

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Direktor: Prof. Dr. med. univ. H. Lippert

Die Möglichkeit des nicht viralen Gentransfers im Zwerchfell *in vivo*

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

vorgelegt

von Morris Beshay, M.B.,B.Ch., FRCS (Ed.)

Magdeburg

2009

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung: Die Möglichkeit des nicht viralen Gentransfers im Bauchfellmuskel *in vivo* – 2009 – 13 Abb.

Genübertragung im Zwerchfell ist besonders interessant für die Korrektur von vererbten Primärmyopathien, wie sie z. B. mit der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) einhergehen. Die vorliegende Studie wurde angelegt, um den Transfer von Reportergenen mittels Elektroporation in das Zwerchfell *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wurden mit männlichen F344 Ratten zwei Gruppen gebildet (n=5). In Gruppe I (Kontrolle) wurde nur Plasmid-DNA injiziert, es erfolgte keine Elektroporation. In Gruppe II schloss sich der Injektion von Plasmid-DNA die Elektroporation an. Zunächst wurde die Unterseite der linken Zwerchfellhälfte über eine 4 cm große mediane Laparotomie erreicht und die DNA-Lösung 1µg/1µl (pNGVL-β-Galaktosidase) 2 – 3 Mal in eine 2 cm² große Fläche injiziert. In Gruppe II wurden die Elektroden auf der injizierten Fläche platziert und die Elektroporation ausgeführt (4pulses, 200V/cm, 20ms). Nach 24 Stunden wurden die Tiere obduziert. Das linke Zwerchfell wurde entfernt und zur Untersuchung der extrinsischen β - Gal- Aktivität sowie zur histologischen Untersuchung mit Haematoxylin und Eosin (H&E) sowie Neutralrot eingefärbt. Während und nach der Elektroporation blieben die Zwerchfellkontraktionen unverändert. Postoperativ erholten sich alle Tiere gut und zeigten keine Zeichen von Unwohlsein oder Atemnot. Die Färbung für die β - Gal Expression wurde beim pH-Wert 7.5 durchgeführt, um eine spontane Expression von β - Gal zu vermeiden, wie sie beim pH-Wert 4 in normalen, nicht transfizierten Zellen vorkommt.

In der behandelten Gruppe (Gruppe II) zeigte die β - Gal- Expression beim pH-Wert 7.5 eine besonders starke Färbung im Zytoplasma der Muskelfaserzellen im behandelten Bereich. In Gruppe I wurde keine extrinsische (pH 7.5) β - Gal- Expression beobachtet. Innerhalb von 24 Stunden konnte eine deutliche Expression von β - Galaktosidase im Zytoplasma durch das externe Plasmid, welches von dem Nukleus aufgenommen wurde, nachgewiesen werden. Die histologische Untersuchung zeigte keine Beschädigung der Muskelfasern auf. Dies ist die erste Beschreibung eines Gentransfers mit nackter Plasmid-DNA in den Bauchfellmuskel mithilfe von Elektroporation *in vivo*. Der *in vivo* Gentransfer von nackter Plasmid-DNA mittels Elektroporation in den Bauchfellmuskel ist möglich.

Schlüsselwörter

Muskeldystrophien

Duchenne- Muskeldystrophie

Elektroporation

Elektrotransfer

Gentherapie

Diaphragma

Tiermodell

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	2
Schlüsselwörter	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
Einleitung.....	9
Morbus Duchenne.....	9
Klinik.....	11
Pathogenese	11
Genetischer Defekt.....	14
Chirurgische Pathologie	15
Therapie	15
Gentransfer	16
Zellmembran und Molekularverkehr.....	17
Das Prinzip des Elektrotransfers	17
Frühe Anwendungen	19
Problemstellung und Ziel dieser Arbeit	21
Studiendesign	23
Tiere und Gruppen.....	23
Expressionsvektoren.....	23
Versuchsprotokoll	24
X- Gal- Färbung	27
Histologie	27
Ergebnisse.....	28
Effizienter DNA-Transfer in die Muskelfasern des Zwerchfells	28
Funktion des Zwerchfells nach Elektroporation.....	30
Muskelschaden	31
Diskussion	32
Die Elektroporation wurde schon in vivo eingesetzt	33
Möglichkeit des in vivo Transfers von nackter Plasmid-DNA in den Zwerchfellmuskel mittels Elektroporation am Nagetiermodell.	33
Der Zwerchfellmuskel eignet sich besonders gut für eine Elektroporation	34
Die Effektivität der Elektroporation ist variabel.....	34

Der Zwerchfellmuskel ist chirurgisch, auch minimal-invasiv, gut erreichbar.....	35
Die Effektivität der Elektroporation könnte intraoperativ mittels Fluoreszenz kontrolliert werden.....	35
Die funktionelle Integrität der Muskulatur muss nach Elektroporation erhalten werden	35
Faktoren der Zellschädigung nach Elektroporation.....	36
Die Elektroporation beeinträchtigt die Zwerchfellfunktion erst bei hoher Elektroporationsreizdauer	37
Die Menge der DNA könnte auch toxisch wirken	38
Eine Optimierung der Protokolle ist vorrangig.....	39
Schlussfolgerung und Ausblick	40
Zusammenfassung	43
Danksagung	45
Darstellung des Bildungsweges.....	46
Erklärung	49
Literaturverzeichnis	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	10
Abbildung 2.....	11
Abbildung 3.....	13
Abbildung 4.....	14
Abbildung 5.....	16
Abbildung 6.....	24
Abbildung 7:.....	254
Abbildung 8.....	265
Abbildung 9.....	266
Abbildung 10.....	286
Abbildung 11.....	298
Abbildung 12.....	299
Abbildung 13.....	31
Abbildung 14.....	31

Abkürzungsverzeichnis

BMD	Becker-Muskeldystrophie
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
XLDC	X-chromosomal-rezessiv dilatative Kardiomyopathie
MDX	Murinen X-chromosomale Dystrophie
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
AAV	Adeno-assoziierte Viren

Einleitung

Die molekulare Einzelheit der biologischen Differenzierung der Muskelzelle ist bereits erläutert worden, dagegen ist wenig über den Muskelzellabbau und die Degeneration, die sogenannte Apoptose, bekannt. Der genaue Ablauf der biologischen Apoptose ist noch zu erforschen. Die Forschung bemüht sich, die genetische Kontrolle der frühen Apoptose und Muskeldegeneration bei Muskeldystrophie zu verstehen. Muskeldystrophien stellen eine Gruppe von primär hereditären Myopathien dar, die mit chronischem und progressivem Verlauf einhergehen. Innerhalb dieser Gruppe werden die Entitäten je nach Vererbungsart, betroffenen Muskelgruppen, Alter bei Ausbruch der Krankheit, klinischem Verlauf und Schweregrad unterschieden. Dank der neuesten Fortschritte der Molekulargenetik kann die Pathogenese der Muskeldystrophien immer besser nachvollzogen werden. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen über die Genübertragung in mehreren Organen durch unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Genübertragung im Zwerchfell ist besonders interessant für die Korrektur von vererbten Primärmyopathien, wie sie z. B. mit der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) einhergehen. Die vorliegende Studie wurde angelegt, um den Transfer von Reportergenen mittels Elektroporation in das Zwerchfell in vivo zu untersuchen.

Morbus Duchenne

Die Duchenne-Muskeldystrophie ist eine X-chromosomal rezessive Erkrankung, die nur Jungen betrifft. Sie ist eine der häufigeren Formen der Muskeldystrophien mit fatalem Ausgang. Ungefähr eine von 3500 männlichen Personen erkrankt an einer

DMD. Duchenne berichtete 1868 über die juvenile Form der vererbaren Muskeldystrophie. In seinen Veröffentlichungen verwendet Duchenne Ausdrücke wie *paralysie musculaire pseudohypertrophique* und *paralysie myosclerosique*, um die Erkrankung zu klassifizieren, welche innerhalb der neuromuskulären Anatomie auftritt und nicht im Zusammenhang mit Kindheitsmyopathien steht, welche aus bulbären Funktionsstörungen entstehen. Seine erste klinische Beobachtung machte er 1858, als er einen Patienten seines Freundes Bouvier untersuchte. 1861 veröffentlichte er die Fälle zweier Brüder und deren Mutter.



Abbildung 1

Originalfotos aufgenommen von Duchenne: eine Mutter (links) mit ihren zwei Söhnen (Mitte und rechts), die beide die Gesichtsparese und Eversion der Unterlippe (Mitte unten) aufweisen, welche oftmals typisch für eine pseudohypertrophische Form der DMD im frühen Stadium sind. Der junge männliche Patient rechts zeigt typische Zeichen einer proximalen Amyotrophie.

Schematische Darstellung der Anordnung des menschlichen Duchenne-Muskeldystrophie (DMD)- Proteins. Die identifizierbaren Bereiche der Cystein-reich (CR)-Region und der COOH- Terminus (CYS) des Dystrophins sind identifiziert. Dies sind die WW domain, die EF hands, die ZZ domain und die paired coiled-coil (CC). Die vier proline-rich hinge regions sind mit 1 - 4 aufgeführt. Die Bindungsstellen für α -Dystroglycan (DG), Syntrophin (SYN) und die Bindestelle für die Dystrophinfamilie (DFB) sind für jedes Protein dargestellt (gepunktete Linie) (reproduziert nach¹).

Dieses große Protein bildet den integralen Teil der Skelettmuskelzellmembran und dessen Mangel verursacht einen Zufluss von extrazellulären Kalzium-Ionen, was die komplette Zerstörung der Muskelzelle zur Folge hat.

Zusammen mit Dystroglykan und Sarkoglykan bilden Dystrophin und dessen Partner den Dystrophin- assoziierten Glukoprotein-Komplex (DGC)². An seiner COOH-Endung verbindet sich Dystrophin mit einer Reihe von integralen und peripheralen Membranproteinen, die auch als Dystroglykan-, Sarkoglykan- Sarkospan- und Cytoplasma-Subkomplex bezeichnet werden. Der Cytoplasma-Subkomplex besteht aus Syntrophinen (syn) und α -Dystrobrevin (α DB). Der Sarkoglykan-Sarkospan-Subkomplex umfasst die Sarkoglykane ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) und das Sarkospan. Der extrazelluläre Bestandteil des Dystroglykan- Komplexes, α -Dystroglykan (α DG), verbindet sich mit Laminin-2 in der extrazellulären Matrix und mit β -Dystroglykan (β DG) im Sarkolemma. Das β -Dystroglykan wiederum verbindet sich mit dem Dystrophin und somit ist die Verbindung zwischen dem Aktin- basierten Zytoskeletton und der extrazellulären Matrix vervollständigt.

