

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Campus Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

**Thymosin  $\beta$ 4 vermittelte Neovaskularisierung: transkriptionelle  
und posttranslationale Signalwege**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
vorgelegt von

Teresa Margarita Trenkwalder  
aus Augsburg  
2014

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München*

*Berichterstatter:* Prof. Dr. med. Christian Kupatt

*Mitberichterstatter:* Prof. Dr. Gunnar Schotta  
Prof. Dr. Bernhard F. Becker  
Priv. Doz. Dr. Gerd Juchem

*Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter:* Dr. med. vet. Rabea Hinkel  
PD Dr. rer. nat. Elisabeth Deindl

*Dekan:* Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

*Tag der mündlichen Prüfung:* 20.02.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Der klinische Hintergrund: Die periphere arterielle Verschlusskrankheit	1
1.2	Prozesse des Gefäßwachstums	2
1.2.1	Vaskulogenese	2
1.2.2	Angiogenese	2
1.2.3	Arteriogenese	4
1.3	Die PI3-AKT-Achse	5
1.3.1	Die PI3-Kinase alpha	5
1.3.2	Die PI3-Kinase gamma	6
1.3.3	Die Proteinkinase B / AKT	6
1.4	Thymosin $\beta$ 4 (Tb4)	8
1.4.1	Tb4 Allgemein	8
1.4.2	Tb4 und seine Interaktion mit Aktin	8
1.4.3	Tb4 und Antiinflammation	9
1.4.4	Tb4 und Angiogenese	10
1.4.5	Tb4: Kardioprotektion und Vaskularisierung	10
1.5	Der MRTF / SRF Signalweg	11
1.5.1	„Myocardin Related Transcription Factors“ (MRTFs)	11
1.5.2	Der Serum Response Faktor (SRF)	13
1.6	Gentherapeutische Ansätze	14
1.7	Adeno-assoziierte Viren	15
1.8	Zielsetzung der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Materialien	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Geräte	19
2.1.3	Histologie	20
2.1.4	Zellkultur	21
2.1.5	Operationszubehör	21
2.1.6	Kits	23
2.1.7	Software	23
2.1.8	Lösungen und Puffer	23
2.1.9	Primer	24
2.1.10	Antikörper	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Kultivierung der verwendeten Zelllinien	25
2.2.2	Transfektion von Zellen	26
2.2.3	Nachweis der Kapillarbildung in vitro: Matrigel-Angiogeneseassay	27
2.2.4	Myozyten-Endothelzell Co-Kulturassay auf Matrigel	27
2.2.5	Endothelzell-Perizyten Co-Kulturassay auf Matrigel	28
2.2.6	Migrationsversuche	28
2.2.7	MRTF-HL1-Färbung	29
2.2.8	Luciferaseaktivitäts-Assay	29
2.2.9	Produktion rekombinanter Adeno-assoziiierter-Viren	30
2.2.10	Mausmodell der Femoralisligatur	33
2.2.11	Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie	37
2.2.12	Quantitative Echtzeit-PCR	45
2.2.13	HPLC- Analyse von Gewebeproben	47
2.2.14	Histologie	48
2.2.15	Statistische Analyse	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1	Funktionelle Effekte von Tb4 <i>in vitro</i>	52

3.1.1	Nachweis der Plasmidtransfektion <i>in vitro</i> .....	52
3.1.2	Tb4 stimuliert Ringformationen endothelialer Zellen <i>in vitro</i> .....	52
3.1.3	Pharmakologische Inhibierung der Tb4 Wirkung <i>in vitro</i> .....	54
3.1.4	Interaktion von Myozyten und Endothelzellen <i>in vitro</i> .....	55
3.1.5	Tb4 stimuliert die Migration endothelialer Zellen <i>in vitro</i> .....	56
<b>3.2</b>	<b>Nachweis des AAV 2.9 <i>in vivo</i></b> .....	<b>57</b>
3.2.1	β-Galaktosidase Färbung: Mausmodell .....	57
3.2.2	β-Galaktosidase Färbung: Kaninchenmodell .....	57
3.2.3	Nachweis des AAV2.9 unter Verwendung einer „Tomato Maus“ .....	58
3.2.4	Quantitative Echtzeit-PCR Analysen: Maus .....	58
3.2.5	Quantitative Echtzeit-PCR Analysen: Kaninchen .....	59
3.2.6	Tb4-Proteinbestimmung mittels HPLC .....	59
<b>3.3</b>	<b>Tb4 stimuliert die postischämische Revaskularisierung <i>in vivo</i> (Mausmodell)</b> ....	<b>61</b>
3.3.1	Tb4 und die Proteinkinase B / AKT <i>in vivo</i> .....	61
3.3.2	Tb4 und die PI3-Kinase gamma <i>in vivo</i> .....	63
3.3.3	Tb4 und die PI3-Kinase alpha <i>in vivo</i> .....	65
<b>3.4</b>	<b>Funktionelle Effekte von Tb4 <i>in vivo</i> I (Kaninchenmodell)</b> .....	<b>66</b>
3.4.1	Tb4 stimuliert das Kapillarwachstum .....	67
3.4.2	Analyse des Kollateralwachstums .....	67
3.4.3	Analyse der Blutflussgeschwindigkeit mittels Cinedensitometrie .....	68
3.4.4	Perfusionsbestimmung mittels fluoreszierender Mikrosphären .....	69
3.4.5	Doppelimmunofluoresenzhistologie zur Bestimmung der Kapillarreifung .....	69
<b>3.5</b>	<b>Funktionelle Effekte von Tb4 <i>in vivo</i> II (Kaninchenmodell)</b> .....	<b>71</b>
3.5.1	Allgemein: von der Mikro-zur Makrozirkulation .....	71
3.5.2	Angiogenese .....	71
3.5.3	Kollateralwachstum .....	71
3.5.4	Cinedensitometrie .....	72
3.5.5	Regionaler Blutfluss (Perfusion) .....	73
3.5.6	Gefäßmaturierung .....	73
<b>3.6</b>	<b>Tb4 und der MRTF / SRF Signalweg <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i></b> .....	<b>75</b>
3.6.1	Angiogene Effekte von Tb4 benötigen die Expression von MRTF <i>in vitro</i> .....	75
3.6.2	Tb4 induziert die nukleäre Translokation von MRTF .....	76
3.6.3	Tb4 induziert die MRTF-abhängige Aktivierung des SRF Promoters .....	77
3.6.4	Tb4 induziert die MRTF/SRF-Zielgene CCN1 und CCN2 .....	78
3.6.5	Die Hochregulierung von CCN1 ist relevant für die angiogene Tb4-Wirkung .....	79
3.6.6	Tb4 induziert die Rekrutierung von Perizyten in Abhängigkeit von CCN2 .....	80
3.6.7	Funktionelle Effekte von Tb4 <i>in vivo</i> sind abhängig von der MRTF-Expression .....	82
3.6.8	Tb4-vermittelte Neovaskularisierung: Relevanz der Aktinbindedomäne .....	84
3.6.9	Fasudil inhibiert die Tb4 induzierte Revaskularisierung <i>in vivo</i> .....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>87</b>
4.1	Angiogenese-Potential von Tb4 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	87
4.2	Von der Mikrozirkulation zur Makrozirkulation: Rolle der Gefäßreifung .....	89
4.2.1	Warum wurden zwei verschiedene Tiermodelle untersucht? .....	89
4.2.2	Interaktion von Mikrozirkulation und Makrozirkulation .....	89
4.3	Das Wechselspiel zwischen Muskel und Gefäßen .....	90
4.4	Tb4 und seine molekularen Grundlagen .....	92
4.4.1	Die Lokalisation von Tb4 .....	92
4.4.2	Tb4 und die Aktivierung des PI3-AKT Signalweges .....	93
4.4.3	Tb4 aktiviert aktinabhängig die MRTF/SRF-Kaskade .....	94
4.5	Gentherapie .....	97
4.5.1	AAVs in der Gentherapie .....	97
4.6	Klinischer Ausblick .....	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>101</b>

<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>112</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der klinische Hintergrund: Die periphere arterielle Verschlusskrankheit

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) definiert sich durch eine Stenosierung, später eine Okkludierung des arteriellen Gefäßsystems der Extremitäten. In 95 % der Fälle entsteht sie auf dem Boden einer Arteriosklerose (Leitlinien pAVK; Bearbeitungsstand 27.4.2009) und betrifft in modernen Industriestaaten bis zu 10 % der Bevölkerung über 50 Jahren. Bei Patienten über 65 Jahren steigt die Prävalenz bereits auf über 20 % an. Von besonderer Relevanz für die Lebenserwartung dieser Patientengruppe ist das vielfach parallele Vorhandensein einer koronaren oder zerebralen Gefäßerkrankung, so haben pAVK-Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko an einem Myokardinfarkt oder einem Schlaganfall zu sterben<sup>1,2</sup>. Zudem geht die pAVK mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität einher<sup>3</sup>, sowie dem vermehrten Auftreten depressiver Erkrankungen<sup>4</sup>.

Die Einteilung der pAVK erfolgt in verschiedene Stadien, welche in Deutschland nach Fontaine gegliedert werden. In der internationalen Wissenschaft wird hingegen die Einteilung nach Rutherford bevorzugt (s. Abb. 1).

<b>Fontaine</b>		<b>Rutherford</b>		
<b>Stadium</b>	<b>Klinisches Bild</b>	<b>Grad</b>	<b>Kategorie</b>	<b>Klinisches Bild</b>
I	Asymptomatisch	0	0	Asymptomatisch
II a	Gehstrecke > 200m	I	1	leichte Claudicatio intermittens
II b	Gehstrecke < 200m	I	2	mäßige Claudicatio intermittens
		I	3	schwere Claudicatio intermittens
III	ischämischer Ruheschmerz	II	4	ischämischer Ruheschmerz
IV	Ulkus, Gangrän	III	5	kleinflächige Nekrose
		III	6	großflächige Nekrose

**Abb. 1:** Klassifikation der pAVK: Fontaine-Stadien und Rutherford-Kategorien (gemäß den Leitlinien zur pAVK 2009).

Die therapeutischen Möglichkeiten der pAVK umfassen die konservativ medikamentöse Therapie und das Gebiet der invasiven Therapien. Diese gliedern sich einerseits in chirurgische Verfahren der Bypassoperation und andererseits in die endovaskuläre Revaskularisierung mittels Katheterintervention. Trotz multipler Fortschritte auf dem Gebiet

der invasiven und interventionellen Versorgung verbleibt ein Teil der Patienten ohne adäquate Therapie und kann palliativ nur mit einer Amputation versorgt werden. Aufgrund des zunehmenden Alters und der steigenden Komorbidität kardiovaskulärer Patienten wächst der Anteil dieser sogenannten „no option“ Patienten. Für diese Patientengruppe ist es nötig, neue therapeutische Alternativen zu entwickeln, welche eine Revaskularisierung ermöglichen. Eine Möglichkeit stellt das Konzept der therapeutischen Neovaskularisierung dar. Hierbei werden gezielt Signalwege des entwicklungsbiologischen und physiologischen Gefäßwachstums angesteuert und in der Behandlung der pAVK eingesetzt.

### **1.2 Prozesse des Gefäßwachstums**

Die Biologie des Gefäßwachstums ist ein komplexer Prozess, welcher nicht nur die Koordination verschiedener Zelltypen erfordert, sondern auch durch eine Vielzahl molekularer Faktoren beeinflusst und gesteuert wird. Diese Mechanismen können spezifisch im Rahmen der therapeutischen Neovaskularisierung genutzt werden. Ebenso ist aber auch eine gezielte Inhibierung der Vaskularisierung als anti-angiogene Therapie im Bereich der Onkologie von hohem klinischem Interesse.

Prinzipiell gliedert man die Entstehung eines funktionellen Gefäßsystems in drei Bereiche:

1. die Vaskulogenese, 2. die Angiogenese und 3. die Arteriogenese. Praktisch gesehen kommt es jedoch stets zu fließenden Übergängen und gegenseitiger Beeinflussung.

#### **1.2.1 Vaskulogenese**

Der Prozess der Vaskulogenese beschreibt die „de novo“ Entstehung von Gefäßen aus Vorläuferzellen des mesodermalen Gewebes, sogenannten Angioblasten welche sich zu Endothelzellen differenzieren und zusammenlagern<sup>5</sup>. Dominierend ist dieser Vorgang in der embryonalen Entwicklung des vaskulären Plexus. Es wurde angenommen, dass nach der Entstehung eines vollständigen Gefäßsystems eine Neuentstehung von Gefäßen nur durch Aussprossung vorhandener Endothelzellen möglich ist. Die Hypothese einer postnatalen Vaskulogenese durch zirkulierende Vorläuferzellen ist derzeit äußerst umstritten. Im adulten Organismus scheint jedoch das Vorhandensein dieser Zellpopulationen als Quelle für parakrine Faktoren zu dienen, welche Gefäßwachstum stimulieren können<sup>6</sup>.

#### **1.2.2 Angiogenese**

Der Begriff Angiogenese bezeichnet das Aussprossen von Endothelzellen aus präexistente Gefäßen und deren Formation zu neuen Kapillaren<sup>7</sup>. Hierbei spielen vor allem Migration, Proliferation und morphologische Anpassung des bestehenden endothelialen Plexus eine

entscheidende Rolle. Getriggert wird dieser Mechanismus vornehmlich durch Ischämie im Rahmen einer Gewebsminderperfusion, wodurch es zur Induktion hypoxieabhängiger Signalwege kommt. In Abhängigkeit des Sauerstoffangebots kommt es zur Stabilisierung von HIF-1, welcher zur Hochregulation angiogenetischer und proliferativer Gene, beispielsweise VEGF und Erythropoetin führt<sup>8</sup>.

Die Familie der VEG-Faktoren besteht aus 5 Mitgliedern, VEGF-A, B, C, D und dem Placenta Growth Faktor (PlGF). Der bekannteste Vertreter, VEGF-A, wird durch alternatives Spleißen noch in neun weitere Isoformen unterteilt und nach Anzahl der vorhandenen Aminosäuren nummeriert. Am weitesten verbreitet sind die Isoformen VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub>.

