroid hormone. Am J Physiol Cell Physiol 294 (5): C1227-33, 2008.

61. Mitrofanova E, Unfer R, Vahanian N, Link C. Rat sodium iodide symporter allows using lower dose of 131I for cancer therapy. Gene Ther 13 (13): 1052-6, 2006.

62. Miyagawa M, Anton M, Wagner B, Haubner R, Souvatzoglou M, Gansbacher B, Schwaiger M, Bengel FM. Non-invasive imaging of cardiac transgene expression with PET: comparison of the human sodium/iodide symporter gene and HSV1-tk as the reporter gene. Eur J Nucl Med Mol Imaging 32 (9): 1108-14, 2005.

63. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S, Kawaguchi N, Nakamura T, Matsuura N, Matsuda H. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. Circulation 105 (21): 2556-61, 2002.

64. Muller OJ, Leuchs B, Pleger ST, Grimm D, Franz WM, Katus HA, Kleinschmidt JA. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. Cardiovasc Res 70 (1): 70-8, 2006.

65. Nahrendorf M, Sosnovik DE, French BA, Swirski FK, Bengel F, Sadeghi MM, Lindner JR, Wu JC, Kraitchman DL, Fayad ZA, Sinusas AJ. Multimodality cardiovascular molecular imaging, Part II. Circ Cardiovasc Imaging 2 (1): 56-70, 2009.

66. Niu G, Gaut AW, Ponto LL, Hichwa RD, Madsen MT, Graham MM, Domann FE. Multimodality noninvasive imaging of gene transfer using the human sodium iodide symporter. J Nucl Med 45 (3): 445-9, 2004.

67. O'Connor MK, Kemp BJ. Single-photon emission computed tomography/computed tomography: basic instrumentation and innovations. Semin Nucl Med 36 (4): 258-66, 2006.

68. Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. Circ Res 96 (7): 756-66, 2005.

69. Pawlush DG, Moore RL, Musch TI, Davidson WR, Jr. Echocardiographic evaluation of size, function, and mass of normal and hypertrophied rat ventricles. J Appl Physiol 74 (5): 2598-605, 1993.

70. Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T. Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. J Endocrinol 170 (1): 185-96, 2001.

71. Poelzing S, Rosenbaum DS. Nature, significance, and mechanisms of electrical heterogeneities in ventricle. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 280 (2): 1010-7, 2004.

72. Raleigh EA, Lech K, Brent R. Selected topics from classical bacterial genetics. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidmann JG, Smith JA, Struhl K, eds. Current protocolls in molecular biology: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1.4. - 1.4.14., 1989.

73. Rao VP, Miyagi N, Ricci D, Carlson SK, Morris JC, 3rd, Federspiel MJ, Bailey KR, Russell SJ, McGregor CG. Sodium iodide symporter (hNIS) permits molecular imaging of gene transduction in cardiac transplantation. Transplantation 84 (12): 1662-6, 2007.

74. Ricci D, Mennander AA, Pham LD, Rao VP, Miyagi N, Byrne GW, Russell SJ, McGregor CG. Non-invasive radioiodine imaging for accurate quantitation of NIS reporter gene expression in transplanted hearts. Eur J Cardiothorac Surg 33 (1): 32-9, 2008.

75. Riedel C, Dohan O, De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. Journey of the iodide transporter NIS: from its molecular identification to its clinical role in cancer. Trends Biochem Sci 26 (8): 490-6, 2001.

76. Robbins PD, Ghivizzani SC. Viral vectors for gene therapy. Pharmacol Ther 80 (1): 35-47, 1998.

77. Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, et al. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. N Engl J Med 323 (9): 570-8, 1990.

78. Rowland DJ, Cherry SR. Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology. Semin Nucl Med 38 (3): 209-22, 2008.

79. Rutanen J, Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Silvennoinen P, Kivela A, Hedman A, Hedman M, Heikura T, Orden MR, Stacker SA, Achen MG, Hartikainen J, Yla-Herttuala S. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. Circulation 109 (8): 1029-35, 2004.

80. Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. Mol Ther 16 (7): 1189-99, 2008.

81. Shen DH, Kloos RT, Mazzaferri EL, Jhian SM. Sodium iodide symporter in health and disease. Thyroid 11 (5): 415-25, 2001.

82. Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. Iodide uptake and experimental 131I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na+/I- symporter gene. Endocrinology 138 (10): 4493-6, 1997.

83. Sinusas AJ, Bengel F, Nahrendorf M, Epstein FH, Wu JC, Villanueva FS, Fayad ZA, Gropler RJ. Multimodality cardiovascular molecular imaging, part I. Circ Cardiovasc Imaging 1 (3): 244-56, 2008.

84. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium lodide symporter. Biochem Biophys Res Commun 226 (2): 339-45, 1996.

85. Spitzweg C. [The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance]. Internist (Berl) 44 (4): 396-402, 404-8, 410-1, 2003.

86. Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC. In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. Gene Ther 8 (20): 1524-31, 2001.

87. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. J Clin Endocrinol Metab 83 (5): 1746-51, 1998.

88. Spitzweg C, Zhang S, Bergert ER, Castro MR, McIver B, Heufelder AE, Tindall DJ, Young CY, Morris JC. Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. Cancer Res 59 (9): 2136-41, 1999.

89. Su H, Joho S, Huang Y, Barcena A, Arakawa-Hoyt J, Grossman W, Kan YW. Adeno-associated viral vector delivers cardiac-specific and hypoxia-inducible VEGF expression in ischemic mouse hearts. Proc Natl Acad Sci U S A 101 (46): 16280-5, 2004.

90. Terrovitis J, Kwok KF, Lautamaki R, Engles JM, Barth AS, Kizana E, Miake J, Leppo MK, Fox J, Seidel J, Pomper M, Wahl RL, Tsui B, Bengel F, Marban E, Abraham MR. Ectopic expression of the sodium-iodide symporter enables imaging of transplanted cardiac stem cells in vivo by single-photon emission computed tomography or positron emission tomography. J Am Coll Cardiol 52 (20): 1652-60, 2008.

91. Tsunoda S, Mazda O, Oda Y, Iida Y, Akabame S, Kishida T, Shin-Ya M, Asada H, Gojo S, Imanishi J, Matsubara H, Yoshikawa T. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. Biochem Biophys Res Commun 336 (1): 118-27, 2005.

92. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171 (4356): 737-8, 1953.

93. Weig HJ, Laugwitz KL, Moretti A, Kronsbein K, Stadele C, Bruning S, Seyfarth M, Brill T, Schomig A, Ungerer M. Enhanced cardiac contractility after gene transfer of V2 vasopressin receptors In vivo by ultrasound-guided injection or transcoronary delivery. Circulation 101 (13): 1578-85, 2000.

94. Wichter T, Schulze-Bahr E, Eckardt L, Paul M, Levkau B, Meyborg M, Schafers M, Haverkamp W, Breithardt G. Molecular mechanisms of inherited ventricular arrhythmias. Herz 27 (8): 712-39, 2002.

95. Wood M, Perrotte P, Onishi E, Harper ME, Dinney C, Pagliaro L, Wilson DR. Biodistribution of an adenoviral vector carrying the luciferase reporter gene following intravesical or intravenous administration to a mouse. Cancer Gene Ther 6 (4): 367-72, 1999.

96. Wu JC, Chen IY, Sundaresan G, Min JJ, De A, Qiao JH, Fishbein MC, Gambhir SS. Molecular imaging of cardiac cell transplantation in living animals using optical bioluminescence and positron emission tomography. Circulation 108 (11): 1302-5, 2003.

97. Wu JC, Inubushi M, Sundaresan G, Schelbert HR, Gambhir SS. Positron emission tomography imaging of cardiac reporter gene expression in living rats. Circulation 106 (2): 180-3, 2002.

98. Yang HS, Lee H, Kim SJ, Lee WW, Yang YJ, Moon DH, Park SW. Imaging of human sodium-iodide symporter gene expression mediated by recombinant adenovirus in skeletal muscle of living rats. Eur J Nucl Med Mol Imaging 31 (9): 1304-11, 2004.

99. Yue AM, Franz MR, Roberts PR, Morgan JM. Global endocardial electrical restitution in human right and left ventricles determined by noncontact mapping. J Am Coll Cardiol 46 (6): 1067-75, 2005.

100. Zinn KR, Douglas JT, Smyth CA, Liu HG, Wu Q, Krasnykh VN, Mountz JD, Curiel DT, Mountz JM. Imaging and tissue biodistribution of 99mTc-labeled adenovirus knob (serotype 5). Gene Ther 5 (6): 798-808, 1998.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Versuchsaufbau für die direkte myokardiale Injektion unter sonographischer Kontrolle. 23

Abbildung 2-2 B-Mode Ultraschallbild eines Rattenherzens (LV = linke Kammer und LA = linker Vorhof). 23

Abbildung 2-3 Dateneingabe über die Arbeitsmaske der Datenbank. 27

Abbildung 3-1 Ganzkörper Aufnahmen repräsentativer Ratten 0-10, 60-70, und 110-120 Minuten nach i.v. Injektion von ^{123}I oder ^{99m}Technetium 33

Abbildung 3-2 Kardiale Nuklidakkumulationskurve 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I oder ^{99m}Tc. Gruppe I-IV. 34

Abbildung 3-3 Nuklidakkumulationskurve in der Schilddrüse 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I und ^{99m}Tc. Gruppe I-IV. 36

Abbildung 3-4 Nuklidakkumulationskurve im Magen 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). Gruppe I-IV 39