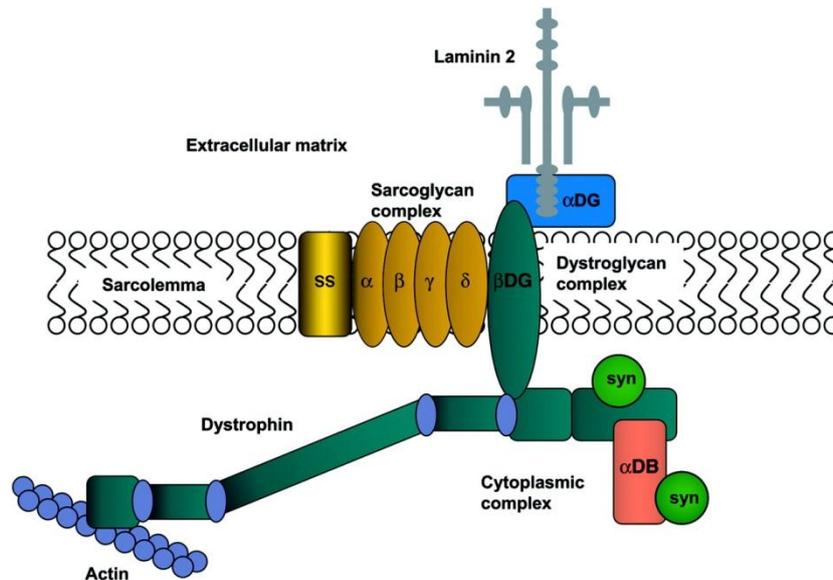


Abbildung 3

Der Dystrophin- assoziierte Proteinkomplex (DPC) in der Skelettmuskulatur (reproduziert nach¹).

Der DGC stabilisiert das Sarcolemma während der Muskelkontraktion [Übersicht in³] und fungiert als kritisches Zentrum für verschiedene Signalübertragungsbahnen [Übersicht in⁴].

Die anatomische Eigenschaft der Kontraktionseinheit der Skelettmuskulatur sieht wie folgt aus:

- Die synzytialen Muskelzellen haben mehrere Kerne.
- Bei Mangel oder fehlendem Dystrophin entwickelt der Skelettmuskel eine gleiche oder geringere als die normale Dehnungsspannung (^{5, 6}).
- Dystrophin konzentriert sich am Costamer (^{7, 8, 9, 10}). Costamere sind Vinculinreiche, subsarkolemmale und rippenähnliche Strukturen. Sie verankern die Z-line am Sarkolemm und stellen somit eine mechanische Verbindung zwischen den kontrahierenden Myofibrillen und der extrazellulären Matrix her [Übersicht in¹⁰].

Genetischer Defekt

Der genetische Defekt befindet sich am kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp21.2)¹¹ und betrifft ein großes Gen (2.5. Mb), welches das Protein Dystrophin kodiert, d. h. 7 Proteinisoformen¹².

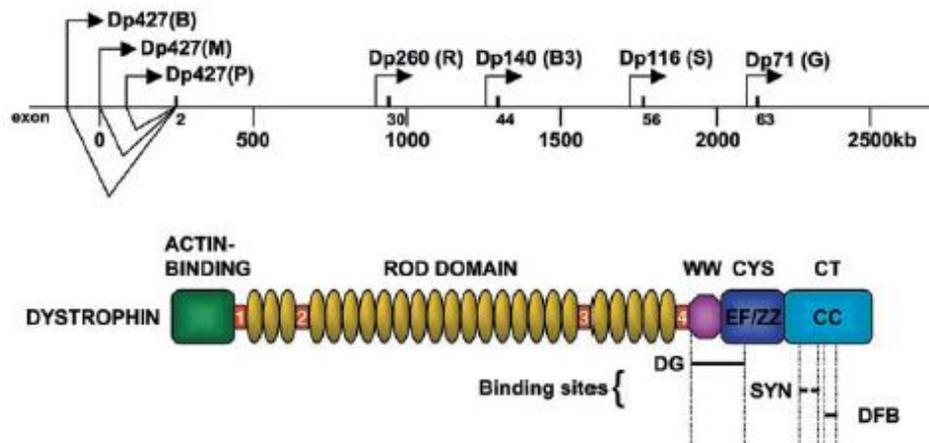


Abbildung 4

Die gesamte Länge der Dystrophintranskripte wird durch Promoter (durch Pfeile gekennzeichnet) am 5'-end des Gens transkribiert. Jede mRNA kodiert ein 427-kDa-Protein, welches lediglich in seinen NH₂-Terminalsequenzen unterschiedlich ist. Die drei Produkte werden als Dp427 (B), Dp427 (M) und Dp427 (P) bezeichnet, um ihre gewebespezifischen Expressionsmuster wiederzugeben; B steht für Gehirn (brain), M für Muskel und P für zerebelläre Purkinje-Zellen. Die kleineren Isoformen werden von distal lokalisierten Promotoren in der Retina (R: Dp260), im Gehirn (B3: Dp140) oder in den Schwann-Zellen (S: Dp116) exprimiert oder aber sie werden allgemein (G: Dp71) überall exprimiert (reproduziert nach¹).

Die Duchenne- Muskeldystrophie (DMD) entsteht aufgrund eines totalen Dystrophin-Mangels, die Becker- Muskeldystrophie (BMD) aufgrund einer verminderten Proteinexpression und/ oder einer Expression eines verkürzten, aber teilweise funktionalen Proteins^(13, 14), und die X-Chromosomale rezessiv dilatative Kardiomyopathie (XLDC) wird durch einen Dystrophinmangel im Herz (sowie in allen anderen Muskelzellen) verursacht^(15, 16). Nicht nur Deletionen, sondern auch

Duplikationen (ca. 10%) oder Punktmutationen (ca. 30%) sind für eine DMD/BMD verantwortlich¹⁷.

Chirurgische Pathologie

Zu den wichtigsten pathologischen Merkmalen zählt die fehlende Regeneration von Muskelfasern, die dazu führt, dass die Myofasern durch Fett- und Fibrosegewebe ersetzt werden. In der Biopsie des Muskels zeigen sich dann Fasernekrose, Myophagie und Endomyosialfibrose. Große, hyalinisierte hypereosinophile Fasern und hyperkontrahierte Fasersegmente werden innerhalb der Faszikel verstreut. Zu einer Entzündungsreaktion kommt es außer in den verstreuten Nekrosefasern nicht. Die Immunhistochemie des Dystrophins zeigt sowohl im Patienten als auch im Träger eine defekte Färbung des Proteins in der Sarkolemm-Membran. Die drei verfügbaren Dystrophin-Antikörper kennzeichnen die Epitope am Amino- (NH₂-) Terminal, die sog. „Mid-rod-“ Domäne in der Mitte und den Carboxyl- (COOH-) Terminus des Proteins. Bei Mutationsträgern stellt man eine verminderte Immunreaktivität im Sarkolemm auf ein oder mehrere Dystrophine fest, diese Immunreaktivität verschwindet vollständig in Biopsien von Patienten. Bei der Muskelbiopsie sind Nekrosen unbedingt zu vermeiden, da die dystrophische Immunreaktivität aufgrund des zerstörten Sarkolemmes auch bei Gesunden verschwindet¹⁸.

Therapie

Die derzeitige Behandlung der DMD ist nur symptomatisch und die Muskelfunktion kann nicht wiederhergestellt werden. Die verfügbare Therapie ist also nicht zufriedenstellend und es wird in der Forschung aktiv nach Alternativen gesucht. Eine potentielle Heilungsmöglichkeit bestünde darin, das normale Dystrophin-Gen in den

erkrankten Muskeln wieder einzusetzen. In verschiedenen Tierversuchen wurde bereits die Möglichkeit eines direkten Gentransfers in den Muskel untersucht mit dem Ziel, eine Therapiemöglichkeit daraus zu entwickeln. Ziel solcher Gentransfers ist es, das Gen in effizienter Weise und mit minimaler Toxizität in die gewünschte Zelle zu transferieren¹⁹.

Gentransfer

Über die letzten Jahre haben Tierstudien die experimentelle Basis der Gentherapie von vererbaren Primärmyopathien, wie z. B. DMD, BMD und XLDC, geschaffen. Mit Hilfe von Viralvektoren^{20,21} und Plasmid-DNA^{22,23} konnten Reportergene und vollständig lange oder verkürzte Myodystrophin-Gene erfolgreich in die Hinterlaufmuskeln einer Maus implantiert werden.

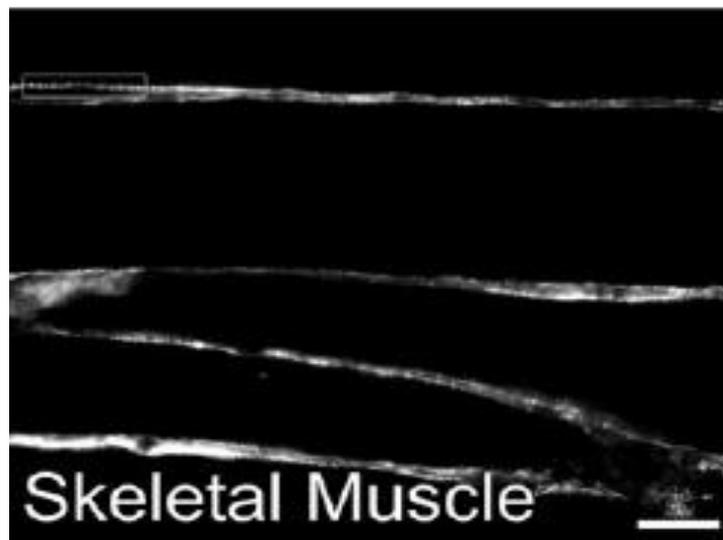


Abbildung 5

Um die Mikrodystrophinexpression in der Skelettmuskulatur zu untersuchen, wurde einer 2 Monate alten MDX-Maus ein AAV-Virus als Träger des Mikrogens in die Beinmuskulatur injiziert. Drei Monate später wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Mikrodystrophin zeigte ein gepunktetes Färbungsmuster im Skelettmuskel. Maß: 20 μm . (reproduziert nach²⁴)

Obwohl die Ergebnisse sehr ermutigend sind, besonders mit adenoviralen Vektoren, ist ein solcher Transfer immer noch zu ineffizient, um beim Menschen angewendet zu werden. Zwar rufen die adenoviralen Vektoren eine vorübergehend robuste Expression an den Injektionsstellen im Muskel hervor, jedoch wurde bisher weder eine nachhaltige Expression noch eine Ausbreitung der Expression beobachtet. Außerdem schränken die immunologischen und inflammatorischen Wirkungen der viralen Vektoren deren Anwendung ein. Injiziert man nur Plasmid-DNA, kann kein ausreichender Transfer erzielt werden, da die Makromoleküle nicht in der Lage sind, die zytoplasmische Membran zu überwinden.

Zellmembran und Molekularverkehr

Die Zellmembran kontrolliert den Molekülaustausch zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Raum. Nur wenige lipophile Moleküle sind in der Lage, entweder die Lipid-Doppelschicht der Membran zu durchdringen oder über spezifische Transportsysteme in die Zelle zu gelangen. Hingegen können die meisten hydrophilen Moleküle nicht in die Zelle gelangen.