VEGF-C und VEGF-D sind vor allem in Prozesse der Lymphangiogenese involviert, wohingegen VEGF-A (oft nur VEGF genannt) als stärkster bekannter Stimulator der Angiogenese gilt. Die jeweiligen Mitglieder der VEGF-Familie binden an drei unterschiedliche Tyrosinkinaserzeptoren, die VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1, VEGFR-2/Flk1 und VEGFR-3), wobei sie sich in ihrer jeweiligen Rezeptoraffinität unterscheiden. VEGF-B und PlGF binden ausschließlich an den VEGFR-1, während der VEGFR-3 nur von VEGF-C und VEGF-D aktiviert wird. VEGF-A vermittelt seine angiogene Wirkung hauptsächlich als Aktivator des VEGFR-2.

Die durch Hypoxie induzierte Erhöhung von VEGF-A und seines Rezeptors VEGFR-2 führten zur Stimulation der endothelialen Proliferation und folgend zur Ausbildung neuer Kapillarnetze. Ebenso erzielte auch die Überexpression von VEGF eine vermehrte Kapillarisation in hypoxischen Geweben<sup>9</sup>.

Die VEGF-A induzierte Angiogenese ist imstande, zeitnah abzulaufen, jedoch zeigen rein VEGF-induzierte Gefäße eine Tendenz zur Regression aufgrund erhöhter vaskulärer Permeabilität und mangelnder Gefäßreifung<sup>10</sup>.

In hypoxischen Geweben kommt es zudem auch zur vermehrten Sekretion von FGF-1 und FGF-2 und zur parallelen Hochregulierung ihrer Rezeptoren. FGF-1 und -2 wirken mitogen und migrationsfördernd auf Endothelzellen<sup>11</sup> und sind entscheidend an der Erhaltung der vaskulären Integrität beteiligt<sup>12</sup>.

Neben VEGF und FGF spielt auch das Angiopoietin/Tie2 System eine zentrale Rolle als Regulator angiogenetischer Prozesse. Die Familie der Angiopoietine beschreibt eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, welche an der spezifischen Regulierung endothelialer Aktivität beteiligt sind. Sie umfasst 4 Mitglieder, wobei Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2) bis dato am besten untersucht sind. Ang-1 wird hierbei von muralen Zellen (glatten

Muskelzellen, Perizyten) gebildet und sezerniert, wohingegen Ang-2 in endothelialen Zellen produziert wird und bis zu seiner Sekretion in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert wird.

Gemeinsamer Rezeptor von Ang-1 und Ang-2 ist die Rezeptortyrosinkinase Tie2, welche sich fast ausschließlich an der Oberfläche endothelialer Zellen befindet. Die Bindung von Ang-1 führt zur Autophosphorylierung und somit zur Aktivierung des Tie2 Rezeptors. Ang-2 hingegen induziert eine Blockade der Rezeptortyrosinkinase<sup>13</sup>, so dass von einer antagonistischen Wirkung der beiden Angiopoietine an der extrazellulären Domäne ausgegangen wird. Die Tie2-Rezeptoraktivierung von Ang-1 führt zu einer vermehrten Gefäßstabilisierung durch Rekrutierung periendothelialer Zellen. Ang-2 hingegen induziert die Ablösung vorhandener Perizyten und trägt folgend zur vaskulären Destabilisierung bei<sup>14</sup>. Diese resultiert in einer mikrozirkulatorischen Permeabilitätserhöhung, bietet aber auch für endotheliale Zellen die Möglichkeit zur vermehrten Zellaussprossung<sup>15</sup>.

### 1.2.3 Arteriogenese

Unter dem Prozess der Arteriogenese versteht man das Wachstum und die Reifung präexistenter arterieller Anastomosen in große, funktionell relevante Arterien<sup>16</sup>. Im Vergleich zur Angiogenese ist der Hauptstimulus für die Arteriogenese nicht ischämischer Natur<sup>17</sup>, sondern eine physikalische Kraft, die Schubspannung (*shear stress*)<sup>18</sup>. Schubspannung entsteht durch Okkludierung oder massive Stenosierung in einer proximal der Kollateralen gelegenen Arterie, wodurch ein Druckgradient vor und hinter dem Verschluss entsteht. Dieser induziert eine Durchblutungssteigerung mit der Konsequenz einer Schubspannungsänderung in den Kollateralgefäßen, worauf diese mit Proliferation und Umbauvorgängen reagieren. Induziert werden diese Änderungen durch endotheliale Signalwege, welche mechanische Stimuli in Genexpressionsänderungen umwandeln können. Es kommt zu einer Endothelaktivierung mit Steigerung der Expression zelloberflächlicher Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise ICAM-1<sup>19</sup> und VCAM-1<sup>20</sup>.

Parallel hierzu erzeugt die Schubspannung die endotheliale Freisetzung der chemotaktischen Substanzen MCP-1 und GM-CSF<sup>21</sup>. MCP-1 ist in der Lage, Monozyten zu rekrutieren, welche aufgrund der hochregulierten Adhäsionsmoleküle ortsständig gebunden werden. Die bereits 1976 von Schaper et al. beschriebenen, für die Arteriogenese relevanten Monozyten<sup>22</sup> binden unter anderem über ihren Mac-1 Rezeptor an die Gefäßwand und transmigrieren in das perivaskuläre Gewebe<sup>23</sup>. Hier differenzieren sie zu Makrophagen und sezernieren Matrix-Metallo-Proteinasen zum Abbau der extrazellulären Matrix sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine, wie beispielsweise bFGF und TNF-alpha, die zur Steigerung des Wachstums von

Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen führen. Die entstandene proinflammatorische Umgebung führt zur weiteren Anlockung von Monozyten, welche additiv die Reifung der Kollateralen fördern.

### **1.3 Die PI3-AKT-Achse**

Die Familie der PI3 (Phosphoinositid-3-Kinasen)-Kinasen ist eine Untergruppe der Lipidkinasen, die an multiplen intrazellulären Signalwegen der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und zytoskelettalen Morphologie beteiligt sind. Sie katalysieren die Phosphorylierung von Phosphatidylinositolen, wodurch diese als Bindungspartner für intrazelluläre Signalmoleküle aktiviert werden. Bekanntester Vertreter ist das Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), welches unter anderem als membranständige Bindungskomponente für die Proteinkinase B / AKT dient<sup>24</sup>.

PI3-Kinasen gliedern sich in verschiedenen Isoformen, welche in 3 Klassen unterteilt werden können, wobei die Klasse I bis dato am besten untersucht wurde. PI3 Kinasen der Klasse I stellen Heterodimere dar aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Diese Klasse lässt sich weiter in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungstyp in eine Klasse IA und IB unterteilen<sup>25</sup>. Zur Klasse IA gehören die PI3-Kinasen alpha, beta und delta. Diese bestehen jeweils aus der katalytischen Untereinheit p110 alpha, beta oder delta sowie der regulatorischen Untereinheit p50, p55 oder p85. Ihre Aktivierung basiert auf der Assoziation ihrer regulatorischen Untereinheit mit einer phosphorylierten Rezeptortyrosinkinase. Im Unterschied dazu ist der einzige Vertreter der Klasse IB die PI3-Kinase gamma. Sie besitzt die katalytische Einheit p110 gamma und als regulatorische Domäne das p101 und wird über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor aktiviert.

Die Klassen II und III der PI3-Kinasen sind bisher weniger ausführlich untersucht und werden in der folgenden Arbeit nicht behandelt.

#### **1.3.1 Die PI3-Kinase alpha**

Die PI3-Kinase alpha wird ubiquitär exprimiert und scheint die dominierende Isoform während der vaskulären Entwicklung und im Rahmen angiogenetischer Prozesse zu sein. Eine Inaktivierung der katalytischen Untereinheit, p110a, in transgenen Mäusen, sowohl ubiquitär als auch endothelspezifisch, führt zu schweren vaskulären Defekten und embryonaler Letalität<sup>26,27</sup>. Des Weiteren ist p110a nötig für die VEGF-A abhängige Proliferation, Migration und das Überleben endothelialer Zellen. Die kardiale Expression einer konstitutiv aktiven PI3-Kinase alpha führt zur Größenzunahme von Mäuseherzen, das Vorhandensein

einer dominant negativen Mutante resultiert hingegen in morphologisch kleinen Herzen<sup>28</sup>. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von p110a die Aktivität der kleinen GTPase RhoA reduziert<sup>26</sup>.

### **1.3.2 Die PI3-Kinase gamma**

Im Unterschied zur ubiquitär exprimierten PI3-Kinase alpha, findet sich die Isoform gamma vor allem in Zellen des hämatopoetischen Systems. Diese konnte jedoch auch in Kardiomyozyten und Endothelzellen nachgewiesen werden. Wie bereits beschrieben, ist sie die einzige Isoform der Klasse I, die über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert wird. Neuere Studien zeigten eine wichtige Funktion der PI3-Kinase gamma in der Modulation der kardialen Anpassungsreaktion unter chronischer Druckbelastung des Herzens<sup>29</sup>, sowie in der Regulation der endothelialen Antwort auf Schubspannung<sup>30</sup>. Des Weiteren ist die PI3-Kinase gamma von großer Bedeutung für die Migration immunkompetenter Zellen in entzündete Gewebe<sup>31</sup>, ein Vorgang, welcher vor allem im Rahmen der Arteriogenese relevant ist. Diesbezüglich konnte Emilio Hirsch zeigen, dass der Knockout der PI3-Kinase gamma zu einer Verschlechterung der postischämischen Neovaskularisierung, nach Ligatur der A. femoralis, im Hinterlauf der Maus führte<sup>32</sup>.

### **1.3.3 Die Proteinkinase B / AKT**

Von den multiplen PI3-Kinase vermittelten Signalwegen, soll hier vor allem auf den PI3/AKT Signalweg eingegangen werden.

Die Proteinkinase B/AKT ist eine Serin-Threonin-Kinase, welche entscheidend an der Homöostase von Apoptose, Proliferation und Stoffwechselprozessen beteiligt ist.

Das Genom von Säugern codiert für 3 Isoformen der AKT: die AKT1, AKT2 und AKT3, wobei die AKT1 für kardiovaskuläre Funktionen besonders relevant ist<sup>33</sup>.

Der strukturelle Aufbau der AKT (AKT1) gliedert sich in drei funktionellen Domänen: einer PH-(pleckstrin-homology) Domäne am N-terminalen Ende, einem hydrophoben C-Terminus und einer Kinasedomäne im Zentrum. In einer ruhenden Zelle befindet sich die inaktive Form der AKT im Zytosol, wobei man davon ausgeht, dass ihre zentrale Kinase Domäne durch den hydrophoben C-Terminus verdeckt und folglich reguliert wird. Bei Stimulation einer Zelle durch Wachstumsfaktoren kommt es zur Aktivierung der PI3-Kinase mit resultierender Phosphorylierung der Phosphatidylinositole. Diese weisen eine starke Affinität zur PH-Domäne der AKT auf, wodurch es zu einer Translokation der AKT an die Plasmamembran kommt<sup>34</sup>. Zur Aktivierung der AKT ist die Phosphorylierung zweier Aminosäuren nötig, zum einen Threonin (Thr) 308, zum anderen Serin (Ser) 473. Während die Phosphorylierung des

Thr 308 Restes durch die PDK1 hinreichend belegt ist<sup>35,36</sup>, so wird der zweite Aktivierungsschritt am Ser 473 kontrovers diskutiert. Aktuelle Daten konnten jedoch eine mögliche Phosphorylierung via mTORC2 zeigen<sup>37</sup>. Nach der zweifachen Phosphorylierung ist die AKT aktiviert und dient nun als Signalüberträger innerhalb der Zelle durch Phosphorylierung nachgeschalteter Zielproteine.

Die Inaktivierung der AKT erfolgt durch Phosphatasen, wobei die Protein Phosphatase 2A zur Dephosphorylierung des Thr 308 führt und die „PH-domain and leucine-rich repeat protein phosphatase“ (PHLPP) überwiegend den Serin-Rest 473 dephosphoryliert<sup>38,39</sup>.

Die AKT-Kaskade spielt eine zentrale Rolle in multiplen Mechanismen der Apoptosehemmung, der Angiogenese und des Gewebewachstums und wird daher auch als „Survival-Kinase“ bezeichnet. Eine Aktivierung der AKT ist hierbei über verschiedene Signalwege beschrieben worden. So wurde gezeigt, dass der endotheliale Wachstumsfaktor Angiopoietin-1 über seinen Rezeptor Tie2 eine AKT-Aktivierung induziert und dies für die vaskuläre Integrität relevant ist<sup>40</sup>. Des Weiteren wurde das von VEGF-A vermittelte Überleben von Endothelzellen über seinen Rezeptor VEGFR-2 mit nachgeschalteter Aktivierung der PI3-AKT-Achse beschrieben<sup>41,42</sup>. Zudem wurde bis dato eine Vielzahl weiterer Stimuli für den PI3/AKT Signalweg etabliert, so beispielsweise auch IGF-1, HGF oder auch Sphingosin-1-Phosphat.

Ebenso konnte der AKT auch eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben werden. Es zeigte sich, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven AKT-Mutante zu einer Inhibierung des Zelltodes führte, wohingegen eine dominant-negative Mutante der AKT das Zellüberleben blockierte<sup>43,44</sup>.

Dies gilt auch für das Überleben von Kardiomyozyten, in welchen die AKT als relevanter Mediator für Wachstum und Überleben beschrieben wurde. In einem myokardialen Modell der Ischämie und Reperfusion erwies sich die Expression einer konstitutiv-aktiven Akt als kardioprotektiv<sup>44</sup>, wobei jedoch die prolongierte Aktivierung der AKT im Herzen zu kardialer Hypertrophie und kontraktiler Dysfunktion führte<sup>34</sup>.