Abbildung 3-5 Thoraxszintigraphien repräsentativer Rattenherzen nach ^{123}Iod oder ^{99m}Tc Injektion. Aufnahmezeitpunkte mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis. 41

Abbildung 3-6 zeigt die ROC Kurven der visuell identifizierbaren spezifischen kardialen Traceranreicherung für ^{123}I und für ^{99m}Tc. 41

Abbildung 3-7 Nuklidakkumulation im Bereich der Herzregion 30h nach Vektorapplikation erfasst. 42

Abbildung 3-8 Kardiale Aktivitätskurve in Prozent injizierter Dose nach sequentieller i.v. ^{99m}Tc Applikation in Tagen bzw. Stunden nach direkter Ad_{hNIS} Vektorinjektion (2,5 x 10^9 pfu). 43

Abbildung 3-9 Thoraxszintigraphien repräsentativer Rattenherzen. 44

Abbildung 3-10 Die Nuklidakkumulation in der Herzregion wurde szintigraphisch 30h nach Vektorinjektion erfasst. 45

Abbildung 3-11 Kardiale Nuklidakkumulationskurve 0-120 min nach Tracerinjektion von ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). 46

Abbildung 3-12 Nuklidakkumulationskurve der Schilddrüse 0-120 min p.i. in der Szintigraphie mit ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). 48

Abbildung 3-13 Nuklidakkumulationskurve des Magens 0-120 min p.i. in der Szintigraphie mit ^{123}I (links) und ^{99m}Tc (rechts). 49

Abbildung 3-14 Kardiale Nuklidanreicherung ca. 3h nach Nuklidinjektion und ca. 30h nach intramyokardialer Vektorinjektion, links für I^{123} und rechts für Tc^{99m} 50

Abbildung 3-15 Korrelationsgraphen der kardialen Nuklidakkumulation für das jeweilige Nuklid. Szintigraphie (%ID) versus Gammacountermessung (%ID).

Abbildung 3-16 Nuklidanreicherung in den jeweiligen Organproben und Studiengruppe, gemessen im Gammacounter ca. 3 Stunden nach Nuklidinjektion und 33-34 Stunden nach Vektorapplikation. 53

Abbildung 3-17 Koronare Gewebeschnitte von zwei repräsentativen Rattenherzen 33-34 Stunden nach intramyokardialer Ad_{hNIS}- (1,0x10^8 pfu, links) und nach Ad_{LacZ}- (2,5x10^9 pfu rechts) Injektion. 59

Abbildung 3-18: Autoradiographiebilder koronarer Gewebeschnitte von repräsentativen Rattenherzen für ^{123}I in der oberen Reihe und für ^{99m}Tc in der unteren Reihe. 60

7.2 Tabellen- und Formelverzeichnis

Formel 1 zur Berechnung der Tracerakkumulation im Organ. 27

Formel 2 zur Kalibrierung der Skalawerte auf die Gesamtaktivität. 28

Formel 3 zur Berechnung der %ID/g Organ. 30

Formel 4 zur Korrektur des Aktivitätszerfalls nach Zeit. 30

Tabelle 3-1 Kardiale Traceranreicherung über den Aufnahmezeitraum von 120 min in %ID 35

Tabelle 3-2 Traceranreicherung in der Schilddrüse 0-120 min nach i.v. Injektion in %ID 37

Tabelle 3-3 Traceranreicherung im Magen 0-120 min nach i.v. Injektion in %ID 39

Tabelle 3-4 Kardiale Traceraufnahme in %ID 42

Tabelle 3-5 Kardiale Aktivität in %ID in der ^{99m}Tc Szintigraphie nach Ad_{hNIS} Infektion 43

Tabelle 3-6 Kardiale Nuklidakkumulation in der Szintigraphie in %ID 46

Tabelle 3-7 Zeitaktivitätsverlauf 0-120 min in der Szintigraphie nach oraler Perchlorat-Gabe (%ID) 47

Tabelle 3-8 Kardiale Nuklidakkumulation gemessen im Gammacounter in %ID 50

Tabelle 3-9 Korrelation in-vivo zu ex-vivo (Herzen) 52

Tabelle 3-10 Biodistribution nach abgeschlossener Szintigraphie in %ID/g 54

Tabelle 3-11 Autoradiographie Injektionsregion / Hintergrund Quotient 61

7.3 Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. Markus Schwaiger und Prof. Bernd Gänsbacher für die Ermöglichung diese Arbeit durchführen zu können.

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Frank Bengel, meinem Doktorvater, bedanken, welcher geduldig wartete.

Ein großes Lob gebührt dem Versuchsteam, Dr. Masao Miyagawa und Bettina Wagner, welches mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Martina Anton bedanken, welche uns bei den Vektoren half.

Und schließlich möchte ich mich auch bei den MTAs und den Mitarbeitern der Forschungsabteilung der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik für die freundliche und zuvorkommende Kooperation bedanken.