Das Prinzip des Elektrotransfers

Die Elektroporation (Synonym: Elektrotransfer) ist ein physikalisches Verfahren zum Gentransfer, bei dem durch kurze Elektropulse durchgängige „Poren“ in der Zellmembran entstehen, durch die dann Makromoleküle wie z. B. DNA oder Proteine in der Zelle aufgenommen werden können. Seit Neumann²⁵ zum ersten Mal über die Anwendung von Strom zum Transfer von Molekülen in die Zellen berichtete, ist die Elektroporation bei der *in vitro*-Anwendung zur Routine geworden. Durch Sein Modell wurde die Grundaktion der Elektroporation an der Zellmembran erklärt²⁶

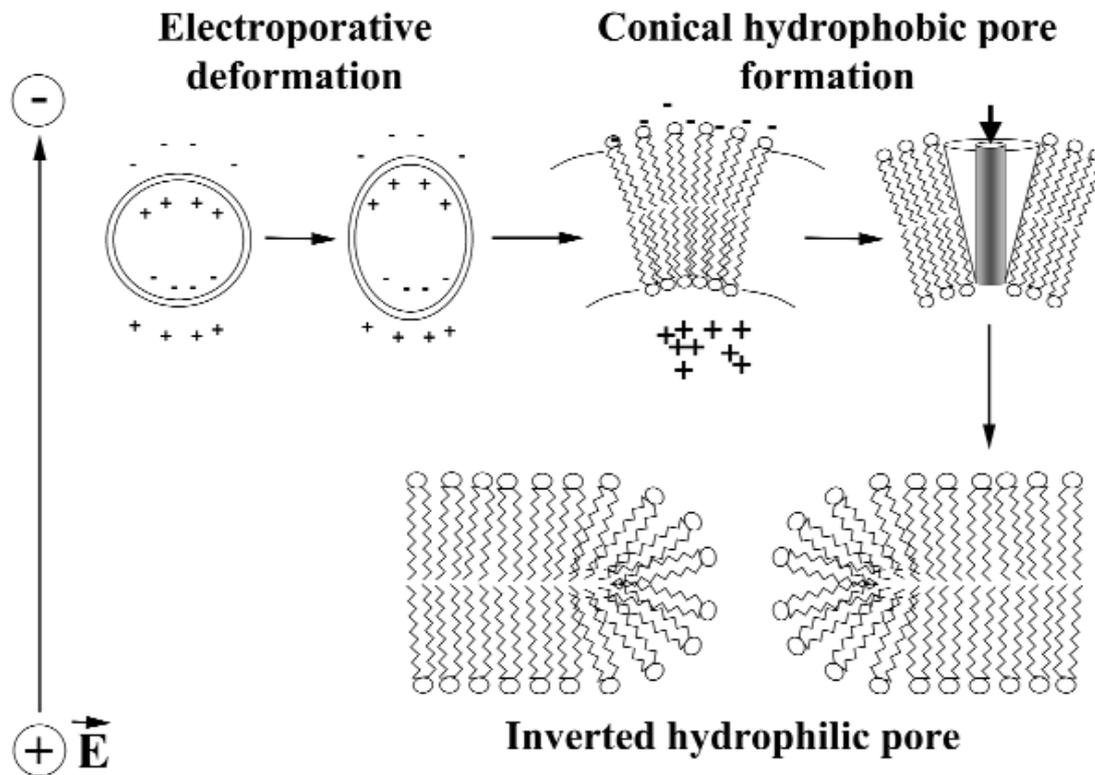


Abbildung 6

Neumann Model für Eelectroporative Wirkung durch möglicherweise Veränderung der Verteilung die Ionen an der inneren Seite der Zellmembran.

In jüngster Zeit gab es mehrere vielversprechende und erfolgreiche Studien, in denen unter Anwendung der Elektroporation ein *in vivo* Gentransfer in andere Organe wie z. B. Leber²⁷, Cornea²⁸ oder Skelettmuskel²⁹ durchgeführt wurde.

Der eigentliche Mechanismus des Elektrotransfers konnte bis jetzt noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Übersicht in³⁰) und die molekularen Mechanismen, die dem *in vivo* DNA- Elektrotransfer zugrunde liegen, werden immer noch kontrovers diskutiert. Wahrscheinlich handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, welcher aus folgenden Etappen besteht:

- DNA-Injektion und -Verteilung,
- Zelldurchlässigkeit,
- DNA-Transfer durch Elektrophorese
- Möglicherweise passive Verbreitung durch Defekte in der Membran, die durch die Elektropulse entstanden sind.

Könnte man die Details und Faktoren jeder einzelnen Stufe dieses komplexen Prozesses erschließen, wäre man in der Lage, effektivere Elektrotransferstrategien zu entwickeln.

Frühe Anwendungen

Dieses Verfahren wurde erstmals in den 1990er Jahren an lebenden Tieren angewendet. Die erste relevante in vivo Anwendung stellte die zelluläre Aufnahme des antibiotischen und chemotherapeutischen Zytostatikums Bleomycin³¹ in Tumoren dar. Durch die Verwendung von Elektropulsen auf den Tumor konnte das Bleomycin besser eindringen, was eine höhere Zytotoxizität zur Folge hatte. Seitdem wurde diese Technik der Elektrochemotherapie²⁹ in klinischen Studien auch mit Cisplatin, einem anderen Zytostatikum, bei menschlichen malignen Hautmetastasen des Melanoms³² und bei Hautläsionen des Mammakarzinoms³³ angewendet.

Neben der Elektrochemotherapie hat sich der elektropulsgestützte Plasmid- DNA-Transfer schnell zu einem vielversprechenden Verfahren entwickelt, welches als in vivo DNA-Elektroporation oder Elektrotransfer bezeichnet wird^{34, 35, 36, 37}. Beim Elektrotransfer erfolgt die Injektion der DNA in gezieltes Gewebe und anschließend wird dieses Gewebe mit einer bestimmten Menge an Elektropulsen bearbeitet.

Dieses Verfahren kann in jedem Gewebe angewendet werden, wobei sich die Skelettmuskulatur besonders gut eignet.

Problemstellung und Ziel dieser Arbeit

Obwohl der molekulare Defekt bei der DMD bereits vor zwei Jahrzehnten entdeckt worden ist, gibt es immer noch keine effektive Behandlung zur Bremsung des unerbittlichen Fortschreitens der Krankheit. Grund für das Fehlen von effektiven Therapiekonzepten sind zum Einen die Schwierigkeiten, die mit dem Ersetzen und Reparieren des erkrankten Gens einhergehen und zum Anderen die Vielschichtigkeit der Symptome, welche von Degeneration der Muskelfasern bis zur Beeinträchtigung der Immunresponse reichen. Diese Vielzahl an verschiedenen Schwierigkeiten und Fakten verhindern die Entwicklung von Therapien, mit denen der Molekulardefekt korrigiert oder zumindest das Überleben der Muskelzellen gefördert werden könnte.

Die fünf wichtigsten Komponenten zur Entwicklung einer effektiven Gentherapie bestehen aus:

- dem Gen,
- dem Vektor,
- der Vektorübertragung,
- dem Zielgewebe und
- adäquaten Tiermodellen.

Eine sichere und effektive Methode zur Übertragung von DNA *in vivo* ist eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung von Gentherapien. Es hat sich erwiesen, dass der *in vivo* DNA-Elektrotransfer die effizienteste und einfachste Methode unter den derzeit erforschten nonviralen Übertragungsmethoden ist. Diese Technik kann bei fast allen Gewebearten beim lebenden Tier angewendet werden, einschließlich Tumoren, Haut, Leber, Niere, Arterie, Retina, Cornea und Gehirn. Die

Skelettmuskulatur eignet sich besonders gut für die DNA-Elektroporation, da sie großflächig, gut durchblutet und für i. m. Injektionen sehr gut zugänglich ist. Außerdem verfügt dieses Gewebe über gute Kapazitäten für die Proteinsynthese, hat einen sehr niedrigen Turnover und kann Plasmid nach intramuskulärer Gabe gut aufnehmen (Übersicht in³⁸).

Da die Ateminsuffizienz eine der häufigsten Todesursachen bei DMD ist, scheint der Transfer von therapeutischen Mitteln in das Diaphragma von besonderer Bedeutung zu sein. Beim Diaphragma handelt es sich um Skelettmuskulatur und es wurde bereits gezeigt, dass ein Gentransfer in Skelettmuskulatur möglich ist (Übersicht in ³⁸). Die Möglichkeit eines Gentransfers in das Diaphragma wurde jedoch noch nie direkt nachgewiesen.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die Möglichkeit eines Gentransfers mit Elektroporation in die Zwerchfellmuskulatur zu untersuchen.

Material und Methoden

Studiendesign

Es handelt sich um eine experimentelle in vivo Studie am kleinen Tiermodell (Nagetier). Diese Studie wurde am 19. August 2002 durch die Kommission für Tierforschung im Kanton Bern (Schweiz) mit der Nummer 19/02 genehmigt.

Tiere und Gruppen

Zehn ausgewachsene männliche F344-Ratten (Harlan Holland Gewicht 220-240 g) wurden in zwei Gruppen geteilt.

- Gruppe I: (5 Tiere) als Kontrollgruppe, es erfolgte keine Elektroporation nach der Plasmid-DNA-Injektion,
- Gruppe II: (5 Tiere) als Behandlungsgruppe; es erfolgte die Elektroporation nach der Plasmid-DNA-Injektion.

Expressionsvektoren

pNGVL- β Gal wurde ursprünglich im National Gene Vector Laboratory (University of Michigan, USA) in einem Hauptketten-Plasmid-pNGVL konstruiert, welches einen Zytomegalie-Virus-Promoter, ein β Galaktosidasegen und ein Kanamycin-Selectiongen enthält. Unser Plasmid pCMV-lacZ (β -Galaktosidase-Expression) wurde im Auftrag (Plasmid Factory GmbH & Co, Bielefeld, Germany) hergestellt und purifiziert.

Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert, dann mit Wasser aufgelöst und bis zum Gebrauch bei – 80 °C gelagert. Die Quantität und Qualität des Plasmids wurden mit Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm sowie Gel-Elektrophorese (Agarosegel 1 %) bemessen.