Zu den nachgeschalteten Signalwegen der AKT gehört unter anderem die endotheliale Stickoxidsynthase (eNOS)<sup>45</sup>, welche durch die AKT direkt an einem Serin-Rest in Position 1177 phosphoryliert und aktiviert wird. Die Abgabe von NO induziert unter anderem eine Vasodilatation und ist entscheidend an vaskulären Umbauprozessen beteiligt<sup>46</sup>. Zudem führt eine AKT Aktivierung zur Produktion von HIF-1-alpha<sup>47</sup>. Des Weiteren werden die Transkriptionsfaktoren FOXO und p53 durch die AKT blockiert und somit apoptotische Prozesse inhibiert<sup>48</sup>.

Im Jahre 2004 konnte gezeigt werden, dass ein weiteres Protein, namentlich Thymosin  $\beta$ 4 zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung der AKT führte und dadurch das vermehrte Überleben von Kardiomyozyten förderte<sup>49</sup>.

### **1.4 Thymosin $\beta$ 4 (Tb4)**

#### **1.4.1 Tb4 Allgemein**

Thymosin  $\beta$ 4 ist ein 4965 Da großes wasserlösliches Peptid, welches erstmals im Jahre 1966 von den Wissenschaftlern Goldstein und White aus bovinem Thymusgewebe isoliert wurde<sup>50</sup>. Es besteht aus 43 Aminosäuren mit einem N-terminalen acetylierten Serin-Rest. Neben Tb4 existieren noch eine Reihe weiterer Thymosine, deren Nomenklatur sich an ihrem isoelektrischem Punkt orientiert. So besitzen alpha-Thymosine einen pH-Wert unter 5.0, beta-Thymosine bewegen sich zwischen 5.0 und 7.5 und die dritte Fraktion der gamma-Thymosine besitzt einen pH-Wert von 7.0 und höher<sup>51,52</sup>. Die Nummerierung der einzelnen Thymosine erfolgte entsprechend der Chronologie ihrer Isolierung.

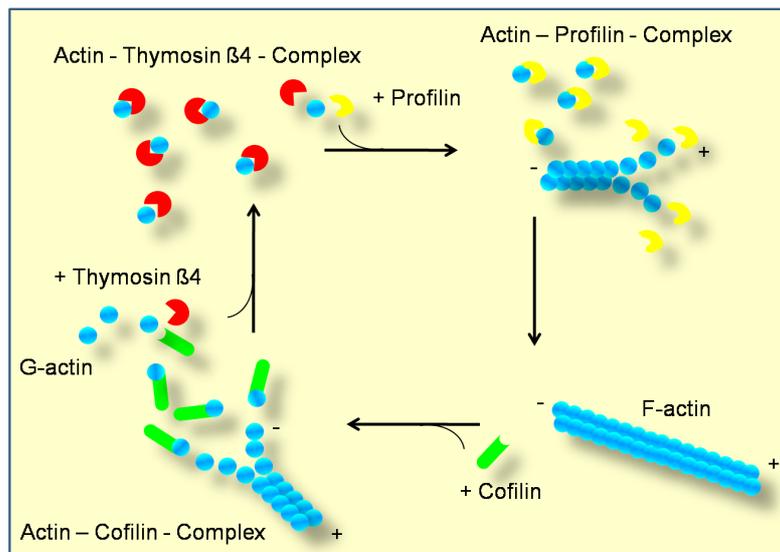
Tb4 sticht in der Gruppe der Thymosine vor allem durch seine Quantität und Multifunktionalität heraus und lässt sich mit Ausnahme von Erythrozyten ubiquitär nachweisen<sup>53, 54, 55</sup>.

#### **1.4.2 Tb4 und seine Interaktion mit Aktin**

Im Jahre 1990 konnte Dan Saver zeigen, dass Tb4 nicht nur ubiquitär vorhanden ist, sondern auch eine zentrale intrazelluläre Rolle in der Sequestration von Aktin spielt<sup>56,57</sup>. Verantwortlich hierfür ist das in der Tb4-Sequenz enthaltene Aktinbindungsmotiv (17-LKKTET-22)<sup>58</sup>. Diese Domäne findet sich auch bei einer Vielzahl anderer Proteine mit aktinbindenden Eigenschaften. Unter diesen Proteinen sind auch Mitglieder der WASP-Protein-Familie, daher wird dieses zentrale Motiv von Tb4 auch als WH2-(WASP-Homology-2)-Domäne bezeichnet.

Aktin ist ein essentielles Molekül für Zellmigration, -morphologie und -teilung, sowie für sämtliche intrazelluläre Transportvorgänge. Jegliche zytoskelettale Veränderung ist entscheidend von der kurzfristigen Bereitstellung des monomeren, globulären G-Aktins und dessen Umbau zu polymerem, filamentösem F-Aktin abhängig. Experimentell konnte gezeigt werden, dass unter ionischen Bedingungen in einem Reagenzglas über 90% des G-Aktins unverzüglich zu F-Aktin polymerisieren würden, wohingegen in einer ruhenden Zelle stets ein Gleichgewicht zwischen beiden Aktinformen herrscht<sup>59</sup>. Diese Beobachtung erklärt die Notwendigkeit sogenannter Aktinbindepoteine, wie beispielsweise Profilin oder Formin,

welche die F-Aktin Bildung stimulieren oder auch Cofilin und Gelsolin, welche an der Zerlegung von F-Aktin beteiligt sind<sup>60</sup>. Das entstandene, monomere G-Aktin wird im Zytosol fast jeder eukaryotischen Zelle durch Thymosin  $\beta$ 4 gebunden. Durch diese Sequestration wird die spontane Polymerisation verhindert und ein konstanter Pool an monomerem G-Aktin aufrechterhalten. Kommt es zur Stimulation der Zelle, beispielsweise über Wachstumsfaktoren entlässt Tb4 G-Aktin aus diesem Reservoir zur profilinabhängigen Polymerisation,<sup>61,62</sup> (s. Abb. 2) wodurch Signalwege oder zytoskelettale Änderungen vermittelt werden.



**Abb. 2:** Tb4 agiert als Bindeprotein für monomeres G-Aktin und kann dieses für die profilinabhängige Polymerisation zu F-Aktin bereitstellen. Cofilin hingegen ist involviert in der Depolymerisation von F-Aktin zu G-Aktin. (*Arteriogenesis – Molecular Regulation, Pathophysiology and Therapeutics I; Chapter 8; Trenkwalder et al. Thymosin  $\beta$ 4 a Promising Therapeutic Agent to Promote Arteriogenesis. Shaker Verlag 2011*)

### 1.4.3 Tb4 und Antiinflammation

Eine Vielzahl von experimentellen Studien konnte Tb4 als Mediator inflammatorischer Reaktionen identifizieren. So konnte gezeigt werden, dass die lokale Anwendung von Tb4 in einem kornealen Wundheilungsassay neben der Reepithelisierung auch verschiedene Zytokine moduliert, unter anderem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-18 (IL-18)<sup>63</sup>. Zudem induziert Tb4 eine Herabregulierung der TNF-alpha abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung in humanen kornealen Epithelzellen<sup>64</sup>. Ebenso zeigten sich niedrigere Level an Chemokinen wie macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, monocyte chemoattractant factor-1 (MCP-1) und dem Zytokin IL-1 $\beta$  nach einem induzierten Alkalischaaden, bei Behandlung der Wunden mit Tb4<sup>65</sup>. Die Behandlung mit Tb4 in einem LPS induzierten Sepsismodell der Ratte führte zu einem Anstieg der Überlebensrate unter anderem durch Modulation multipler inflammatorischer Zytokine<sup>66</sup>.

### 1.4.4 Tb4 und Angiogenese

Erste Hinweise einer Tb4 induzierten Angiogenese fanden Kleinman und Goldstein im Jahre 1995 in Matrigelassays, in welchen mit Tb4 transfizierte Endothelzellen im Vergleich zu Kontrollzellen schneller kapillarähnliche Netzwerke ausbildeten<sup>67</sup>. Weiter konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Tb4 ein chemotaktisches Zytokin für Endothelzellen darstellt und auch *in vivo* die Migration endothelialer Zellen nach subkutaner Matrigelimplantation förderte<sup>68</sup>. Zudem stimulierte die exogene Applikation von Tb4 die vaskuläre Aussprossung in einem koronaren Angiogeneseassay<sup>69</sup>.

Kontrollierte Angiogenese spielt auch eine essentielle Rolle während des Prozesses der Wundheilung. Hierbei zeigte sich, dass Tb4 die Wundheilung über multiple Wege positiv beeinflusst. Es stimuliert sowohl endotheliale Zellen und induziert damit eine erhöhte Angiogenese als auch die Migration von Keratinozyten mit folgender Reepithelisierung der Wunden<sup>70</sup>.

### 1.4.5 Tb4: Kardioprotektion und Vaskularisierung

Mehrere Analysen zeigten, dass Tb4 in der frühen murinen Embryogenese vor allem in Regionen der Gefäßentstehung<sup>71</sup>, den Myokardventrikeln und in den endokardialen Kissen<sup>49</sup> hochreguliert wird. Für die reguläre Entstehung der Koronargefäße sind sowohl Wachstums- und Reifungsprozesse der Mikrozirkulation notwendig, als auch die Entstehung eines makrozirkulatorischen Systems. Auf Ebene der Mikrozirkulation kommt es zunächst zur Umwandlung epikardialer Progenitorzellen in Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen, welche folgend in das Myokard migrieren und ein vaskuläres Netzwerk ausbilden. Unter Verwendung transgener Mäuse mit einem kardialen „Knockdown“ von Tb4 über einen alpha-MHC-Promoter konnten Smart et al. Tb4 als essentiellen Faktor für diesen Einwanderungsprozess identifizieren. In jenem Modell kam es zwar zur Transformation der Vorläuferzellen in Endothel- und glatte Muskelzellen, jedoch fehlte die Migration in die inneren Myokardschichten. Folglich zeigten sich knotige Ansammlungen differenzierter Zellen im Epikardium bei mangelnder myokardialer Vaskularisierung. Zudem wiesen die großen thorakalen Gefäße, beispielsweise die Aorta oder Arteria subclavia, Defekte in ihrer Verzweigung auf<sup>72</sup>.

Im adulten Herzen erzielte die systemische, intravenöse als auch die intrakardiale Applikation von Tb4 nach Myokardinfarkt eine Hochregulierung der AKT und steigerte das Überleben von Kardiomyozyten resultierend in einer verbesserten Myokardfunktion. *In vitro* stimulierte Tb4 die Migration von Endothelzellen und Kardiomyozyten; ein Effekt, welcher durch Hemmung der AKT inhibiert wurde<sup>49</sup>.

Des Weiteren konnten Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass Applikationen muriner embryonaler endothelialer Progenitorzellen (eEPCs)<sup>73</sup> sich positiv in Tiermodellen der akuten und chronischen Ischämie auswirken und dass dieser Effekt unter anderem auf eine Aktivierung der PI3/AKT-Signalkaskade zurückzuführen ist. Hierbei erzielte der Therapieansatz mit eEPCs eine Steigerung der Neovaskularisierung, sowie eine bessere Regeneration des geschädigten Gewebes. Unter der Annahme, dass eEPCs aktive Substanzen sezernieren, wurde eine Analyse ihres Transkriptoms über einen Affymetrixchip erstellt. Hierbei konnte man neben bereits bekannten PI3/AKT aktivierenden Faktoren, eine überdurchschnittlich hohe Expression von Tb4 zeigen<sup>73</sup>.

In einem präklinischen Modell der Ischämie und Reperfusion am Schweinemyokard ermöglichte die regionale Tb4 Applikation in das Ischämieareal ein vermehrtes Überleben von Kardiomyozyten bei paralleler Abnahme von Apoptose und postischämischer Inflammation<sup>74</sup>. Zudem ergab eine Folgestudie im chronisch ischämischen Hinterlauf des Kaninchens, dass der „Knockdown“ von Tb4 in eEPCs mittels shRNA den angiogenetischen und arteriogenetischen Effekt von eEPCs blockierte<sup>75</sup>.

Zusammenfassend imponiert Thymosin  $\beta$ 4 als ein pluripotentes Protein, dessen Wirkung nicht allein durch eine Aktivierung des AKT-Signalweges erklärbar scheint. Zudem ist Tb4 wie die meisten Thymosine ein stark konserviertes Protein, nicht zuletzt wegen seiner Funktion als aktin-bindendes Protein, so dass sich die Frage stellt inwieweit Tb4-vermittelte Aktinbindung und Signalverarbeitung zusammenhängen.

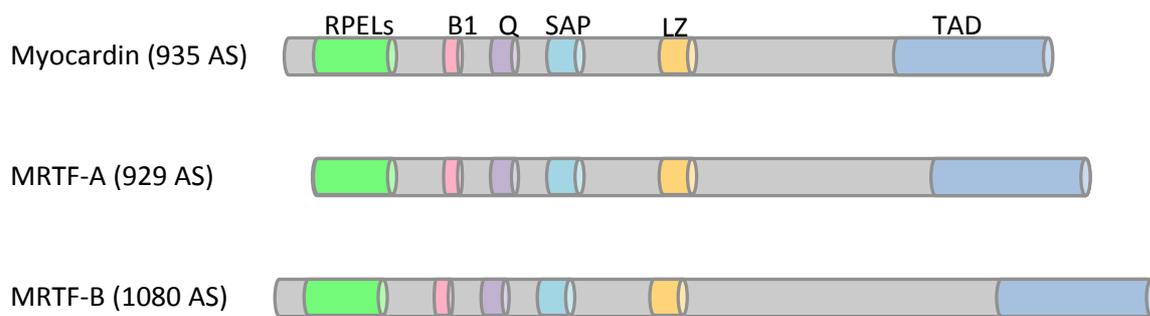
## **1.5 Der MRTF / SRF Signalweg**

### **1.5.1 „Myocardin Related Transcription Factors“ (MRTFs)**

Extrazelluläre Signale resultieren häufig in akuten Änderungen des Zytoskeletts. Hierbei benötigt die Zelle einerseits die rapide Bereitstellung von G-Aktin, andererseits ist eine parallele Umprogrammierung der Genexpression essentiell zur Erhaltung des filamentären Netzwerkes. Neben der Neusynthese von Aktin, werden auch eine Vielzahl anderer Proteine wie beispielsweise Myosin benötigt. Diese Proteine erfordern ebenso Signalkomponenten und regulatorische Enzyme<sup>76</sup>, wodurch ersichtlich wird, wie bedeutungsvoll ein enges Wechselspiel zwischen Strukturproteinen und transkriptioneller Aktivität ist. Über die Verknüpfung zwischen Zytoskelett und Genexpression ist bis dato noch nicht allzu viel bekannt, eine zentrale Rolle konnte jedoch für die Aktin/MRTF-SRF-Achse etabliert werden.

