

Zusammenfassung

Die Familiäre Hypercholesterinämie ist als monogene Erkrankung ein sehr gutes Modell der Entwicklung leberspezifischer Gentherapie, für die von vielen Arbeitsgruppen adenovirale Vektorsysteme favorisiert werden. In meiner Arbeit wurde zunächst *in vitro* die Funktion des adenoviral unter verschiedenen Promotoren exprimierten LDLR bzw. des VLDLR analysiert sowie die Effekte des Gentransfers in Tiermodellen untersucht.

Bei bisherigen gentherapeutischen Ansätzen wurde die Regulation des Transgens weitestgehend vernachlässigt, was gerade bei der unphysiologischen Überexpression des LDL-Rezeptors zu einer negativen Selektion führen kann. Aus diesem Grunde wurde von Dr. Frank Schnieders (IMBM, Hamburg) ein adenoviraler Vektor konstruiert, der unter der Kontrolle des endogenen Promoters steht. In den von mir durchgeführten Experimenten wurde die Tauglichkeit dieses Vektors für den LDLR Gentransfer *in vitro* untersucht. Die Expression des LDLR wurde mit etablierten Adenoviren verglichen, die das Transgen durch den starken viralen RSV Promoter regulieren. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Zugabe von Sterolen ausschließlich die Expression des LDL-Rezeptors unter der Kontrolle des endogenen Promoters inhibiert und nicht die des RSV regulierten Transgens. Die Funktionalität wurde außerdem in Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv und Fluoreszenz markierter LDL nachgewiesen. Der VLDLR, der normalerweise in Muskel und Fettgewebe exprimiert wird, ist in der Lage, VLDL als Vorstufe der LDL zu binden und die Aufnahme zu vermitteln. Dieser Ansatz ist geeignet, bei völlig fehlendem LDLR Protein oder großen Deletionen eine mögliche Immunreaktion gegen das Transgen *in vivo* zu vermeiden. Es wurde daher das Kaninchen VLDLR-Gen als Transgen in einen adenoviralen Vektor eingesetzt (von Dr. Günther Cichon, MDC Berlin) und Bindungs- und Aufnahmestudien im Vergleich zum LDLR an Zellen durchgeführt. Es konnte eine hohe Expression des VLDLR erreicht werden, ohne jedoch die LDL-Aufnahme zu erhöhen. Die Funktionalität des VLDLR wurde nachgewiesen, da RAP und Chylomikronen Remnants in infizierte Zellen vermehrt aufgenommen wurden.

In Tierexperimenten wurde die hepatische Expression und Funktionalität der adenoviralen Vektoren überprüft. Zu diesem Zweck wurden adenovirale

Vektoren mit dem LDLR als Transgen unter der Kontrolle des RSV und des endogenen Promotor in Mäuse verglichen. In diesen Tieren konnte die Rezeptorexpression mittels Westernblot in den Lebern nachgewiesen werden, wobei keine ausreichenden Mengen zu einer signifikanten Senkung der LDL exprimiert wurden. In WHHL-Kaninchen wurde ebenfalls die Funktionalität der adenoviralen Vektoren analysiert. Die massiv erhöhte LDL-Konzentration war 7-10 Tage nach dem Gentransfer des LDLR vollständig verschwunden, wobei 24 Tage nach Gentransfer die LDL-Konzentration wieder auf den Ausgangswert angestiegen war. Allerdings war zu diesem Zeitpunkt eine 4-5fache Erhöhung der VLDL gegenüber dem Ausgangswert zu beobachten, was auf eine gesteigerte VLDL-Synthese hindeutete. Unabhängig von der Optimierung des Vektors ist die im Kaninchenmodell beobachtete erhöhte VLDL Synthese ein weiteres Problem, das geklärt werden muss, bevor an eine Gentherapie am Patienten gedacht werden kann. Ob der VLDLR mit seiner deutlich vom LDLR unterschiedlichen Ligandenspezifität ein gutes alternatives Transgen in der Gentherapie der Familiären Hypercholesterinämie sein wird, muss auch erst in weiteren tierexperimentellen Versuchen geklärt werden.