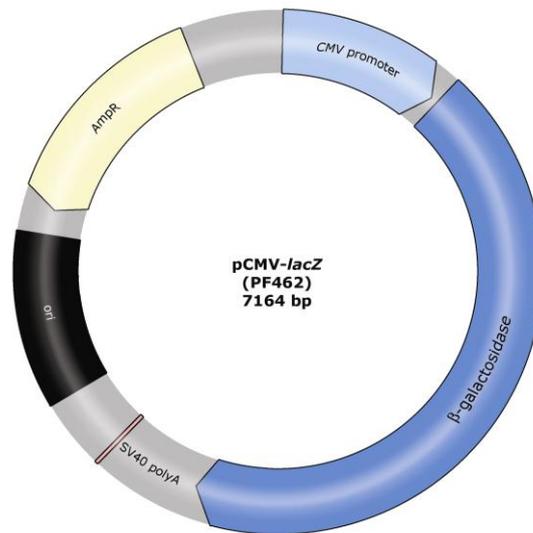


Abbildung 7

Das Plasmid pCMV-lacZ ist 7164 Basenpaare groß und enthält ein lac2-Reporter-Gen unter Kontrolle eines Zytomegalie-Virus (CMV) -Promoters.

Versuchsprotokoll

Beim in vivo Elektrotransfer wird eine Plasmidlösung, welche mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl, 150 mM) gemischt ist, mit einer Spritze in den Skelettmuskel injiziert und anschließend werden mit Hilfe von zwei Elektroden, die an beiden Seiten der Injektionsstelle platziert werden, Elektropulse auf das Gewebe übertragen (als Elektroden können Nadeln oder Platten dienen). Was die elektrischen Parameter betrifft, gibt es unterschiedliche effiziente Protokolle, die von verschiedenen Gruppen veröffentlicht wurden: entweder Niederspannung (100- 300 V), Langimpuls (4- 50 ms)³⁹ oder Hochspannung (400 - 1200 V/cm), Kurzzeitimpulse (95 - 300 μ s)⁴⁰. Da die elektrischen Parameter stark von der Übertragungsmethode abhängig sind, stehen zahlreiche verschiedene Protokolle zur Verfügung⁴¹.

In unserem Versuch wurden die erwachsenen, männlichen F344- Ratten zuerst in einer Glaskammer mit Halothan 4 % (Sigma, Buchs, Schweiz) anästhesiert und dann mit einer intraperitonealen Injektion von Natriumpentobarbital, 50 mg/kg narkotisiert. Die Unterseite der linken Zwerchfellhälfte wurde im Anschluss über eine 4 cm große Laparotomie freigelegt.

Während der Rippenbogen an der linken Hälfte des Zwerchfells hochgehalten wurde, wurden 100 μ l DNA- Lösung (1 μ g/ μ l) in eine 2 cm² große Fläche in der Zwerchfellmuskulatur, genauer gesagt, zwischen die Unterseite des Muskels, das darüberliegende Epimysium und das Peritoneum, injiziert. Die Injektion erfolgte unter einem chirurgischen Mikroskop mit einer 1 ml TB- Spritze und einer 30 GA Nadel. Die Nadel wurde mit der Öffnungsseite vom Muskel weg eingeführt, bis der gesamte abgeschrägte Teil in die Faszie eingedrungen war.



Abbildung 8

Die DNA-Lösung wird intramuskulär durch eine mediane Laparotomie bei den Versuchsratten injiziert.

Dieses Muskelareal wurde mit Prolene 6/0 Ligaturen gekennzeichnet. In Gruppe II wurden daraufhin die Elektroden an jeweils beiden Seiten der Injektionsstelle

platziert und die Elektropulse appliziert (4 pulses 200 V/cm in einem Zeitintervall von 20 ms). Die Elektroporation wurde am Monitor überwacht.

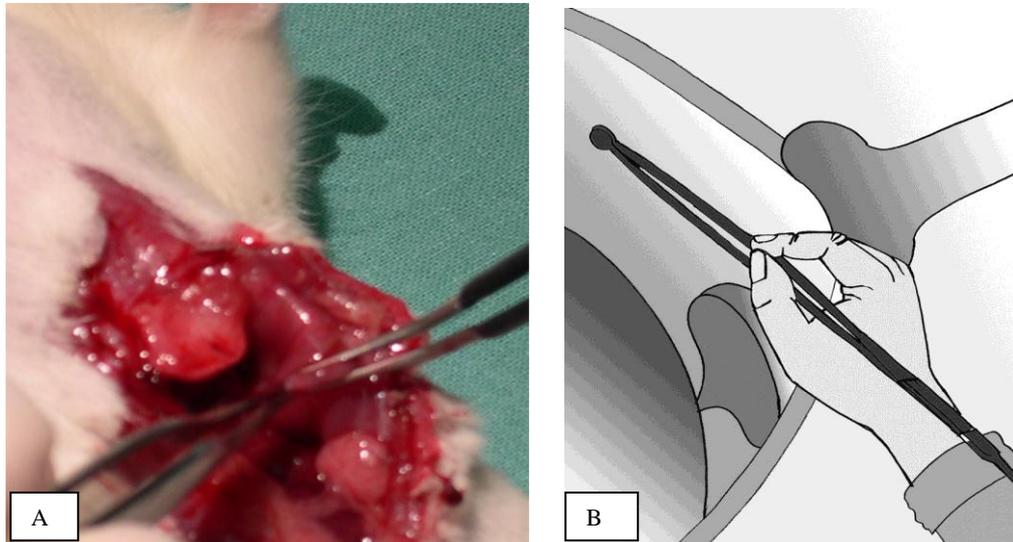
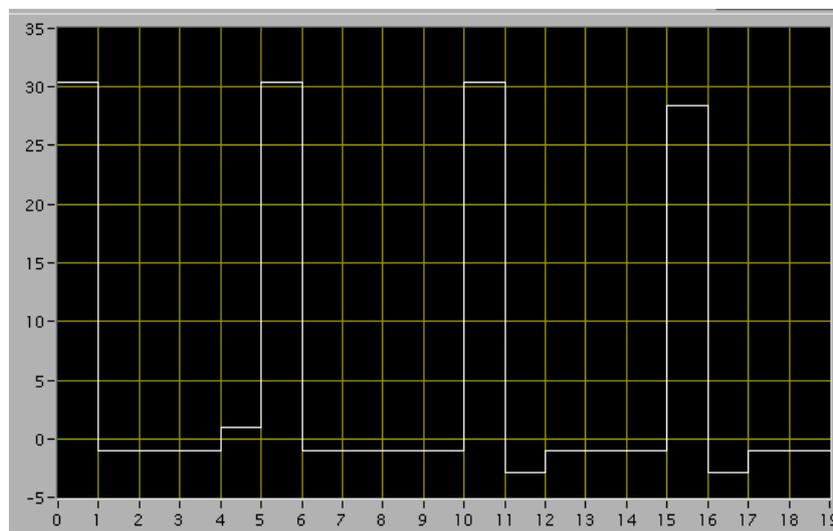


Abbildung 9

In vivo Elektrotransfer mittels bipolarer Elektroden (A: mit Bipolaren Zangenelektroden, B: Plattenelektroden) in das linke Zwerchfell.



Zeit in ms

Abbildung 10

Vier elektrische Impulse wurden zur Elektroporation appliziert. X-Achse: Zeit in ms. Y-Achse: Puls in Volt.

Schließlich wurden die Abdominalmuskulatur und die Haut wieder mit 4/0 Prolene (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Es wurden bipolare Zangenelektroden und manchmal Plattenelektroden angewendet.

X- Gal- Färbung

24 Stunden postoperativ wurden die Tiere euthanasiert, autoptiert und das linke Diaphragma wurde für weitere Untersuchungen entnommen. Die markierte Fläche wurde von der Zwerchfellhälfte disseziert und in Tissue-Tek OCT (Sakura, The Netherlands) eingefroren. Der gesamte Muskel wurde zerlegt (10 µm) und nach Lake⁴² für die β- Gal- Expression vorbereitet. Die Sektionen wurden luftgetrocknet und 17 Stunden bei 37° in einer Lösung aus PBS pH7.5, 50mM Potassium ferrocyanide und 50mM Potassium ferricyanide inkubiert. Die X-Gal -Färbung wurde beim pH-Wert 7.5 durchgeführt, um eine spontane Expression von β- Gal zu vermeiden, wie sie beim pH-Wert 4 in normalen, nicht transfizierten Zellen vorkommt.

Histologie

Es wurden mehrere 10 µm Proben von jeder Seite des Diaphragmas geschnitten und nach gewöhnlichem Protokoll mit Hematoxylin & Eosin sowie mit Neutralrot Färbung gefärbt. Die Schnitte wurden mit Leitungswasser gewaschen und dann mit Neutralrot 10 Minuten lang entgegengefärbt, noch einmal mit Wasser gewaschen und anschließend mit einem wasserlöslichen Medium fixiert.

Ergebnisse

Effizienter DNA-Transfer in die Muskelfasern des Zwerchfells

Wir untersuchten in beiden Tiergruppen das Niveau der Genexpression in den Muskelfaserzell- Zytoplasmen des Zwerchfells mittels X-Gal-Färbung. Qualitativ zeigten die elektroporierten Flächen in der Behandlungsgruppe (Gruppe II) eine Färbung von mehreren Faserzellzytoplasmen in der Nähe der Injektionsstelle. Obwohl die DNA nur in die Unterseite des Zwerchfells injiziert wurde, waren auch Faserzellen der oberflächlichen und der tieferen Fasern gefärbt.

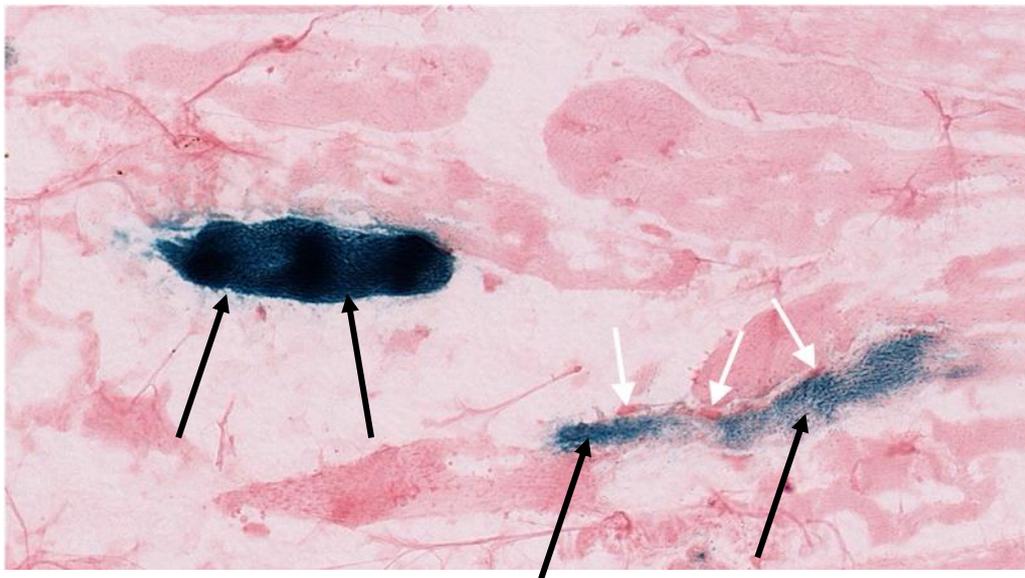


Abbildung 11

Zwerchfellmuskel einer erwachsenen Ratte nach Elektroporation (4 Pulse 200 V/cm, 20 msl) mit deutlicher X-Gal-Färbung des Zytoplasmas der Faserzellen (schwarze Pfeile). Normale Zellkerne mit Hematoxylin-Neutralrot Färbung (weiße Pfeile). Vergrößerung 200 x.