Die Mitglieder der MRTF (Myocardin related transcription factor)- Familie wurden im Jahre 2001 entdeckt und umfassen Myokardin, MRTF-A und MRTF-B und dienen als aktivierende Bindungspartner für SRF (Serum response factor)<sup>77,78</sup>. Während die Expression von Myokardin auf Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen beschränkt ist, finden sich MRTF-A und MRTF-B ubiquitär exprimiert.

MRTFs besitzen 3 funktionell relevante Domänen: N-terminal befindet sich das Aktinbinde-Motiv (RPEL), über welches bei hohen G-Aktin Konzentrationen mehrere Aktinmoleküle gebunden werden können. Zentral lokalisiert zeigt sich die SRF Bindestelle und C-terminal die Transkriptionsaktivierungsdomäne. Die Aktinbindestelle ist aus 3 RPEL1-Motiven aufgebaut, wobei jedes ein Aktinmolekül binden kann. Zudem ermöglichen die zwei Platzhalter zwischen den RPEL-Domänen die Bindung von zwei weiteren globulären Aktinmolekülen, so dass jedes MRTF maximal 5 Aktinmoleküle binden kann<sup>79</sup> (s. Abb. 3).

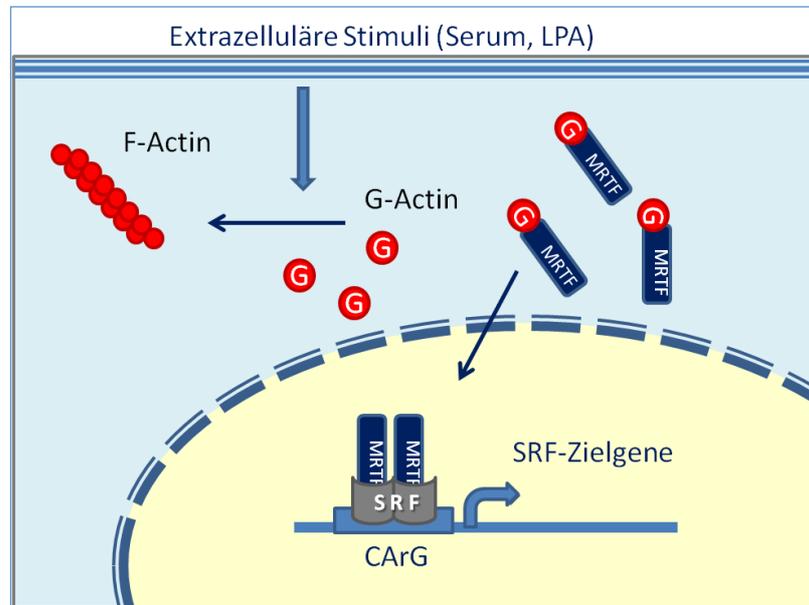


**Abb. 3:** Schematischer Aufbau von Myokardin und MRTF-(Myocardin Related Transkription Factors) A/B: Die RPELs (1-3) sind die Aktinbindestellen, insgesamt können bis zu 5 globuläre Aktinmoleküle gebunden werden. Zwischen der basischen Region B1 und der glutaminreichen-Domäne Q erfolgt die Assoziation mit SRF, wodurch dessen Promotoraktivität verstärkt wird. Die SAP-Region ist mutmaßlich eine DNA-Binderegion, welche an chromosomalen Organisationsvorgängen beteiligt ist. Die TAD-(Transcriptional activating domain) Region ermöglicht die Co-Aktivierung von SRF (modifiziert nach Olson et al.<sup>76</sup>).

Während Myokardin rein nukleär lokalisiert ist, wandert MRTF kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Nukleus, wobei es sowohl im Zytosol als auch im Zellkern von monomerem G-Aktin gebunden und somit reguliert wird. Im Zytosol verhindert die Bindung von Aktin an MRTF dessen Translokation in den Nukleus. Der nukleäre MRTF-Anteil wird ebenfalls von Aktin gebunden, und ist so nicht in der Lage, SRF zu aktivieren. Zudem ist auch der nukleäre Export von MRTF abhängig von G-Aktin, wobei hohe G-Aktin Konzentrationen im Zellkern den nukleären Export von MRTF fördern.

In unstimulierten Zellen ist das Gleichgewicht von nukleärem und zytoplasmatischem MRTF durch hohe nukleäre Exportraten zugunsten der zytoplasmatischen Menge verschoben. Wird

eine Zelle stimuliert, und es kommt zu Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin, wird MRTF frei und transloziert in den Nukleus<sup>80</sup>. Parallel hierzu verringert sich der Export an MRTF, da auch hier ein Mangel an G-Aktin herrscht. Das freigewordene MRTF bindet an SRF und aktiviert dessen Zielgenexpression (s. Abb. 4).



**Abb. 4:** Schema der MRTF Translokation in Abhängigkeit von G-Aktin. Bei niedriger G-Aktin Konzentration im Zytosol wird MRTF frei und ist in der Lage, in den Nukleus zu wandern, um dort an SRF zu binden und die Transkription SRF-abhängiger Zielgene zu verstärken.

SRF bindet spezifisch an das Sequenzmotiv „CArG-Box“ in der Promotorregion von über 200 Zielgenen. Zu den Zielgenen gehört unter anderem auch Aktin selbst, wodurch sich die Menge an freiem G-Aktin im Zellkern wieder erhöht. Dies induziert die Abschaltung der SRF-Aktivierung durch Komplexierung mit MRTF. Parallel wird hierdurch die nukleäre Exportrate gefördert<sup>81</sup>.

### 1.5.2 Der Serum Response Faktor (SRF)

Der Serum Response Faktor (SRF) ist ein gut konservierter, zentraler Transkriptionsfaktor, dessen multiple Funktionen vor allem durch die Analyse von „Knockout“-Modellen in den letzten Jahren verdeutlicht wurden. Seine Mannigfaltigkeit an nachgeschalteten Genen wird hierbei unter anderem durch den jeweiligen Cofaktor, welcher an ihn bindet, selektioniert. Unterschieden werden vor allem zwei große Cofaktorfamilien, welche seine Promotoraktivität verstärken.

Zuerst beschrieben wurde die Interaktion von SRF mit der sogenannten „Ternary Complex Factor“ (TCF)-Familie<sup>82</sup>, welche vorangeschaltet durch MAP-Kinasen aktiviert wird und die Aktivität von SRF verstärkt. Dieser Signalweg wird beispielsweise durch Serum induziert und führt vor allem zur raschen Induktion der sogenannten „immediate-early Genes“ (IEGs), welche für den Prozess der Zellteilung essentiell sind. Dieser Aktivierungsweg ist in der Lage unabhängig von der zytosolischen Aktinkonzentration abzulaufen und wird daher in der vorliegenden Arbeit nicht näher beleuchtet.

Die zweite große Familie der SRF-Coaktivatoren umfasst die Gruppe der MRTFs, welche indirekt durch jegliche Änderung des intrazellulären Aktin gehalts beeinflusst werden. Die Justierung des Aktungleichgewichts wird unter anderem auch über die Familie der Rho-GTPasen gesteuert. Vor allem die Induktion der kleinen Rho-GTPase, RhoA, gilt als ein Hauptaktivator der nukleären MRTF Translokation. RhoA aktiviert hierbei ROCK (Rho-Kinase), welche ihrerseits die LIM-Kinase (LIMK) phosphoryliert. Die LIMK wiederum induziert die Phosphorylierung von Cofilin, welches folgend nicht mehr ausreichend fähig ist, F-Aktin abzubauen. Das Aktungleichgewicht wird in Richtung des F-Aktins verschoben und freigewordenes MRTF kann erneut SRF aktivieren.

Zu den Zielgenen dieser Cofaktorfamilie zählen vor allem Proteine des Zytoskeletts selbst, wie Aktin, Myosin, Tropomyosin oder auch Vinculin, zudem Matrix-Strukturproteine wie CCN1, CCN2 oder Thrombospondin, aber auch zelltypspezifische Gene wie SM22alpha.

### **1.6 Genterapeutische Ansätze**

Das proangiogene Potential von Tb4 wurde bereits mehrfach gezeigt, jedoch gibt es bis heute keine Daten, in wie weit Thymosin  $\beta$ 4 in einem chronischem Ischämie Modell eine stabile Ausbildung von Gefäßen ermöglicht. Hierzu ist es nötig, eine langfristige Expression zu erreichen, um eine ausreichende Stimulation sowohl von Angiogenese als auch Arteriogenese zu erzielen. Ermöglicht wird dies über genterapeutische Vektorsysteme. Der Begriff Genterapie beschreibt das gezielte Einbringen genetischen Materials in eine lebendige Zelle gefolgt von der Expression eines transgenen Proteins mit therapeutischer Funktion. Dieser Transfer benötigt geeignete Transporter, welche sich prinzipiell in nicht-virale und virale Vektoren gliedern lassen.

Hierbei unterscheidet die Nomenklatur das Einbringen exogener DNA über ein Plasmid als Transformation, mit Hilfe eines replikationsfähigen Virus als Infektion und über einen replikationsdefizienten Virus als Transduktion.

Die Wahl eines geeigneten Vektorsystems richtet sich nach der therapeutischen Zielsetzung, da die einzelnen Systeme stark in Transfektionseffizienz, Expressionsdauer, Zelltropismus und weiteren Faktoren differieren. Ein idealer Vektor würde gezielt und effektiv einen Zelltyp transfizieren, langfristig exprimieren oder sogar in seiner Expression regulierbar sein, ohne dabei eine schwere Immunantwort auszulösen.

Aktuell werden in den meisten klinischen Studien weltweit Adenoviren eingesetzt, welche jedoch aufgrund ihrer starken Entzündungsreaktion und relativ kurzen Expressionsdauer als Vektor für chronische Therapieansätze insuffizient erscheinen<sup>83</sup>.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Adeno-assoziierte Viren als gentherapeutisches Werkzeug eingesetzt, welche folgend näher beschrieben werden.

### **1.7 Adeno-assoziierte Viren**

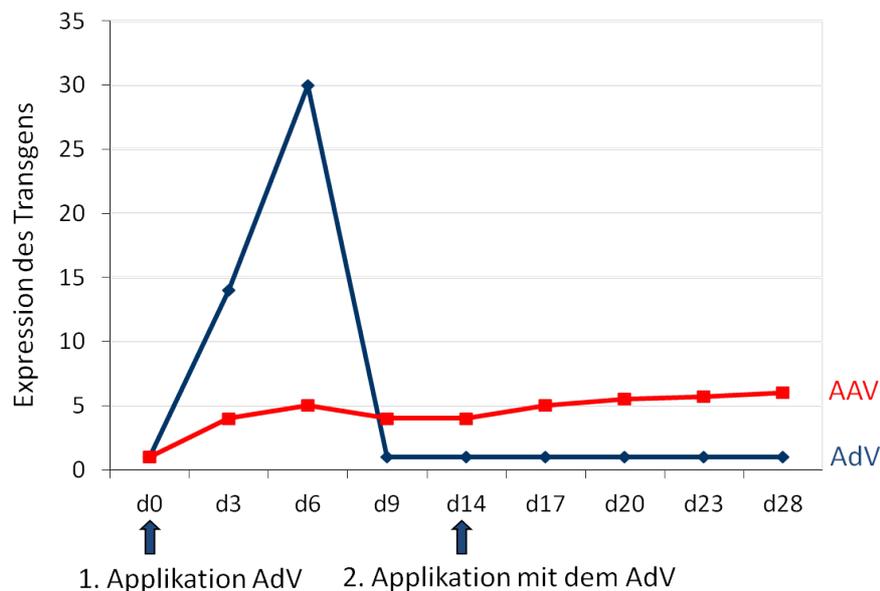
Adeno-assoziierte Viren (AAVs) zählen zur Familie der Parvoviridae, im Speziellen zur Gattung der Dependoviren. Sie sind ikosaedrische, nicht umhüllte, einzelsträngige DNS-Viren mit einem Durchmesser von 18-25 nm und gehören daher zu den kleinsten bekannten Viren. Bisher sind mindestens 11 verschiedene, natürlich vorkommende Serotypen bekannt, wobei jeder Serotyp dadurch definiert ist, dass er keine Kreuzreaktion mit Antikörpern anderer Serotypen aufweist<sup>84</sup>. Zudem isolierten und klassifizierten Gao et al. über 110 neue AAV-Arten, welche jedoch per Definition nicht neuen Serotypen entsprechen, sondern vielmehr in Stämme („clades“) aufgrund ähnlicher phylogenetischer und funktioneller Eigenschaften gegliedert werden können<sup>85, 86, 87</sup>.

Nach heutigem Wissensstand sind AAVs nicht humanpathogen, wodurch sie sich für einen gentherapeutischen Ansatz besonders gut eignen.

Ihre Namensgebung lässt sich auf ihre Entdeckung als Kontamination in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Adenovirus-Isolaten zurückführen. Eine Vermehrung der neu entdeckten Partikel in Zellen gelang jedoch erst nach simultaner Animpfung mit Adenoviren, wodurch gezeigt wurde, dass stets eine Co-Infektion mit einem Helfervirus für eine erfolgreiche Replikation nötig ist<sup>88</sup>. Dies können neben Adenoviren auch Herpesviren<sup>89</sup> oder humane Papillomaviren<sup>90</sup> sein. Bei Abwesenheit eines Helfervirus kommt es zur latenten Infektion der Zellen entweder durch „site-specific“ Integration oder durch das Verbleiben des Virus in episomaler Form. Die stabile Integration in das humane Genom erfolgt jedoch nicht ungerichtet wie bei Retroviren sondern in 70% ortsspezifisch auf Chromosom 19 (Chr 19q13.4) genannt, AAVS1<sup>91, 92, 93</sup>.