In der Kontrollgruppe (Gruppe I) ohne Elektroporation zeigten die Muskelschnitte keinerlei β -Gal- Expression und Verteilung.

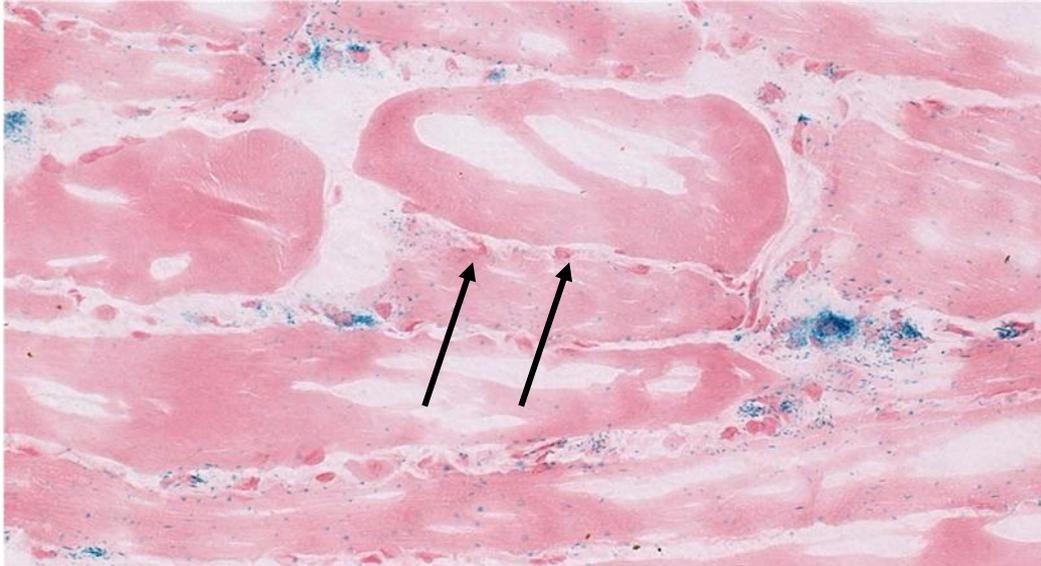


Abbildung 12

Zwerchfellmuskel von ausgewachsenen Kontrollratten ohne Elektroporation. Es ist keine X -Gal- Färbung zu erkennen. Normale Zellkerne (Pfeile) mit Hematoxylin- Neutralrot Färbung. Vergrößerung 400x.

Es gelang keine quantitative Messung. Es bestanden eine hohe Variabilität in der Größe des gefärbten Zytoplasmas der Faserzellen zwischen verschiedenen Schnitten in einem Tier, aber auch zwischen den Tieren. Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere in den Gruppen war leider kein sinnvoller statistischer Vergleich möglich.

In der folgenden Abbildung wird die Transfektionseffizienz in einem größeren Gewebeausschnitt jedoch exemplarisch dargestellt. Durch die geringe Tiefe der Zwerchfellmuskulatur (ca. 1 mm beim Nagetier) konnte das gesamte Muskelvolumen effektiv transfiziert werden.

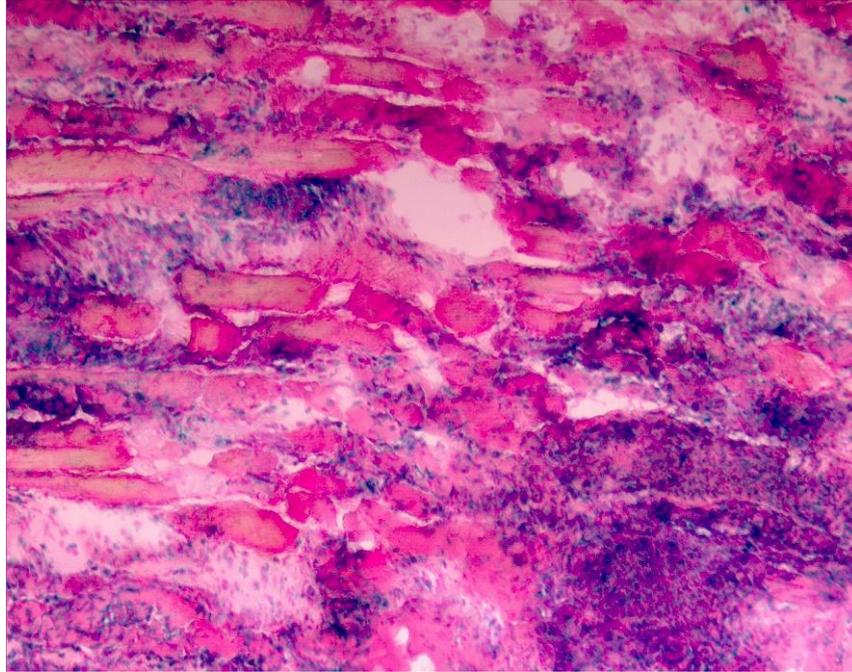


Abbildung 13

Zwerchfellmuskel von ausgewachsenen Ratten mit Elektroporation. Es ist eine X -Gal- Färbung der meisten Zwerchfellzellen zu erkennen, die auf eine hohe Transfektionseffizienz deutet. Vergrößerung 10x.

Diese hohe Transfektionseffizienz muss jedoch relativiert werden: Da ein elektrischer Strom nur zwischen den beiden Elektroden der Pinzette appliziert wurde, darf nicht erwartet werden, dass die Zwerchfellmuskulatur außerhalb des Anwendungsbereiches wirksam transfiziert wurde. So kann die Anzahl der transfizierten Zellen nur mit einer wiederholten Stromapplikation an verschiedenen Stellen erhöht werden. Diese wiederholte Anwendung bedeutet keine signifikante Einschränkung, da die Gesamtfläche des Zwerchfells durch eine Laparotomie erreichbar ist.

Funktion des Zwerchfells nach Elektroporation

Während und nach der Elektroporation waren die Zwerchfellkontraktionen nicht beeinträchtigt. Auch die Muskelfarbe veränderte sich nicht. Außerdem erholten sich

alle Tiere postoperativ gut, ohne Zeichen von Unwohlsein oder Atemschwierigkeiten aufzuzeigen.

Muskelschaden

Die histologischen Befunde nach 24 Stunden zeigten geringe oder keine Schäden an den Muskelfasern des Zwerchfells, insbesondere zeigte sich keine Poration mehr und es kamen kaum Fasern mit einem zentral platzierten Kern zum Vorschein. Weiterhin gab es keine Degenerationszeichen in den behandelten Muskelzellen.

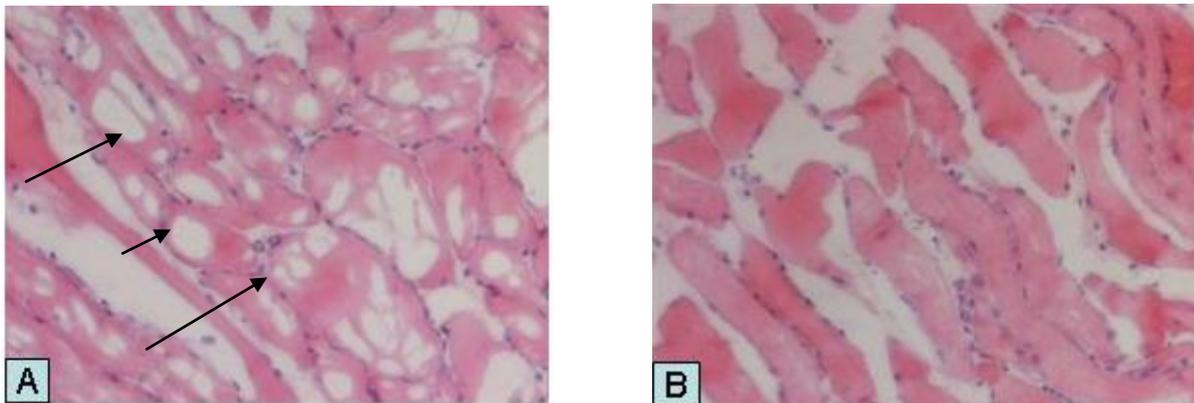


Abbildung 14

Zwerchfellmuskel von ausgewachsenen Ratten mit Hematoxylin & Eosin -Färbung; (A) unmittelbar nach der Elektroporation mit Porationseffekt (Pfeile); (B) nach 24 Stunden (Muskelfasern ohne Poration). Vergrößerung 100 x

Diskussion

Das Verstehen der genetischen Grundlage der Apoptose und der Muskelzelldegeneration spielt eine wichtige Rolle, um innovative Behandlungskonzepte von Muskeldystrophien zu entwickeln. Apoptose ist ein üblicher Verlauf der Entwicklung und der Alterung der Muskelzellen, diese führt jedoch bei DMD zur früheren Muskelvernichtung. Eine häufige Todesursache bei DMD -Patienten ist das Atemversagen. Grund für dieses Atemversagen ist die progressive Degeneration der Atemmuskulatur, z. B. der Zwerchfellmuskulatur, was auf den Dystrophin-Mangel zurückzuführen ist. Eine der Theorien für solche innovativen Strategien ist, die Apoptose, die bei jungen, männlichen DMD -Patienten zum Muskelschwund führt, zu verzögern. Diese kann durch die Übertragung des funktionstüchtigen Gens in das betroffene Muskelgewebe erreicht werden. Die einfachste Form der Genübertragung besteht aus einer direkten Injektion von Plasmid -DNA mit dem Dystrophin in den Muskel. Obwohl eine solche Gen-Lieferung einfach ist, ist sie jedoch typischerweise nicht effizient. Bereits vor 15 Jahren zeigte die Verwendung eines Adenovirusvektors für den lokalen Transfer von Minidystrophin im Nagetier-Skelettmuskel einige vielversprechende Ergebnisse¹⁹. Vor etwa fünf Jahren gelang der intravenöse Gentransfer von Dystrophin an MDX-Mäusen⁴³. Mit der Entwicklung von gentherapeutischen Ansätzen und mit den ersten klinischen Studien bei anderen Indikationen ist das Interesse am Gentransfer in das Diaphragma in den letzten Jahren gestiegen. Es wird aktiv nach anwendbaren Gentransfermethoden bei DMD -Patienten geforscht.

Um nach solchen Gentransfermethoden zu suchen, müssen zuerst zwei Voraussetzungen in präklinischen Studien erfüllt werden:

- 1) Eine effektive Gentransfermethode, die nicht nur in Zellkulturen, sondern auch am Tiermodell (und später am Menschen) anwendbar ist, muss entwickelt werden.
- 2) Die Muskelfunktion des Zwerchfells muss im Tiermodell (z.B. an einem Tiermodell der DMD) wiederhergestellt werden.

Diese experimentelle Arbeit beschäftigt sich lediglich mit der Fragestellung der Gentransfermethode und seiner Effektivität.

Die Elektroporation wurde schon in vivo eingesetzt

Elektroporation bedeutet Applikation von kontrollierten elektrischen Feldern, um eine Permeabilität durch die Zellmembrane zu erleichtern. Seit Neumann²⁴ zum ersten Mal über die Anwendung von Strom zum Transfer von Molekülen in die Zellen berichtete, ist die Elektroporation bei *in vitro* -Anwendung zur Routine geworden. Nach dem Erfolg der Elektroporations-Genübertragung *in vitro*, wurde der Elektrotransfer in mehreren Studien bei verschiedenen Organen (z. B. Leber⁴⁴, Cornea⁴⁵ oder Skelettmuskel⁴⁶) *in vivo* erfolgreich durchgeführt.

Möglichkeit des in vivo Transfers von nackter Plasmid-DNA in den Zwerchfellmuskel mittels Elektroporation am Nagetiermodell.

Wir liefern die erste Demonstration eines *in vivo* Transfers von nackter Plasmid-DNA in den Zwerchfellmuskel mittels Elektroporation am Nagetiermodell. Die Ergebnisse zeigen eine effektive β -Gal-Expression in den transduzierten Muskelfasern und bestätigen somit die prinzipielle Anwendbarkeit dieser Methode am Zwerchfell.

Dieser Versuch zeigte zum ersten Mal die effektive interne Aufnahme der nackten DNA durch den Zellkern und eine Expression von extrinsischer β -Galactosidase im Zytoplasma.

Der Zwerchfellmuskel eignet sich besonders gut für eine Elektroporation

Im Gegensatz zu anderen Muskeln ist das Zwerchfell ein dünnes und breitflächiges Organ. So erreicht das Zwerchfell eine Maximaltiefe von unter 1 mm beim Nagetier und von 2 bis 3 mm bei Menschen. So eignet sich das Zwerchfell besonders gut für eine Elektroporation. Es ist also problemlos möglich, durch wiederholte Stromapplikationen die Gesamtfläche, respektiv das Gesamtvolumen des Muskels zu behandeln. In dieser Hinsicht unterscheidet sich das Zwerchfell deutlich vom Herzen, wo eine Applikation von bipolarem Strom auf der äußeren Muskeloberfläche keinesfalls erlauben würde, eine Elektroporation in der Tiefe der Muskulatur zu erreichen.

Die Effektivität der Elektroporation ist variabel

Unsere Untersuchungen haben eine variable Effektivität der Transfektion in verschiedenen Muskelfasern gezeigt, nämlich, dass die Transfektion zwar in die transduzierten Fasern effektiv ist, jedoch nicht in die Zellen, die sich außerhalb des mit Strom behandelten Gebietes befinden. Im Tiermodell ist eine solche variable Transfektion zwar von potentiell Interesse, weil sie erlauben würde, das Ausmaß der Transfektion mit der Wiederherstellung der Funktion zu korrelieren. Hingegen wäre eine therapeutische Anwendung beim Menschen erst sinnvoll, wenn eine weit verbreitete Transfektion des Gewebes möglich wäre.

Der Zwerchfellmuskel ist chirurgisch, auch minimal-invasiv, gut erreichbar.

Die Zwerchfelloberfläche ist durch eine Laparotomie problemlos mit Elektroporations-Elektroden zu erreichen. Lediglich die retrohepatische und die retrosplenische Fläche sind zum Teil verdeckt. Es wäre vom chirurgischen Standpunkt sogar gut denkbar, das Zwerchfell über einen minimal-invasiven Zugang (Laparoskopie) zu erreichen. Während einer Laparoskopie würde die Bauchhöhle mit einem Gas (CO₂) gedehnt, sodass die Darstellung des Zwerchfelles sogar exzellent wäre.

Die Effektivität der Elektroporation könnte intraoperativ mittels Fluoreszenz kontrolliert werden.

Während einer Laparoskopie ist es möglich, besondere Zellpopulationen mittels Fluoreszenz spezifisch darzustellen. So wurden Tumorzellen in der Peritonealhöhle in verschiedenen Karzinomen (Prostata, Ovar, usw.) mittels Fluoreszenz dargestellt⁴⁷. Prinzipiell wäre eine solche Färbung auch denkbar, um die systematische Elektroporation der Zwerchfellmuskulatur intraoperativ zu überwachen.

Die funktionelle Integrität der Muskulatur muss nach Elektroporation erhalten werden

Die prinzipiellen Vorteile der Elektroporation des Zwerchfells unter thorakoskopischen oder laparoskopischen Bedingungen sind die einfache Durchführbarkeit und das geringe Trauma, was nur ein geringes Risiko für den Patienten mit sich bringen würde. In unserem Versuch wurde die Elektroporation

sogar nach einer Laparotomie durch die Tiere gut vertragen, es kam weder zu einer Komplikation während der Narkose, noch zu einer postoperativen respiratorischen Insuffizienz.

Ein kritischer Punkt ist jedoch der Erhalt der funktionellen Integrität der Zwerchfellmuskulatur nach der Elektroporation. Es ist bekannt, dass die Verabreichung kurzer elektrischer Pulse auf Gewebe zur Steigerung der Zelldurchlässigkeit für DNA mit Gewebeschäden einhergehen kann. Allerdings wurden Muskelzellnekrose und verminderte Genexpression erst nach extrem hoher elektrischer Feldstärke beobachtet²⁸. Es wurde bereits eine hochgradige Transfektionseffizienz festgestellt, wenn niedrigere elektrische Parameter eingesetzt wurden, die nur geringe und transitorische Gewebeschäden verursachen.

Histologische Untersuchungen des Muskels nach Behandlung mit Elektrotransfer bestätigten, dass die Schädigung des Muskelgewebes innerhalb der ersten sieben Tage am stärksten ist. In zentralen Regionen, die mit Elektroporation behandelt wurden, zeichnet sich die Gewebeschädigung meistens durch Muskelläsionen aus, die nekrotische Myofasern enthalten und stark mit Entzündungszellen besiedelt sind. Kurz nach der Behandlung setzt im Muskel die Regeneration von Mantelzellen⁴⁸ ein und nach drei Wochen hat sich der Muskel vollständig erholt: die Struktur der Mikrofasern ist wieder normal und es sind keinerlei Läsionen mehr sichtbar.

Faktoren der Zellschädigung nach Elektroporation

Es wurden die unterschiedlichen Faktoren untersucht, die bei der Muskelschädigung nach Gen-Elektrotransfer eine Rolle spielen. Hierbei wurde die Zelldurchlässigkeit sehr häufig als eine der Hauptursachen für Toxizität vorgeschlagen, da das externe

Medium sich in den Zellen ausbreitet und somit die Zusammensetzung innerhalb der Zellen verändert. Gehl und Mir behaupteten, dass die Toxizität beim Elektrotransfer mit dem Grad der Zelldurchlässigkeit korreliere⁴⁹. Zellnekrose und verminderte Genexpression wurden nach extrem hoher elektrischer Feldstärke beobachtet, allerdings können diese Effekte durch die Bestimmung eines Grenzwertes für jede Spezies minimiert werden. Des Weiteren verstärkt sich die Muskelnekrose mit der kumulativen Dauer der Pulse⁵⁰.

Die Elektroporation beeinträchtigt die Zwerchfellfunktion erst bei hoher Elektroporations -Reizdauer

Es lässt sich in unserer Studie feststellen, dass die normale Funktion des Zwerchfells nicht beeinträchtigt wurde. Während der in vivo Elektroporation blieb der Rhythmus der Zwerchfellkontraktionen konstant und unverändert, die Tiere erholten sich schnell und dies ohne besondere Zeichen von Unbehagen oder Atemschwierigkeiten. Die Farbe der Muskelfasern veränderte sich nicht, die Lokalisation und Distribution der Zellkerne war normal. Die Elektroporation des Zwerchfells erscheint in unserem Experiment als eine sichere Methode.

Allerdings hat die vorliegende Studie den effizienten Gentransfer 24 Stunden nach der Injektion untersucht, es bedarf noch weiterer Untersuchungen, um das Ausmaß sowohl der Expression als auch der möglichen Toxizität zu einem späteren Zeitpunkt bewerten zu können. In einer anderen Studie⁵² zeigte sich nach 7 Tagen bei hoher Elektroporations -Reizdauer eine schwere Rhabdomyolyse und eine Infiltration durch Mastzellen, eosinophile und mononukleare Zellen. An der Peripherie der Läsion waren die Schäden nicht ganz so schwerwiegend, die Myozyten waren nicht

vollständig nekrotisch, aber blass. Im makroskopisch normal erscheinenden Teil des Muskels konnte nur eine diffuse milde bis mäßige inflammatorische Infiltration beobachtet werden.

Kürzlich wurde ein *in vivo* Kernspinresonanzsystem entwickelt, um die elektroportierten Zonen während des Elektrotransfers von Medikamenten und Genen⁵¹ zu visualisieren und zu bewerten, um somit die Effizienz und Toxizität verschiedener Protokolle genauer bestimmen zu können.

Die Menge der DNA könnte auch toxisch wirken

Einigen Studien zufolge könnte die Toxizität des DNA-Elektrotransfers auch in direktem Zusammenhang mit der Menge der injizierten DNA stehen. Durch Elektrotransfer ausgelöste Plasmid-abhängige Muskelläsionen enthalten nekrotische Myofasern; obwohl die elektrotransferierten Muskeln am Tag 56⁵² nicht mehr von den unbehandelten Kontrollen zu unterscheiden waren, scheint es, als ob die Muskelschädigungen hauptsächlich aus der intrazellulären Präsenz und Expression der Plasmid-DNA hervorgehen. Genauer gesagt haben die nekrotischen Fasern nie das Transgen exprimiert und nur ein paar wenige positive Muskelzellen konnten innerhalb des geschädigten Gebietes nachgewiesen werden, wohingegen eine starke Expression in benachbarten intakten Zellen beobachtet wurde⁵³.

Ebenso wurde vermutet, dass die Schädigung des Muskelgewebes im Zusammenhang mit einer erhöhten Transfektionseffizienz steht. Betrand et al.⁵⁴ verwendeten transgene Mäuse, welche unter der Kontrolle von einem faser-spezifischen und nervenabhängigen Promoter ein Transgen enthielten und zeigten,

dass die Elektroporation nur vorübergehende phänotypische und morphologische Veränderungen in den Muskelfasern hervorriefen. Dennoch wurde aber mit diesem Verfahren eine profunde, wenn auch vorübergehende, Veränderung des Transkriptionsstatus im Muskel herbeigeführt. Es scheint, als ob 7 bis 10 Tage nach dem DNA-Elektrotransfer ausreichend sind, damit die Muskelfasern ihren normalen physiologischen Zustand wieder erreichen.