AAVs sind befähigt, sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen zu transduzieren, eine Eigenschaft, die vor allem im Bereich der kardiovaskulären Gentherapie von großer Bedeutung ist, da sich sowohl Myozyten als auch Kardiomyozyten in einem „ruhenden“ Zustand befinden.

Nach Aufnahme eines AAV in eine Zelle beginnt die Expression des Transgens mit einer Latenzzeit von einigen Tagen. Nach etwa einer Woche haben AAVs in der Regel ein stabiles Expressionsniveau erreicht (s. Abb. 5), welches sowohl in tierischen Modellen, als auch in Patienten über mehrere Monate bis Jahre nachgewiesen werden konnte<sup>94,95</sup>. Möglich wird dies unter anderem durch ihre geringe Immunogenität und Toxizität<sup>96</sup>. So führen sie im Unterschied zu Adenoviren nur zu einer geringen inflammatorischen Reaktion<sup>97</sup>. Dem gegenüber steht jedoch eine hohe Prävalenz neutralisierender Antikörper, welche den AAV-vermittelten Gentransfer blockieren können.



**Abb. 5:** Dargestellt ist die Expression eines Transgens mittels AAV- (Adeno-assoziiertes Virus) oder AdV- (Adenovirus) vermittelten Gentransfers. Während der AAV nach einer gewissen Latenzzeit eine gleichmäßige, langfristige Expression ermöglicht, steigt der AdV rasch an, fällt jedoch nach wenigen Tagen aufgrund seiner starken, immunogenen Wirkung auf ein Minimum ab, welches auch durch eine 2. Injektion nicht mehr gesteigert werden kann (modifiziert nach Gruchala et al.<sup>98</sup>).

Der erste rekombinant hergestellte Vektor basierte auf einem AAV des Serotyps 2, welcher bis heute der am meisten verwendete und am besten untersuchte Serotyp ist. Die einzelnen Serotypen divergieren am meisten in den Proteinen der Kapsidstruktur vor allem in Bereichen der Antikörper- und Rezeptorbindung, wodurch sich für die einzelnen Serotypen unterschiedliche gewebsspezifische Infektionsmuster ergeben<sup>99,86,100</sup>. Bei Verwendung rekombinanter AAVs kann man sich die gewebeabhängige Affinität gezielt zu Nutze machen,

indem man Vektoren pseudotypisiert. Hierbei tauscht man die Kapsidproteine eines Subtyps durch die eines anderen aus wodurch eine erhöhte Effizienz für Zielzellen erreicht werden kann.

Die Infektion einer Zelle durch einen AAV beginnt mit dessen Anlagerung an die Zellmembran. Hierbei bindet er an membranspezifische Rezeptoren beispielsweise der AAV2 an einen Heparansulfat-Rezeptor. Für den AAV9 wurden kürzlich endständige  $\beta$ -Galaktose-Glykan-Reste als Primärrezeptor beschrieben<sup>101,102</sup>. Für die Internalisierung benötigt das Virus einen Co-Rezeptor, beispielsweise das Integrin  $\alpha V\beta 5$ <sup>103</sup>, das Integrin  $\alpha V\beta 1$ <sup>104</sup> oder auch den FGF-1-Rezeptor<sup>105</sup>. Meist kommt es dann zur Clathrin-abhängigen Internalisierung, bis sich folgend der AAV im späten Endosom pH-abhängig ablöst<sup>106</sup>, perinukleär akkumuliert und über den „nukleären pore-complex“ (NPC) in den Zellkern transloziert<sup>107</sup>.

Das Genom des AAV2 besteht aus einem linearen DNS Einzelstrang mit einer Transportkapazität von etwa 4,6 Kilobasen (kb)<sup>108</sup> und lässt sich in drei funktionelle Bereiche gliedern: Die zwei ORF Regionen (open reading frames), welche für die rep (Replikation) und cap (Kapsid) Proteine codieren, werden endständig von zwei etwa 145 kb langen palindromischen Sequenzen, den sogenannten ITRs (inverted terminal repeats), flankiert<sup>109</sup>.

Rekombinante AAV-Vektorsysteme besitzen anstelle der zwei ORFs, welche für die rep und cap Gene kodieren eine transgene Expressionskassette bestehend aus Transgen und Promotor. Erhalten bleiben nur die beiden ITRs, da sie die einzig nötigen cis Elemente für die Herstellung rekombinanter AAV2-Partikel sind. Die für die Herstellung nötigen rep und cap Proteine werden von einem Helferplasmid im Rahmen der Produktion bereitgestellt. Es entstehen sogenannte „gutless“ Vektorsysteme, welche nicht in der Lage sind, virale Proteine zu generieren und folglich replikationsdefizient sind. Zudem haben sie die Fähigkeit verloren, ortsspezifisch in das Genom zu integrieren, da hierfür das virale rep Protein nötig ist, und verbleiben daher vornehmlich in einem episomalen Zustand<sup>110,111</sup>. Das Ausmaß einer eventuellen Integration aufgrund der vorhandenen ITRs ist momentan stark umstritten. Es sei jedoch eine ungerichtete Integration beispielsweise in aktiven Genregionen von Hepatozyten erwähnt<sup>112, 113</sup>.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Tb4 näher auf seine angiogene und arteriogene Wirkung in vitro sowie in chronischer Ischämie in vivo zu untersuchen und potentielle Signalwege der Tb4-vermittelten Neovaskularisierung zu identifizieren.

Hierfür wurden zunächst *in vitro* Versuche zur Migration und Angiogenese sowie zur Perizytenrekrutierung durchgeführt. Des Weiteren wurde das therapeutische Potential von Tb4 mittels gentherapeutischer Überexpression in zwei Modellen der chronischen Hinterlaufischämie getestet. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studien sollte auch das Expressionsmuster sowie die Effektivität der verwendeten AAVs näher untersucht werden.

Neben der Neuentstehung von Gefäßen wurde vor allem auch deren Reifung näher beleuchtet, da diese nicht nur entscheidend für die Funktionsfähigkeit sondern auch für das langfristige Bestehen der Gefäße unerlässlich ist.

Ein weiteres Anliegen war es, den molekularen Wirkmechanismus von Tb4 detaillierter zu charakterisieren. Hierfür wurde die Rolle der PI3-Kinase gamma mittels „Knockout“-Mäusen untersucht. Die Rolle der PI3-Kinase alpha wurde mittels pharmakologischer Inhibierung analysiert.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Funktion von Tb4 von der Aktinbindedomäne abhängig ist, die nachgeschaltet zu einer Aktivierung des aktinabhängigen MRTF / SRF-Signalweges führt und über potentielle Zielgene Gefäßwachstum induzieren kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

2-Ethoxyethylacetate	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Benzonase, Nuclease	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Cäsiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Ethanol, 75 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Formaldehydlösung, 37%	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Glutaraldehyd, 25 % in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Isopropanol, 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Kaliumhydroxid Plätzchen	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Perchlorsäure, 69-72 %	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Polyethylenamin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
RNALater	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Thiodiglycoll	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Tween 40	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

#### 2.1.2 Geräte

Abzugpumpe	Harvard Apparatus, Soutch Natick, USA
Brutschrank: CB 150; 05-8817 Klasse 3.1	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
C-Bogen, Exposcop 800	Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg, DE
Edelstahlkochgefäß	Perkin Elmer, Überlingen, DE
Fluoreszenzlampe: HBO 50 AC	Carl Zeiss, Jena, DE
Heizblock	Perkin Elmer, Überlingen, DE
Jouan EB55 Benchtop Incubator	Jouan GmbH, Unterhaching, DE
Kryotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Laser Doppler: Model MLDI-2/IR	Moor Instruments, Devon, UK

Lauda Thermostat Typ K2 MGW	Lauda GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, DE
Luminometer G 101	Berthold Technologies USA, LLC
Mikroskop Axiovert 100 Zeiss	Carl Zeiss, Jena, DE
Mikroskop Stemi DV4 SPOT + KL200 Lampe,	Carl Zeiss, Jena, DE
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena, DE
My IQ single color real-time PCR detection system	Biorad Laboratories GmbH, München, DE
Perfusor (Perfusor segura)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Refraktometer	PCE Instruments, Meschede, DE
Rotor: Type 70.1 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Sonikator	Bandelin electronic, Berlin, DE
Tecan Safire 2 microplate reader	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Ultraschallbad ( Sonorex TK52H)	Bandelin electronic, Berlin, DE
Ultra-Turrax	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Ultrazentrifuge: Optima™ L-80XP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
UV-Visible Spectrophotometer	Amersham Pharmacia, Freiburg, DE
Vakuumsauger, Laboport	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Vaporisator: Vapor 19.3	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE
Vortexer (Vortex-Genie 2 )	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage: Sartorius CP64-OCE	Sartorius, Göttingen, DE
Wärmekammer	Selbsterstellung
Wärmeplatte mit Thermometer	FHC. Inc., Bowdoinham, USA
Zentrifuge: Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, DE

### 2.1.3 Histologie

5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Amicon Ultra Filter	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
Antibody Diluent	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Fish Skin Gelatine	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Hydrophoben Stift	Dako GmbH, Hamburg, Deutschland
Kernechtrotlösung 0,1%	Apotheke, München-Innenstadt, DE
Labeling Kit	Biomol GmbH, Hamburg, DE
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Nitrotetrazolium-Blue-Chloride	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, München, DE
Objektträger Thermo Scientific Superfrost®	Plus Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, DE
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Saponin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Natriumtetraborat (B <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Syto 62 red	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Tissue Tek	Firma Sakura Finetek Europe, NL
Tissue Tek® O.C.T. Tm Compound	Firma Sakura Finetek Europe, NL
Tissue Tek 4566 cryomold intermediate	Firma Sakura Finetek Europe, NL

Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vibrant DiI Cell Labeling	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Vibrant DiO Cell Labeling	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-gal)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

### 2.1.4 Zellkultur

70 Ti quick seal Centrifuge Tube	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
$\mu$ -Dish 35mm high, culture insert, ibidi Treat	Ibidi, München, DE
$\mu$ -Dish 35mm high, ibidi Treat	Ibidi, München, DE
$\mu$ -Slide, Angiogenesis, ibidi Treat	Ibidi, München, DE
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Cell-Scraper (Zellschaber) 25cm, Klinge 17cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Claycomb Medium	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Co-culture 0,4 $\mu$ m cell culture insert	BD Pharmingen, Heidelberg
DMEM	Biochrom AG, Berlin, DE
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell GmbH Heidelberg, DE
Eppendorfgefäße	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, DE
GIBCO™ Basal Medium Eagle (BME)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
L-Glutamin (200mM)	Biochrom AG, Berlin, DE
Matrigel Matrix weiß	BD Pharmingen, Heidelberg
Mikrotiterplatte 96-Well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Neomycin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Norepinephrin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
NUNC 96-Well Platte	Thermo Scientific, München, DE
PCR-Tube Stripes	Biorad, California, USA
Pen/Strep Biochrom.	Biochrom AG, Berlin, DE
Präzisionsküvetten	Hellma GmbH & Co KG, Mühlheim, DE
Sample Processing Unit (SPU) Filtersystem	Gaiser, Kappel-Grafenhausen, DE
Satisfaction® Transfection Reagent	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
SupplementMix, Endothel. Cell Growth Medium	Promocell GmbH Heidelberg, DE
SW-28 Tubes	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Trypsin/EDTA 0,05% / 0,02%	Biochrom AG, Berlin, DE
Zählkammern, Fast Read 102	Biosigma, Cona, IT
Zellkulturflaschen 25cm <sup>2</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
Zellkulturschalen, 147,8 cm <sup>2</sup>	Biochrom AG, Berlin, DE
Zellkultur-Testplatten, 6-Well, flach	Biochrom AG, Berlin, DE
Zentrifugenröhrchen, konisch, 15 ml	Biochrom AG, Berlin, DE
Zentrifugenröhrchen, konisch, 50 ml	Biochrom AG, Berlin, DE

### 2.1.5 Operationszubehör

Adenosin	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Atropin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE

## Material und Methoden

---

Bepanthen® Augen und Nasensalbe	Bayer Vital, Bayer Leverkusen, DE
Desinfektionsmittel Cutasept®	Bode Chemie Hamburg, DE
Dorbene vet® 1mg/ml	Fort Dodge Veterinär GmbH Würselen, DE
Falcon Blue Max TM 50 ml	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Fentanyl® -Janssen 0,5 mg Injektionslösung	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DE
Flumazenil-hameln 0,1 mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH Freiburg, DE
Führungsdraht (Größe 0,014, Cordis Corp)	Cordis Corp., Miami, FL, USA
Fluospheres, Blood flow Fluorescent Colour Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Futter Dox S8031-P001 PS M-Z	ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, DE
Futter Spezialdiät Kaninchen	ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, DE
Futter Standard Mäuse	ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, DE
Gentamycin (Gencin)	DeltaSelect GmbH, Dreieich, DE
Hamilton Microliter-Spritze 75RN 5 ul 26S/51/2	Hamilton Company Reno, Nevada, USA
Heparin-Natrium (500 I.E. / ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Iopamidol Kontrastmittel (Solutrast 370)	Byk Gulden, Konstanz, DE
Isofluran (Forene 100% (V/V)) 250 ml	Abbott GmbH Wiesbaden, DE
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE
Katheter (4 French)	Cordis Corp., Miami, FL, USA
Ketaminhydrochlorid	Inresa, Freiburg, DE
Kompressen, Verband	NOBA Verbandsmittel Danz GmbH, Wetter, DE
Ligaturen: Pearsalls Limited silk braided suture	Pearsalls Limited, Taunton, UK
Ligaturen: Perma-Hand Seide 12x0,45	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE
Midazolam -ratiopharm® 15mg / 3ml	Ratiopharm GmbH Ulm, DE
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Nahtmaterial: 6-0 RB-1 Ethicon VICRYL V302	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE
Nahtmaterial: Supolene DS40, 3.5 metric	Resorba, Nürnberg, DE
Naloxon Inresa 0,4mg/1ml	Inresa Arzneimittel GmbH Freiburg, DE
Natrium-Citrat 3,13%	Eifelfango, Bad-Neuenahr-Ahrweiler, DE
Operationsinstrumente	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Pflaster (Leukoplast Hospital 5cm x 9,2 m)	SSN medical, Hamburg, DE
Povidon-Jod	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
PVK 22 G (Introcan Safety W, 22G*1)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
PVK 24 G (BD Neoflon 24G*0,75)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Revertor 5mg/ml	CP-Pharma GmbH Burgdorf, DE
Schleuse (Radifocus Introducer II, 4F)	Terumo Europe N.V., Leuven, Belgien
Skalpelli: Feather Disposable Scalpel No. 20	Feather Safety Raser Co, LTD., Osaka, Japan
Skalpelli: Feather Disposable Scalpel No. 22	Feather Safety Raser Co, LTD., Osaka, Japan
Spritzen 2ml, 5ml, 10ml, 50ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Spritzen Omnican® 100	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Sterile Handschuhe	Flex Plus, MaiMed GmbH & Co., Neuenkirchen, DE
Tramadolhydrochlorid	Grünenthal Ges. m. b. H., Brunn am Gebirge, AT
Wattestäbchen	Danz GmbH und Co KG, Wetter, DE
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE

### 2.1.6 Kits

Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Dnase I (Rnase free)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Dual Luciferase Kit	Promega GmbH, Mannheim, DE
Green Supermix iQ™ SYBR®	Biorad Laboratories GmbH, München, DE
PCR Kit (Virus)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Reverse Transkription System	Promega GmbH, Mannheim, DE
RNAeasy Mini Kit 50	Qiagen GmbH, Hilden, DE
TaqMan Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, DE

### 2.1.7 Software

Image J 1.43u	National Institute of Health, USA
LSM 5 Image Browser	Carl Zeiss, Jena, DE
MyIQ exe. Version: 1.0.410 system software	Biorad Laboratories GmbH, München, DE
Software Axiovision Version 4.7	Carl Zeiss, Jena, DE
Software Version 5.1 Laser Doppler	Moor Instruments, Devon, UK
SPSS v 19.0.0.1	SPSS Inc., Chicago, USA
WinGlow	Berthold Technologies USA, LLC
XFluor4-Software Version 4.62	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich

### 2.1.8 Lösungen und Puffer

#### **PBS:**

---

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g
Aqua dest.	1000ml
pH-Wert von 7,4	

---

#### **Kalilauge:**

---

KOH	224,6 g
Aqua dest	1000 ml
2% ige Tweenlösung	10 ml

---

#### **Phosphatpuffer:**

---

Di-Kaliumhydrogenphosphat-trihydrat	29,8 g
Kaliumhydrogenphosphat	5,55 g
Aqua dest.	1000 ml
pH-Wert von 7,4	

---

**TMN-Puffer:**

Tris	50 mM
MgCl	1 mM
pH-Wert von 7,4	

**Perchlorsäure:**

Perchlorsäure 70%	570 µl
Thiodiglycol	100 µl
Aqua dest.	10 ml
pH-Wert < 2	

**Saponinlösung:**

Fish Skin Gelatine	0.2%
Bovines Serum Albumin	0.5%
Saponin	0.1%
gelöst in PBS	

**2.1.9 Primer**

<b>Zielgen:</b>	<b>Oligonukleotid forward:</b>	<b>Oligonukleotid backward:</b>
GAPDH	TCTTGGGCTACACTGAGGAC	ACCAGGAAATGAGCTTGACA
Tb4	ATGTCTGACAAACCCGATA	CTTGCTTCTCTTGTTCAA
CCN1 (CYR61)	GCTAAACAACCTCAACGAGGA	TCTGACTGAGCTCTGCAG
CCN2 (CTGF)	CCCTAGCTGCCTACCGACT	CATCCACAGGTCTTAGAACAGG
Bgh	TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT	TGGGAGTGGCACCTTCCA

**2.1.10 Antikörper**

		<b>Verdünnung:</b>
anti MRTF A/B, rabbit IgG	Guido Posern	1:50
Anti-NG2, rabbit IgG	Chemicon GmbH, Nürnberg, DE	1:200
Anti-rabbit IgG, Alexa 488	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE	1:200
Bovine anti-rabbit, FITC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	1:50
CD31 / Pecam 1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	1:50
CD31 / Pecam 1	Acris, Herford, DE	1:200
Cy3- donkey anti-rat IgG	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK	1:200
Donkey anti-goat-Rhodamine	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE	1:50

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinien

#### 2.2.1.1 Kultivierung von HMEC Zellen

Für die *in vitro* Versuche wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMECs) verwendet. Diese wurden in DMEM-Medium kultiviert und alle 2-3 Tage gesplittet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, und dann 2 Minuten bei 37°C im Brutschrank mit Trypsin inkubiert. Die Zellablösung wurde durch Zugabe von DMEM-Medium gestoppt und die Zellen nach einem weiteren Waschschrift mit PBS auf zwei Kulturflaschen aufgeteilt.

#### **DMEM Medium:**

---

DMEM	500 ml
10% FBS	50 ml
1% Pen/Strep	5 ml

---

#### 2.2.1.2 Kultivierung von HL-1 Zellen

Die HL-1-Zelllinie ist eine von murinen kardialen Muskelzellen generierte Zelllinie, welche die Eigenschaft besitzt, trotz Proliferation in Kultur die phänotypischen Eigenschaften adulter Kardiomyozyten beizubehalten<sup>114</sup>. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben gesplittet und in speziellem HL1-Claycomb Medium kultiviert.

#### **HL-1 Claycomb Medium:**

---

Claycomb Medium	435 ml
10 % Fetales Kälberserum	50 ml
1 % Penicillin / Streptomycin	5 ml
1 % L-Glutamine 2mM	5 ml
1 % Norepinephrin 0.1mM	5 ml

---

#### **Norepinephrin 0.1mM:**

---

Ascorbinsäure	0,59 g
Aqua dest.	100 ml
Norepinephrin	320 mg

---

#### 2.2.1.3 Kultivierung von HEK-293 Zellen

Die HEK (Human Embryonic Kidney)-293 Zelllinie ist eine aus humanen embryonalen Nierenzellen generierte Zelllinie, welche zusätzlich virale Genomanteile des Adenovirus-5

beinhaltet. Sie eignet sich besonders gut für die Produktion rekombinanter Adeno- und Adeno-assoziiierter Viren. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben kultiviert und gesplittet.

### 2.2.1.4 Kultivierung von ATCC- CL-226 Zellen

Für die Co-Kultur Versuche mit direktem Zell-Zellkontakt wurde die ATCC-CL-226 Zelllinie verwendet. Diese ist eine murine Fibroblastenzelllinie, welche in Co-Kultur mit Endothelzellen perizytenähnliche Eigenschaften aufweist und somit als simplifizierte Perizytenzelllinie angesehen werden kann<sup>115</sup>. Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.1 gesplittet und in folgendem Medium kultiviert:

#### **ATCC-CL-226 Medium:**

GIBCO™ Basal Medium Eagle (BME)	500 ml
10 % Fetales Kälberserum	55 ml
1 % Penicillin / Streptomycin	5 ml
1 % L-Glutamin 2mM	5 ml
NaHCO <sub>3</sub> (Stammlösung 1,5g / ml)	5,7 ml

### 2.2.2 Transfektion von Zellen

Die Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung folgender Transfektionsreagenzien:

Das kationische Polymer *SatisFection* wurde für die Transfektion der HMECs (Matrigelversuche und Migrationsversuche) verwendet. Hierfür wurden 100 µl serum- und antibiotikafreies DMEM Medium zusammen mit 3 µl *SatisFection*-Reagenz in einem Eppendorfgefäß vermischt. Parallel wurden 2 µg DNA des gewünschten Plasmids in einem separaten Eppendorfgefäß mit serum- und antibiotikafreiem DMEM vermischt. Folgend wurde das verdünnte Transfektionsreagenz tropfenweise mit der verdünnten DNA vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das fertige Gemisch wurde dann tropfenweise auf die jeweiligen Zellkulturplatten verteilt und diese vorsichtig geschwenkt.

Für die Transfektion von HL-1 Zellen sowie sämtliche Luciferaseassays wurde das kationische Liposom *Lipofectamine* verwendet. Zunächst wurden 10 µl *Lipofectamine* in 250 µl serumfreiem Medium verdünnt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden 4 µg Plasmid-DNA ebenfalls in 250 µl serumfreiem DMEM gelöst und dann die beiden Ansätze vermischt und gevortext. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch auf die jeweiligen Zellen gegeben.

### 2.2.3 Nachweis der Kapillarbildung in vitro: Matrigel-Angiogeneseassay

Zum Zeitpunkt 0 wurden HMEC Zellen aus der zuvor beschriebenen Kultur mit sterilem PBS gewaschen und dann mit Hilfe von Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden dann auf einer 6-Well Platte ausplattiert und nach 24 Stunden sowie 70-80 prozentiger Zellkonfluenz wie unter 2.2.2 beschrieben transfiziert.

24h später wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin abgelöst. Die Zellzahl wurde unter Verwendung einer Zellzählkammer bestimmt und eine Endkonzentration von 10.000 Zellen pro 50 µl „Endothelial Growth Medium“ hergestellt. Das Matrigel wurde bereits 8h zuvor zusammen mit Pipettenspitzen bei 4°C kaltgestellt und die µ-Angiogenese-Slides im Brutschrank präinkubiert. Folgend wurden 10 µl 4°C kaltes Matrigel pro Well ausplattiert. Danach wurden 50 µl der einzelnen Zellgemische pro Well hinzupipetiert und die Slides für 18h im Brutschrank inkubiert. Nach 18h wurden die Slides unter dem Mikroskop abfotografiert und die Anzahl der Ringbildungen ausgezählt. Diese wurden als Ringformationen pro Gesichtsfeld (RF/GSF) dargestellt.

### 2.2.4 Myozyten-Endothelzell Co-Kulturassay auf Matrigel

Für die Co-Kulturversuche wurden Tb4 stabil überexprimierende HL-1-Zellen verwendet. Die Gewinnung dieser stabilen Zelllinie erfolgte durch Transfektion mit einem für Tb4-kodierenden Plasmid, welches zudem eine Neomycinresistenz enthielt. Folgend wurden die Zellen über 8 Wochen mittels Zugabe von Neomycin selektioniert.

#### **HL1-Medium stabile Zellen:**

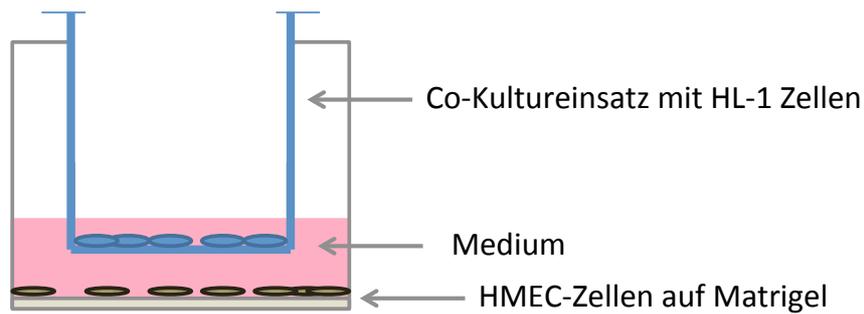
---

HL1-Medium	50 ml
G418 Neomycin (Stammlösung 400µg/ml)	400 µl

---

48h vor Versuchsbeginn wurden HL-1-Zellen in „Culture Inserts“ ausgesät und diese in eine 24-Well Platte gesetzt. Nach 24h wurde bei Bedarf ein zusätzliches Transgen als Plasmid mittels *Lipofectamine* transfiziert.

Nach weiteren 24h wurde das Medium gewechselt und die Inserts mit den inzwischen adhären HL-1-Zellen über die auf Matrigel sitzenden HMEC-Zellen am Boden einer 24-Well Platte gesetzt (s. Abb. 6). Hierdurch wurde ein direkter Zellkontakt zwischen den beiden Zelltypen vermieden, das Medium konnte jedoch frei diffundieren. Bei Bedarf wurde ein inhibitorischer Tb4-Antikörper in das Medium hinzupipetiert. Nach 18h Inkubation wurden die Inserts abgenommen, die Endothelzellen mikroskopiert und abfotografiert und die Anzahl an Ringformationen pro Gesichtsfeld quantifiziert.



*Abb. 6: Versuchsaufbau der Co-Kulturen von HL-1-Zellen mit HMEC-Zellen. Die beiden Zelltypen haben keinen direkten Kontakt und stehen nur über das frei diffundierende Medium in Verbindung.*

### 2.2.5 Endothelzell-Perizyten Co-Kulturassay auf Matrigel

HMEC Zellen wurden zunächst auf einer 6-Well Platte ausgesät und nach 24h Inkubation mit dem jeweiligen Transgen vortransfiziert. Nach weiteren 24h wurden die Zellen abgelöst und durch Zugabe des Farbstoffes (DiI) in einer Konzentration von  $15 \mu\text{l} / 10^6$  Zellen rot gefärbt. Nach 45 Minuten Inkubation bei  $37^\circ$  wurden diese durch Abzentrifugieren bei 1200 rpm über 5 Minuten mit PBS gewaschen und folgend wie unter 2.2.3 auf Matrigel ausgesät. Die Zellen wurden für 18h inkubiert, so dass sich ringähnliche Strukturen ausbildeten. Folgend wurden die ATCC-CCL-26-Zellen mithilfe von DiO grün gefärbt und pro Well 2000 Zellen hinzupipettiert. Nach 2h sowie 24h Co-Kultur wurden die Zellen in 10x Vergrößerung abfotografiert und die Anzahl an Perizyten pro Ringformation ausgezählt

### 2.2.6 Migrationsversuche

Für die Migrationsversuche wurden HMEC-Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben transfiziert. Die Zellzahl wurde auf  $5 \times 10^5$  pro ml Medium eingestellt und hiervon wurden  $70 \mu\text{l}$  in jedes Well eines „Culture-Inserts“ gegeben und 24h bis zum Erreichen einer vollständigen Zellkonfluenz abgewartet. Dann wurde das Insert mithilfe einer sterilen Pinzette entfernt, die Petrischale mit 1 ml serumfreiem DMEM Medium aufgefüllt und zunächst ein Foto der Ausgangssituation in 10x Vergrößerung angefertigt. Die Zellen wurden dann im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und Folgeaufnahmen wurden zu den Zeitpunkten 6h, 22h und 26h erstellt. Für die Auswertung der Migrationsversuche wurden die Bilder in Image J 1.43 importiert und die freie Fläche zwischen den konfluenten Zellrasen berechnet.