Eine Optimierung der Protokolle ist vorrangig

Aus diesen eben genannten Gründen ist eine Optimierung der Protokolle hinsichtlich der Schädigung des Gewebes vorrangig, um genaue physiologische, biochemische und molekulare Messungen durchführen zu können. Im Hinblick auf physiologische und therapeutische Anwendungen muss ein Kompromiss zwischen effizientem Plasmidtransfer und minimaler Zelltoxizität gefunden werden. Treten bei physiologischen Anwendungen Muskelschädigungen auf, kann die anschließende Degeneration/Regeneration der Muskelfasern zu unerwarteten Ereignissen führen, die in normalen Muskelfasern nicht eintreten würden. Somit würden die Studienergebnisse beeinträchtigt werden. Bei therapeutischen Anwendungen wie z. B. DMD oder anderen pathophysiologischen Zuständen, die zu geschwächten Muskeln führen, müssen in den Protokollen zum Elektrotransfer weitere Muskelschädigungen vermieden werden⁵⁵.

Schlussfolgerung und Ausblick

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die Charakterisierung der molekularen Defekte, die DMD verursachen, und die Identifizierung von Dystrophin recht bald zu einer Heilung dieser progressiven neuromuskulären Schädigung führen würde. Seit der Entdeckung des Gens sind nun fast 20 Jahre vergangen und leider sind wir immer noch auf der Suche nach einer effektiven Therapie zur Linderung des dystrophischen Prozesses.

Der in vivo Elektrotransfer ist ein nonvirales Verfahren für einen relativ effizienten Gentransfer, vorrangig in der Skelettmuskulatur. Die Muskulatur ist zudem in der Lage, funktionale, posttranslational veränderte Proteine zu produzieren. Deshalb kann der Muskel als Organ zur Produktion von abgesonderten Proteinen benutzt werden, die auf systemische Erkrankungen abzielen. Die wichtigsten Vorteile des DNA-Elektrotransfers sind Schnelligkeit, einfache Durchführbarkeit, Anwendbarkeit in einer Vielzahl von Geweben und geringe Kosten. Es ist jetzt bewiesen, dass therapeutische Level von zirkulierenden Proteinen im Tiermodell erzielt werden können (gute Beispiele sind EPO, Koagulationsfaktoren und TNF- α -lösliche Rezeptoren).

Da durch DNA keine Immunreaktion ausgelöst wird, könnte ein Elektrotransfer im Diaphragma theoretisch beliebig wiederholt werden, falls dies notwendig ist. Allerdings wäre dies in der klinischen Praxis etwas schwierig. Die Behandlung muss jedoch nicht sehr oft wiederholt werden, da häufig eine Langzeitexpression im Muskel beschrieben wurde. Der DNA-Elektrotransfer scheint gegenüber der rekombinanten Proteintherapie einige Vorteile zu haben: Er sollte die möglichen

Nebenwirkungen einer akuten Injektion einer höheren Proteindosis verhindern, da über einen längeren Zeitraum ein stabiles Gleichgewicht in der Blutkonzentration erzielt wird. Dieser Fakt könnte besonders nützlich sein für kleine Proteine, deren Clearance durch die Nieren besonders schnell erfolgt (z.B. Epoetin alpha, rekombinantes EPO, Halbwertszeit beträgt 4 bis 6 Stunden) oder für Rezeptoren, die sehr schnell verbraucht werden, sodass die Bluthalbwertszeit nach einer 210 C Injektion kurz ist (Etanercept muss zweimal wöchentlich mit einer Dosis von 25mg injiziert werden).

Letztendlich ermöglicht der DNA-Elektrotransfer auch sehr lokale Behandlungen. Beispielsweise ist gezeigt worden, dass die lokale Konzentration eines anti-TNF-Proteins im Auge ausreichend ist, um einen physiologischen Effekt hervorzurufen, währenddessen eine sehr geringe (oder nicht nachweisbare) Menge dieses Proteins im Allgemeinen Kreislauf nachgewiesen werden kann, wodurch eventuelle Nebenwirkungen eingeschränkt werden können.

Allerdings gibt es auch immer noch Probleme, die der klinischen Anwendung des DNA-Elektrotransfers im Wege stehen:

1. Da das durch DNA- Elektroporation erzielte Niveau im Vergleich zu dem mit Viren erzielten nicht hoch genug wäre, würde die in vivo Elektroporation kein Mitbewerber, sondern eine Alternative zu viralen Verfahren für spezielle Anwendungen sein.
2. Der genaue Mechanismus wurde immer noch nicht genau durchleuchtet und Verbesserungen könnten durch Verständnis bringende Erkenntnisse aus anderen Studien erwartet werden. Insbesondere müssen einige Parameter und die DNA-Biodistribution

noch näher untersucht werden, um dieses Verfahren zu optimieren und seine lokale Toxizität einzuschränken.

3. Die Muskulatur ist in der Lage, funktionale glykosylierte Proteine zu produzieren, jedoch können Muskelzellen nicht die absolute Kapazität für posttranslationale Veränderungen haben. Dieses Unvermögen muss noch weiter untersucht und bei DMD geprüft werden.
4. Obwohl im vorliegenden Fall die mögliche Anwendung eine tödliche Erkrankung betrifft, ist die Sicherheit einer solchen Behandlung entscheidend. Es gibt ethische Einschränkungen für die Einführung klinischer Studien, die sorgfältig diskutiert werden müssen. Es wird notwendig sein, einen effizienten Regulierungsmechanismus für die Genexpression zu entwickeln, da es möglich sein sollte, die Behandlung jederzeit abubrechen, wenn klinische Probleme oder Nebenwirkungen beobachtet werden.

Somit leidet die Elektroporation wie auch andere Gentransferverfahren, die zurzeit untersucht werden, an einer Reihe von Missständen. Es bedarf also noch zusätzlicher Forschungsarbeit, um diese Hindernisse endgültig überwinden und letztendlich effektive Therapien im Kampf gegen die progressive Natur der DMD entwickeln zu können. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein effektives Management und eine effiziente Therapie bei DMD nur durch eine Kombination verschiedener Ansätze erzielt werden kann. Demzufolge ist es wichtig, weitere präklinische Studien durchzuführen, um die möglichen nutzbringenden Auswirkungen der Elektroporation in Kombination mit anderen Strategien beurteilen zu können.

Zusammenfassung

Genübertragung im Zwerchfell ist besonders interessant für die Korrektur von vererbten Primärmyopathien, wie sie z. B. mit der Duchenne-Muskeldystrophie (DMD) einhergehen. Die vorliegende Studie wurde angelegt, um den Transfer von Reportergenen mittels Elektroporation in das Zwerchfell *in vivo* zu untersuchen. Hierfür wurden aus männlichen F344 Ratten zwei Gruppen gebildet (n=5). In Gruppe I (Kontrolle) wurde nur Plasmid-DNA injiziert, es erfolgte keine Elektroporation. In Gruppe II schloss sich der Injektion von Plasmid-DNA die Elektroporation an. Zunächst wurde die Unterseite der linken Bauchfellhälfte über eine 4 cm große mediane Laparotomie geöffnet und die DNA-Lösung 1µg/1µl (pNGVL-β-Galaktosidase) 2 – 3-mal in eine 2 cm² große Fläche injiziert. In Gruppe II wurden die Elektroden auf der injizierten Fläche platziert und die Elektroporation wurde ausgeführt (4pulses, 200v/cm, 20ms). Nach 24 Stunden wurden die Tiere obduziert. Das Zwerchfell wurde entfernt und eingefärbt:

- zur Untersuchung der extrinsischen β-Gal-Aktivität.
- zur histologischen Untersuchung mit Haematoxylin und Eosin (H & E).

Während und nach der Elektroporation blieben die Bauchfellkontraktionen unverändert. Postoperativ erholten sich alle Tiere gut und zeigten keine Zeichen von Unwohlsein oder Atemnot. Die Untersuchungen wurden beim pH-Wert 7.5 durchgeführt, um eine spontane Expression von β-Gal zu vermeiden, wie sie beim pH-Wert 4 in normalen, nicht transfizierten Zellen vorkommt.

In der Gruppe II stellte man beim pH-Wert 7.5 eine besonders starke β-Gal-Expression im Zytoplasma der behandelten Muskelfaserzellen fest. In Gruppe I wurde keine β-Gal-Expression beobachtet. Die histologische Untersuchung zeigte

keine Beschädigung der Muskelfasern. Dies ist die erste Beschreibung eines Gentransfers mit nackter Plasmid-DNA in den Bauchfellmuskel mithilfe von Elektroporation *in vivo*. Der *in vivo* Gentransfer von nackter Plasmid-DNA mittels Elektroporation in den Bauchfellmuskel ist möglich.

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Dr. med. univ. Hans Lippert danken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat.

Als nächstes möchte ich ganz besonders Dr. med. Mathias Gugger, Oberarzt des Institutes für Pathologie der Universität Bern, Inselspital, danken, der mich stets bei der Planung und Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit unterstützt hat. Mein besonderer Dank geht auch an Amiq Gazdhar, Ph.D, der mir bei der Vorbereitung der anatomischen Präparate geholfen hat.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Marc A. Reymond bedanken, meinem Lehrer und Freund, der mich bei der Datenauswertung und beim Schreiben der Arbeit unterstützt hat. Dank seiner kritischen, aber freundlichen Unterstützung sowie seiner wertvollen Anregungen ist es mir gelungen, diese Arbeit vorzulegen.

Ich danke Frau Grit Nestler für ihre Hilfe und Mitwirkung bei der grammatikalischen Korrektur und orthographischen Prüfung dieser Arbeit.

Last but not least, möchte ich mich bei meiner Frau und meinen Kindern bedanken, die mir mit Verständnis zur Seite stehen und mich in jeder Hinsicht unterstützten.

Darstellung des Bildungsweges

P E R S O N A L I E N

Name	Beshay
Vorname	Morris
Geschlecht	männlich
Geburtsdatum	26. April 1966
Staatsangehörigkeit	Schweiz (Meilen, ZH), Ägypten
Adresse	Engelbert-Kaempferstr. 8 33605 Bielefeld (Deutschland)
Telefon (dienstlich)	+49.521.772-77499
Telefon (privat)	+ 49.521.2603157
Handy	+49.171.5072271
Fax	+49.521.772-77498
E- Mail	morris.beshay@evkb.de
Konfession	frei evangelisch
Zivilstand	verheiratet, 4 Kinder
Sprachen	: Deutsch, Englisch, Arabisch

S T U D I U M

Bis Okt. 1984	Abitur, Ägypten.
Okt. 1984 – Dez. 1990	Medizinische Fakultät, Universität Kairo, Ägypten

D I P L O M E U N D A B S C H L Ü S S E

Juli 1997	Facharzt für Allgemeinchirurgie, Universitätsspital
-----------	---

Kairo, Ägypten

März 1996 Basisexamen of the Royal College of Surgeons of
England, London, Großbritannien

Okt.1998 Fellow of the Royal College of Surgeons of
Edinburgh, Großbritannien

Dez. 2005 Prüfung für den Schwerpunkt Thoraxchirurgie,
Universitätsklinikum Bern

März 2006 Deutsche Approbation als Arzt

B E R U F L I C H E R W E R D E G A N G

März 1991 - Feb. 1992 Arzt im Praktikum

März 1992 - Nov. 1993 Allgemeinpraxis im Ländlichen Medizinzentrum,
Atamna Souhag, Ägypten

Dez. 1993 – Sep. 1997 Assistenzarzt an der Klinik für Allgemeinchirurgie,
Universitätsklinikum Kairo und akademisches
Lehrkrankenhaus El-Sahel
(davon 3 Monate Intensivmedizin, 12 Monate
Unfallchirurgie und Orthopädie)

Okt.- Dez. 1997 Gastarzt, Viszeralchirurgische Klinik
Universitätsspital Zürich (Prof. F. Lagardier).

Aug.- Okt. 1998 Gastarzt an der Klinik für Allgemeinchirurgie,
Law Hospital, Carluke, Schottland, GB

Apr. – Aug. 1999 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Abteilung für
Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Zürich
(Prof. Dr. med. W. Weder)

Sept. 1999-Dez. 2000	Assistenzarzt an der Klinik für Chirurgie, Spital Zimmerberg, Horgen, Schweiz
Jan. 2001- Mai. 2002	Assistenzarzt, Thoraxchirurgie, Universitätsspital Bern (Prof. Dr. med. R. Schmid)
Jun. 2002- Okt. 2005:	Oberarzt, Thoraxchirurgie, Universitätsspital Bern (Prof. Dr. med. R. Schmid)
Seit Dez. 2005	Abteilungsleiter Thoraxchirurgie, Evangelisches Krankenhaus Bielefeld, Deutschland (Lehrkrankenhaus der Westfälischen Wilhelms- Universität Münster)

F A C H K U N D E N

März 2008	Strahlenschutz
-----------	----------------

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

Die Möglichkeit des nicht viralen Gentransfers im Zwerchfell in *vivo*

an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Bielefeld, den 16. Juni 2009

Literaturverzeichnis

- 1 Blake D.J., Weir A, Newey S.E., Davies K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev.*, 2002 Apr; 82(2):291-329.
- 2 Campbell K.P. and Kahl S.D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, 1989; 338, 259–262.
- 3 Petrof B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Cell Biochem.*, 1998; 179, 111–123.
- 4 Rando T.A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 2001; 24, 1575–1594.
- 5 Pasternak C., Wong S. and Elson E.L. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J. Cell Biol.*, 1995; 128, 355–361.
- 6 Grange R.W., Gainer T.G., Marschner K.M., Talmadge R.J. and Stull, J.T. Fast-twitch skeletal muscles of dystrophic mouse pups are resistant to injury from acute mechanical stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2002; 283, C1090–C1101.
- 7 Porter G.A., Dmytrenko G.M., Winkelmann J.C. and Bloch R.J. Dystrophin colocalizes with beta-spectrin in distinct subsarcolemmal domains in mammalian skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, 1992; 117, 997–1005.
- 8 Straub V., Bittner R.E., Leger J.J. and Voit T. Direct visualization of the dystrophin network on skeletal muscle fiber membrane. *J. Cell Biol.*, 1992; 119, 1183–1191.
- 9 Rybakova I.N., Patel J.R. and Ervasti J.M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.*, 2000; 150, 1209–1214.
- 10 Ervasti J.M. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278, 13591–13594.

11 Koenig M., Hoffman E.P., Bertelson C.J., Monaco A.P., Feener C., Kunkel L.M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 1987; 50, 509-17.

12 Zubrzycka-Gaarn E.E., Bulman D.E., Karpati G., Burghes A.H., Belfall B., Klamut H.J., Talbot J., Hodges R.S., Ray P.N., Worton R.G. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, 1988; 333, 466-9.

13 Beggs A.H., Hoffman E.P., Snyder J.R., Arahata K., Specht L., Shapiro F., Angelini C., Sugita H. and Kunkel L.M. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991; 49, 54–67.

14 Hoffman E.P. Genotype/phenotype correlations in Duchenne/ Becker dystrophy. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.*, 1993, 3, 12–36.

15 Towbin J.A., Bowles K.R. and Bowles N.E. Etiologies of cardiomyopathy and heart failure. *Nat. Med.*, 1999; 5, 266–267.

16 Cohen N. and Muntoni F. Multiple pathogenetic mechanisms in X-linked dilated cardiomyopathy. *Heart*, 2004; 90, 835–841.

¹⁷ Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C; DMD Care Considerations Working Group. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol.* 2010 Jan;9(1):77-93. Epub 2009 Nov 27. Review .

18 Petrof B. J., Shrager J. B., Stedman H. H., Kelly A. M., and Sweeney H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993; 90, 3710–3714

19 Dunckley M.G., Wells D.J., Walsh F.S., and Dickson G. Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum Mol Genet.*, 1993; 2, 717-23.

20 Ragot T., Vincent N., Chafey P., Vigne E., Gilgenkrantz H., Couton D., Cartaud J., Briand P., Kaplan J.C., Perricaudet M. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*, 1993; 361, 647-50.

21 Vincent N., Ragot T., Gilgenkrantz H, Couton D, Chafey P, Grégoire A, Briand P, Kaplan JC, Kahn A, Perricaudet M. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet.*, 1993; 5, 130-4.

22 Acsadi G., Dickson G., Love D.R., Jani A., Walsh F.S., Gurusinghe A., Wolff J.A., Davies K.E. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature*, 1991; 352, 815-8.

23 Davis H.L. and Jasmin B.J. Direct gene transfer into mouse diaphragm. *FEBS Lett.*, 1993; 333, 146-50.

24 Dongsheng D. Challenges and opportunities in dystrophin-deficient cardiomyopathy gene therapy. *Hum. Mol. Genet.*, 2006; 15:253-261.

25 Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, 1982; 1(7):841-5.

26 Neumann E., Kakorin, S., and Toensing, K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1999, 48: 3–16.

27 Heller R., Jaroszeski M, Atkin A., Moradpour D., Gilbert R., Wands J., Nicolau C. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.*, 1996; 389, 225-8.

28 Blair-Parks K., Weston B.C., and Dean D.A. High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med.*, 2002; 4, 92-100.

29 Mir L.M., Bureau M.F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J.M., Delaere P. Branellec D., Schwartz B., Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci.*, 1999; 96, 4262-7.

30 Faurie C., Phez E., Golzio M., Vossen C., Lesbordes J.C., Delteil C., Teissié J., Rols M.P. Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, 1665; 92–100.

31 Belehradek J., Orłowski S., Ramirez L.H., Pron G., Poddevin B., and Mir L.M. Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1190, 155–163.

32 Sersa G., Stabuc B., Cemazar M., Miklavcic D., and Rudolf Z. Electrochemotherapy with cisplatin: the systemic antitumour effectiveness of cisplatin can be potentiated locally by the application of electric pulses in the treatment of malignant melanoma skin metastases. *Melanoma Res.*, 2000; 10, 381–385.

33 Rebersek M., Cufer T., Cemazar M., Kranjc S., and Sersa G. Electrochemotherapy with cisplatin of cutaneous tumor lesions in breast cancer. *Anticancer Drugs*, 2004; 15, 593–597.

34 Heller L.C., Ugen K., and Heller R. Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2005; 2, 255–268.

35 Li S. Electroporation gene therapy: new developments in vivo and in vitro. *Curr. Gene Ther.*, 2004; 4, 309–316.

36 Trollet C., Bigey P., and Scherman D. Electrotransfection: an overview. In: Schleef, M. DNA-pharmaceuticals. Wiley-VCH, Weinheim, 2005; 11, 189–218.

37 Prud'homme G.J., Glinka Y., Khan A.S., and Draghia-Akli R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr. Gene Ther.*, 2006; 6, 243–273.

38 Trollet C., Scherman D., Bigey P. Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. *Methods Mol Biol.*, 2008; 423:199-214.

39 Mir L.M., Bureau M.F., Rangara R., Schwartz B., and Scherman D. Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C.R. Acad. Sci.*, 1998; 321, 893–899.

40 Vicat J.M., Boisseau S., Jourdes P, Lainé M, Wion D, Bouali-Benazzouz R, Benabid A.L., Berger F. Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. *Hum. Gene Ther.*, 2000; 11, 909–916.

41 Mir L.M., Moller P.H., Andre F., and Gehl J. Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues. *Adv. Genet.*, 2005; 54, 83–114.

42 Lake B.D., Ellis R.B. What do you think you are quantifying? An appraisal of histochemical methods in the measurements of the activities of lysosomal enzymes. *Histochem J.*, 1976; 8(4):357-66.

43 Gregorevic P., Blankinship M.J., Chamberlain J.S. Viral vectors for gene transfer to striated muscle. *Curr Opin Mol Ther.*, 2004; 6, 491-8.

44 Heller R., Jaroszeski M, Atkin A., Moradpour D., Gilbert R., Wands J., Nicolau C. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.*, 1996; 389, 225-8.

45 Blair-Parks K., Weston B.C., and Dean D.A. High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J Gene Med.*, 2002; 4, 92-100.

46 Mir L.M., Bureau M.F., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J.M., Delaere P. Branellec D., Schwartz B., Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci.*, 1999; 96, 4262-7.

⁴⁷ Kim HL. Optical imaging in oncology. *Urol Oncol.* 2009 May-Jun;27(3):298-300.

48 Peng B., Zhao Y., Lu, H., Pang W., and Xu Y. In vivo plasmid DNA electroporation resulted in transfection of satellite cells and lasting transgene expression in regenerated muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 338, 1490–1498.

49 Gehl J. and Mir L.M. Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 261, 377–380.

50 Mathiesen I. Electropermeabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther.*, 1999; 6, 508–514.

51 Leroy-Willig A., Bureau M.F., Scherman D., and Carlier P.G. In vivo NMR imaging evaluation of efficiency and toxicity of gene electrotransfer in rat muscle. *Gene Ther.*, 2005; 12, 1434–1443.

52 Hartikka J., Sukhu L., Buchner C., et al. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol. Ther.*, 2001; 4, 407–415.

53 Durieux A.C., Bonnefoy R., Busso T., and Freyssenet D. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J. Gene Med.*, 2004; 6, 809–816.

54 Bertrand A., Ngo-Muller V., Hentzen D., Concordet J.P., Daegelen, D., and Tuil, D. Muscle electrotransfer as a tool for studying muscle fiber-specific and nerve-dependent activity of promoters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2003; 285, C1071–C1081.

55 Trollet C., Scherman D., Bigey P. Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. *Methods Mol Biol.*, 2008; 423:199-214.