### 2.2.7 MRTF-HL1-Färbung

HL-1-Zellen wurden auf „ibidi-Slides“ ausplattiert und nach 24h transfiziert. Nach weiteren 24h wurde das Medium abgesaugt, durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen erneut für 24h im Brutschrank inkubiert.

Dann wurden die lebenden Kerne mit Syto62 angefärbt. Hierfür wurde 1µl Syto62 pro Platte für 30 Minuten in das vorhandene Medium gegeben. Danach wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Sodann wurden die Zellen umgehend in frischem 2%-igen PFA für 30 Minuten fixiert und danach erneut mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen und zur Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran wurde jeweils 1ml Saponinlösung hinzugegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Slides dreimal mit PBS gewaschen und der in Saponinlösung verdünnte MRTF-Antikörper hinzugegeben. Dieser hatte eine Einwirkzeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur. Die Slides wurden erneut dreifach in PBS gewaschen gefolgt von einer einstündigen Inkubation des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur. Es folgten drei Waschungen in PBS, wonach die Zellfärbung unter einem konfokalen Mikroskop analysiert wurde. Die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzaktivität im Zellkern erfolgte mithilfe der LSM-5 Image Software.

### 2.2.8 Luciferaseaktivitäts-Assay

Für die Bestimmung der MRTF-abhängigen Luciferase Aktivität wurden HMEC-Zellen und HL-1-Zellen auf einer 12-Well Platte ausplattiert (35.000 Zellen pro Well). Nach 24h erfolgte die Transfektion der Zellen mittels *Lipofectamine*. Folgender Transfektionsansatz wurde pro Well hergestellt:

<b>Transfektionsansatz Luciferase-Assay:</b>	
p3DA.Luc firefly luciferase (SRF Reporter)	20 ng
ptkRL (Renilla luciferase Reporter)	50 ng
Plasmide: pcDNA / Tb4 / Tb4-Mutante	930 ng

Das p3DA.Luc „firefly“ Luciferase-Plasmid wurde freundlicherweise von Guido Posern (Universität Halle/Saale) zur Verfügung gestellt. Dieses Konstrukt weist einen SRF-Luciferase Reporter auf, der durch Bindung von MRTF zu einer Aktivierung der „firefly“ Luciferase führt, welche nach Substratzugabe mittels Luminometer gemessen werden kann. Die parallele Transfektion der „Renilla“ Luciferase dient als Transfektionskontrolle.

24h nach Transfektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und serumfreies Medium hinzugegeben. Es folgte erneut eine Inkubation für 24h. Folgend wurden

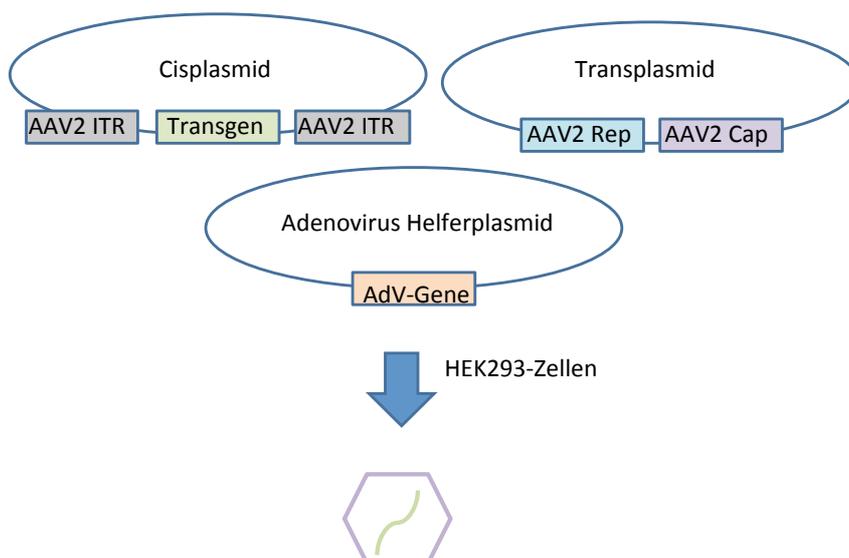
die Platten auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Pro Well wurden 100µl Lysepuffer hinzugegeben und die Platten für 5-10 Minuten erneut auf Eis gestellt. So dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Reinigung des Lysates wurde dieses für 10 Minuten bei 4°C und 13.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Von dem gewonnenen Lysat wurden jeweils 20 µl in eine weiße 96-Well-Platte pipettiert. Zunächst erfolgte die Messung der „firefly“ Luciferaseaktivität. Hierzu wurden zeitgleich mit einer Multiwell-Pipette 45 µl LARII (Luciferase Assay Reagent II) Lösung auf die Lysate pipettiert und vermischt. Die Platte wurde in das Luminometer gestellt und die erste Messung durchgeführt. Folgend wurden pro Well 45 µl „Stop and Glow-Reagenz“ hinzupipettiert und die zweite Messung der „Renilla“ Luciferase gestartet. Mithilfe der Win Glow Software wurden die Messwerte in eine Excel-Tabelle überführt und das Verhältnis der „firefly“ Luciferase pro „Renilla“-Aktivität berechnet.

### 2.2.9 Produktion rekombinanter Adeno-assoziiierter-Viren

#### 2.2.9.1 Vorbereitung der Zellen für die Transfektion

Die Produktion rekombinanter AAV-Vektoren, welche ein gewünschtes Zielprotein codieren basiert auf einer Tripeltransfektionsmethode (s. Abb. 7). Hierbei werden drei Plasmide gezielt in einer Zellen zusammengeführt:

1. Ein Plasmid, welches die relevanten Information des Helfervirus enthält
2. Ein Plasmid mit den nötigen AAV-Anteilen, so auch den rep und cap Strukturen
3. Ein Plasmid mit dem Zielgen inklusive Promotor umrandet von den beiden ITRs<sup>116</sup>



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Tripeltransfektion zur Herstellung rekombinanter AAVs in HEK293-Zellen.

Zunächst wurden HEK293-Zellen auf fünfzig Platten, à 22,1 cm<sup>2</sup> gesplittet und bis zu einer Konfluenz von 70-80 Prozent kultiviert. Zwei Stunden vor Transfektion wurde das Medium über einen Vakuumbzug durch eine 2ml-Aspirationspipette abgesaugt und frisches serumfreies Medium vorsichtig hinzugefügt. Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels Polyethylenimin (PEI).

Das hierfür nötige Transfektionsgemisch wurde wie folgt hergestellt:

Für fünfzig Platten wurden 40ml serumfreies Medium in einem Falcontube vorgelegt. Hierzu wurden folgende Plasmide gegeben:

**Transfektionsgemisch:**

---

pA Δ F6, Adenovirus Helferplasmid, stellt die nötigen adenoviralen Proteine für die AAV-Herstellung bereit	1300 µg
p 600 Transplasmid, enthält die rep und cap Gene des AAV	650 µg
Cisplasmid, liefert das Transgen und die beiden ITR-Regionen	650 µg

---

Das Gemisch wurde gevortext und folgend auf vier Falcontubes à 10ml aufgeteilt. Zu jedem Falcon wurden erneut 15ml serumfreies Medium hinzupipettiert und gevortext. Hiernach erfolgte die Zugabe von 1300µl PEI (1µg/µl) pro Ansatz und ein weiterer Vortexschritt wurde durchgeführt gefolgt von einer 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Für die Transfektion wurden nun 2,1ml des Transfektionsgemisches gleichmäßig über jede Platte verteilt und diese vorsichtig geschwenkt. 4h nach Transfektion wurde das Medium durch Zugabe von 5ml DMEM mit 50% FCS und 1% Pen/Strep substituiert.

### 2.2.9.2 Ernte und Aufreinigung der Viren

24 Stunden nach Transfektion wurde das Zellmedium erneut gewechselt. Weitere 48 Stunden später konnten die Viren geerntet werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Falcontube überführt. Danach wurden diese für 15 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet über Nacht bei -80° eingefroren.

Zu Beginn der Virusaufreinigung wurden die gefrorenen Zellen für 10 Minuten bei 37°C aufgetaut. Danach wurde das Pellet in 27 ml TMN-Puffer resuspendiert, auf ein Endvolumen von 35ml eingestellt und auf Eis gesetzt. Es folgte die Sonifizierung des Zelllysates für dreimal 30 Sekunden bei „output“ 5 und 30% im Eiswasserbad. Zum Abbau freier RNA und DNA wurden 3µl Benzonase (Endkonzentration 25U/ml) hinzugefügt und das Lysat vorsichtig geschwenkt und dann für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde das Lysat alle 5 Minuten einmal umgedreht. Folgend wurden zum Aufschluss der Zellen 1,25ml 10% Desoxycholsäure hinzugefügt und das Lysat vorsichtig invertiert. Es folgten 10

Minuten Inkubation bei 37°C, gefolgt von 15 Minuten Inkubation auf Eis. Zur Reinigung des Lysates wurde dieses für 15 Minuten bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues steriles Falcontube überführt. Die Aufreinigung der Viruspartikel erfolgte durch Ultrazentrifugation und Dichtebestimmung über einen Cäsiumchloridgradienten. Hierfür wurden pro Milliliter Überstand 0,454g CsCl hinzugegeben und regelrecht vermischt, das Endvolumen betrug ca. 32-34ml. Zur Erstellung eines 2-Tier Cäsiumchloridgradienten wurden je 9ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,41ρ und 1,61ρ in zwei SW-28 Tubes gefüllt. Das weniger dichte Gemisch wurde hierbei zuerst pipettiert und danach das dichtere darunter pipettiert. Danach wurden je 16-17ml des Zelllysates vorsichtig hinzugegeben ohne den Gradienten zu zerstören. Es folgte eine Ultrazentrifugation mit 25.000 rpm über 18-20h bei 15°C. Durch die Ultrazentrifugation sinken die Viruspartikel nach unten, wobei der Gradient so hergestellt wurde, dass die Dichte der Viruspartikel ungefähr der durchschnittlichen Dichte des Gradienten entspricht. Nach der Zentrifugation wurde jeder Ansatz in 1ml Fraktionen in Eppendorfgefäße überführt.

Aus jedem Eppendorfgefäß wurden 5µl abgenommen und der Refraktionsindex über ein Refraktometer bestimmt. Fraktionen, welche einen AAV enthalten, sollten einen Brechungsindex zwischen 1,362-1,373 aufweisen. Außerhalb des Zielindex gelegene Fraktionen wurden verworfen. Im Zielbereich gelegene Fraktionen wurden vereinigt, in zwei 70 Ti-quick-seal Röhrchen gegeben und bei Bedarf mit 1,41ρ CsCl aufgefüllt. Die Röhrchen wurden mit einem Heizstab und einer Öse verschlossen und bei 60.000 rpm für 20-24h bei 15°C erneut ultrazentrifugiert.

Folgend wurden die verschlossenen Tubes mit einer 16G Nadel am oberen Ende angestochen und jeweils 1ml abgezogen und auf 2 Eppendorfgefäße verteilt. Danach wurde das Röhrchen mit einem Skalpell eröffnet und von dem restlichen Ansatz Fraktionen à 500µl auf Eppendorfgefäße verteilt. Von diesen wurde erneut der Refraktionsindex bestimmt (siehe oben) und nur Fraktionen im Zielindex weiter verwendet. Eine Ultrazentrifugation wurde erneut durchgeführt, und die Fraktionen wieder in 500µl Ansätze unterteilt. Der Zielbereich des Brechungsindex wurde nun zwischen 1,364-1,371 festgelegt. Fraktionen außerhalb des Zielbereiches wurden verworfen. Im Zielbereich liegende Fraktionen wurden letztendlich in einem Falcontube vereinigt.

### 2.2.9.3 Befreiung von Cäsiumchlorid

Für die Entfernung des Cäsiumchlorids wurden Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units verwendet, diese wurden zunächst mit PBS benetzt. Nach Befeuchtung wurden 4-5ml PBS vorgelegt und das Virusgemisch in den Filter pipettiert. Das Endvolumen von ca. 12ml wurde

für 15 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Konzentrat von etwa 2ml wurde mit 12ml PBS gewaschen und erneut durch Zentrifugation auf 2ml konzentriert.

### 2.2.9.4 Quantifizierung der Viruskonzentration mittels quantitativer Echtzeit-PCR

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR). Hierbei wurde der unbekannte Titer des rekombinanten AAV mit mehreren seriellen Verdünnungen eines Standards verglichen.

Zur Vorbereitung der qPCR wurden 10µl der Viruslösung abgenommen und ein DNase Verdau vorgenommen. Hierfür wurde das DNase Amplification Grade Kit verwendet wovon 4µl DNase, 10µl DNase Puffer und 76µl H<sub>2</sub>O zur Viruslösung hinzupipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Sodann wurden 2µl 25mM EDTA zur Inaktivierung der DNase hinzugefügt gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 65°C.

Folgend wurde das Gemisch auf Eis gestellt.

Die Proben wurden zusammen mit dem TaqMan-Mix und einem Primer für das virusspezifische Bgh-Gen in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Von den AAV-Proben mit unbekanntem Virustiter wurden 2 Verdünnungen verwendet, 1:100 und 1:1000 und mit einer Standardserie eines CMV-Vektor-Plasmids in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Standardserie bestand aus einer seriellen Verdünnung über 4 Stufen auf einer logarithmischen Skala zwischen 0,001–1ng Plasmid. Nach Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR wurde mithilfe der PCR-Kurven des Standards eine Standardkurve erstellt. Auf dieser konnte mithilfe der Zyklusnummer des zu untersuchenden AAVs dessen Virustiter abgelesen werden.

## 2.2.10 Mausmodell der Femoralisligatur

### 2.2.10.1 Versuchstiere

#### **Überblick (Maus)**

---

C57 Black 6 Mäuse	Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, DE
PI3-Kinase-γ KO - Mäuse	Zucht Walter Brendel Zentrum für experimentelle Medizin
PI3-Kinase-γ wt-Mäuse	Zucht Walter Brendel Zentrum für experimentelle Medizin
Tomato-Mäuse	Zucht Medizinische Klinik und Poliklinik I, Campus Großhadern

---

Sämtliche Versuchsmäuse wurden bei kontrolliertem 12h Tag-Nacht-Zyklus in Einzelkäfigen untergebracht und hatten freien Zugang zu Wasser und einem Standardfutter. Nach der Lieferung der Tiere hatten diese mindestens zwei Tage Zeit um sich zu akklimatisieren, bevor sie in den Versuch genommen wurden.

Alle Tierversuche wurden im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin oder im Forschungslabor der Medizinischen Klinik I, Campus Großhadern durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt und kontrolliert. Tierversuchsnummer: 130-08.

Im Rahmen der tierexperimentellen Versuchsreihen wurden 6-8 Wochen alte, 25-30g schwere, männliche Mäuse des Hintergrundes C57/Bl6 verwendet.

Des Weiteren wurde ein transgener Mausstamm untersucht, in welchem die PI3-Kinase Gamma (PI3-K- $\gamma$ -KO) durch ubiquitären „Knockout“ ausgeschaltet ist<sup>32</sup>. Da diese Mäuse keinen C57/Bl6 Zuchthintergrund besitzen, sondern dem Mausstamm SV-129 entstammen, wurden als regelrechte Kontrolltiere die Geschwister-Wildtypmäuse (wt) desselben Stammes verwendet. Die Schwanzspitzen der PI3-K- $\gamma$ -KO und PI3-K- $\gamma$ -wt-Mäuse wurden mittels PCR auf ihren Genotyp hin untersucht und nur gesicherte „Knockout“ Mäuse für Versuche verwendet.

Ein weiterer Mausstamm, welcher für Nachweise der viralen Transduktion in vivo verwendet wurde, waren doppeltransgene Mäuse, sogenannte *ACTB-tdTomato,-EGFP* „Tomato“-Mäuse (freundlicherweise von Ralf Adams, Max Planck Institut für molekulare Biomedizin, Münster, zur Verfügung gestellt).

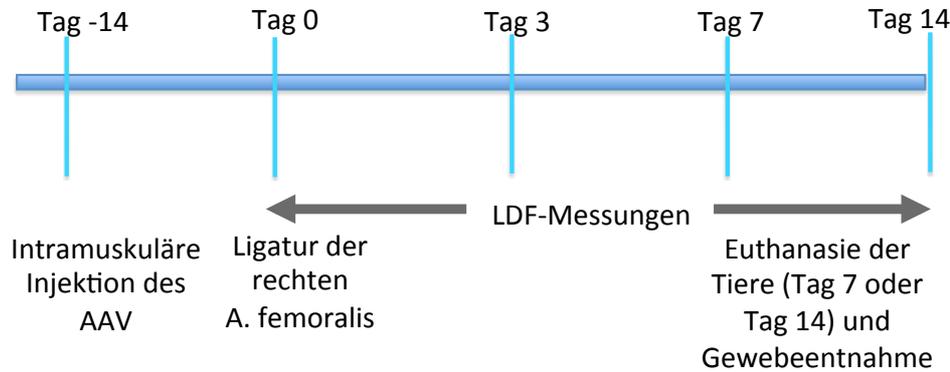
Das Prinzip dieser Mäuse basiert auf einem Cre/loxP-System, welches das selektive Ausschneiden einzelner DNA-Sequenzen ermöglicht. Als Cre bezeichnet man dabei die Cre-Rekombinase, ein Enzym welches die Spaltung und Verknüpfung von DNA katalysiert. Die loxP-Regionen dienen der Cre als Erkennungsmotiv.

Tomato-Mäuse besitzen eine homozygote membran-spezifische tdTomato (mT)-Kassette beidseits flankiert von loxP-Regionen. Bei Abwesenheit einer Cre-Rekombinase kommt es zur regelrechten Transkription der tdTomato-Kassette und folgend zur Expression roter Fluoreszenz in allen Zelltypen. Die Anwesenheit einer Cre-Rekombinase resultiert im Schneiden der DNA-Sequenz im Bereich der loxP-Stellen und es kommt zum Verlust der mT-Kassette. Dies führt in Tomato-Mäusen dazu, dass es zum Ablesen der nachgeschalteten EGFP (mG) Kassette kommt, und zuvor rot fluoreszierende Zellen nun einen grünen Farbstoff exprimieren. Durch dieses doppelfluoreszierte System kann histologisch gezielt die Anwesenheit und Aktivität einer Cre-Rekombinase untersucht werden.

### 2.2.10.2 Überblick des Mausmodells

Das durchgeführte Mausmodell ist eine weitverbreitete Methode zur Untersuchung von Angio- und Arteriogenese in vivo<sup>117</sup>. Hierbei wird die Arteria (A.) femoralis eines Hinterlaufes ligiert und folgend Laser-Doppler-Messungen zur Bestimmung der Perfusion durchgeführt. Aufgrund der oben beschriebenen Expressionsdynamik des AAV, wurde dieser

bereits 14 Tage vor Beginn des Versuches intramuskulär über repetitive Mikroinjektionen à 5 µl in den betroffenen Hinterlauf injiziert. Der Versuchsablauf ist folgend dargestellt:



**Abb. 8:** Darstellung des Versuchsablaufs des Mausmodells der chronischen Hinterlaufischämie

### 2.2.10.3 Anästhesie und Durchführung der Femoralisligatur

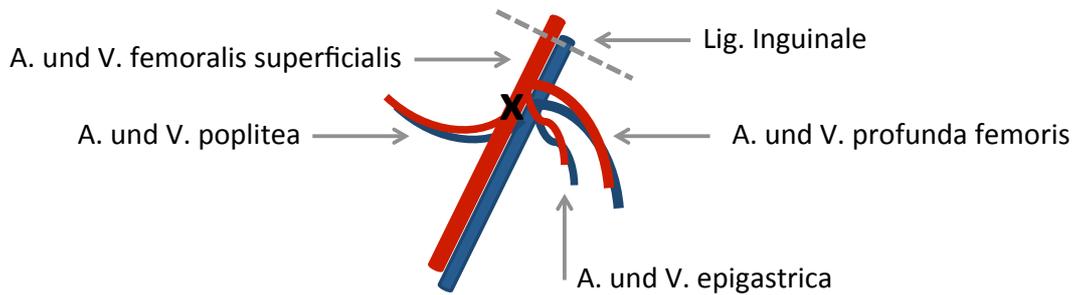
Die Versuchstiere wurden 10 Minuten vor Beginn des operativen Eingriffes durch subkutane Injektion von 150 µl Narkosegemisch sediert.

#### **Narkosekombination (Maus):**

Midazolam	900 µl
Fentanyl	900 µl
Dorbene	155 µl

Zur Prophylaxe von Hornhautschäden wurden die Augen mit einer dünnen Schicht *Bepanthen* Salbe bedeckt. Die Maus wurde auf einem beheizten OP-Tisch positioniert und mit einer rektalen Temperatursonde versorgt. Die Körpertemperatur wurde während der gesamten Operation überwacht und bei Bedarf mittels Regulation über eine Wärmeplatte angepasst. Nach Überprüfung der Sedierung durch Setzung eines Schmerzreizes, wurden zunächst die Innenseiten des Hinterlaufs rasiert und mit *Cutasept* ausgiebig desinfiziert. Im Anschluss wurde mithilfe einer Schere eine etwa 5mm große Hautinzision am rechten medialen Hinterlauf vorgenommen. Wegen der geringen Größe des Operationsgebietes wurden alle folgenden Schritte unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Die Haut wurde vorsichtig beiseite gelegt, der subkutane Fettkörper abpräpariert und der femorale Gefäßnervenstrang aufgesucht. Dieser wurde mobilisiert und die Femoralarterie wurde sorgsam von dem begleitenden Nerv und der parallelen Vene getrennt. Die Ligatur der A. femoralis wurde stets distal des Abganges der A. epigastrica und proximal des Abganges der A. poplitea gesetzt (s. Abb. 9). Hierfür wurde die Arterie zwischen den Abgängen zunächst mit einem Faden umschlungen und dann dreifach verknotet. Der Faden wurde gekürzt und das

Operationsgebiet mit NaCl gespült. Danach wurde die Wunde durch zwei Rückstichnähte nach Donati verschlossen.



**Abb. 9:** Dargestellt ist das Operationsgebiet des rechten Maushinterlaufs. Rot = arterielle Gefäße, blau= venöse Gefäße, X=Gebiet der Ligatur der A. femoralis superficialis.

Um eine mögliche Manipulation der Experimente durch den Prozess der Operation zu minimieren wurde am kontralateralen Hinterlauf eine Shamoperation vorgenommen. Hierbei wurde die linke Femoralarterie identisch präpariert, freigelegt und mit einem Faden umschlungen, jedoch nicht verknötet. Wie bereits zuvor rechtsseitig wurde auch hier das Operationsgebiet gespült und die Wunde verschlossen.

Postoperativ erhielten die Versuchstiere subkutan 150µl der Aufwachkombination, um die bestehende Narkose zu antagonisieren.

**Antagonisierung (Maus):**

---

Flumazenil	500 µl
Naloxon	300 µl
Revertor	50 µl

---

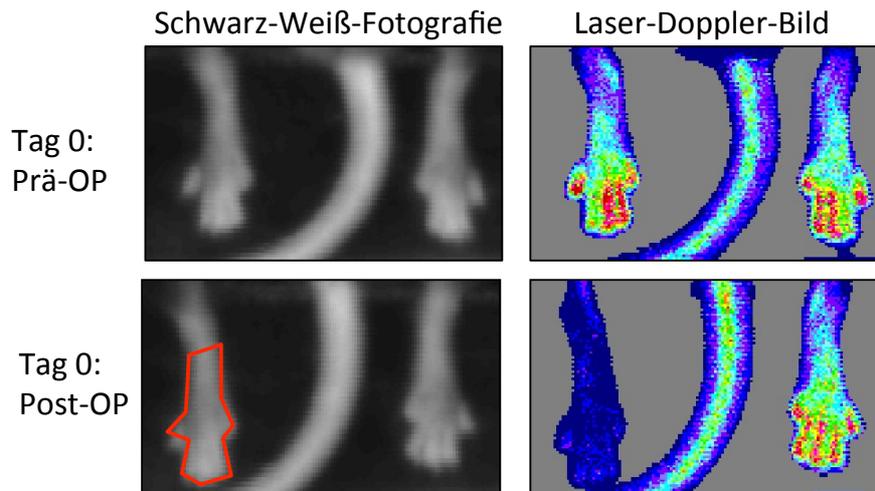
Die Mäuse wurden dann zurück in den Käfig gesetzt und bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

2.2.10.4 Laser Doppler Perfusionsmessung

Die Perfusionsmessung mittels Laser Doppler ist eine nichtinvasive Möglichkeit zur Bestimmung der Durchblutung. Hierbei bedient man sich des Dopplereffekts, welcher die Frequenzänderung bei Lichtreflektion von bewegten Teilchen im Gegensatz zu unbewegten Teilchen beschreibt. Unter Betrachtung eines definierten Bereichs und der Annahme, dass der Hämatokrit des fließenden Blutes konstant bleibt, entspricht die Intensität des reflektierten Lichts der Anzahl der bewegten Teilchen. Hieraus erstellt die Software des Laser Dopplers nun ein farbkodiertes Bild, welches die Gewebsdurchblutung widerspiegelt. Zusätzlich konstruiert die Software eine Schwarzweißfotografie (s. Abb. 10), die der Bestimmung des Messbereiches diene. Der Messbereich wurde an beiden Hinterläufen identisch mit einer Fläche von 60 Einheiten festgelegt und die Durchblutung des rechten Beins als relativer Wert

zum linken Bein angegeben (R/L-Quotient). Zusätzlich wurde ein sogenannter Hintergrundwert abgezogen, welcher durch Messung einer toten Maus des selbigen Stammes ermittelt wurde.

Die Messungen wurden präoperativ und postoperativ in Narkose durchgeführt sowie mithilfe einer Isofluran-Kurznaarkose an den Tagen 3 und 7. Die narkotisierte Maus wurde hierfür 10 Minuten in eine auf 37° temperierte Wärmekammer gelegt, um eine eventuelle temperaturabhängige Vasokonstriktion zu kompensieren.



**Abb. 10:** Laser Doppler Beispielbilder in schwarz-weiß und farbkodiert. Oben präoperativ, unten postoperativ; In rot dargestellt der definierte ROI-Bereich mit einer Fläche von 60 Einheiten.

### 2.2.10.5 Entnahme der Muskelproben (Maus)

Je nach Versuchsgruppe wurden an Tag 3, 7 oder 21 die Mäuse euthanasiert und das Muskelgewebe entnommen. Hierfür wurden der M. Gastrocnemius und der M. Adduktor freipräpariert, herausgelöst und dann auf Trockeneis schockgefroren. Die Muskelproben wurden dann in Tissue Tek eingebettet oder in RNA-Later eingelegt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C weggefroren.

## 2.2.11 Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie

### 2.2.11.1 Versuchstiere

#### **Kaninchen:**

---

New Zealand White Kaninchen      Charles River WIGA (Deutschland) GmbH, Sulzfeld

---

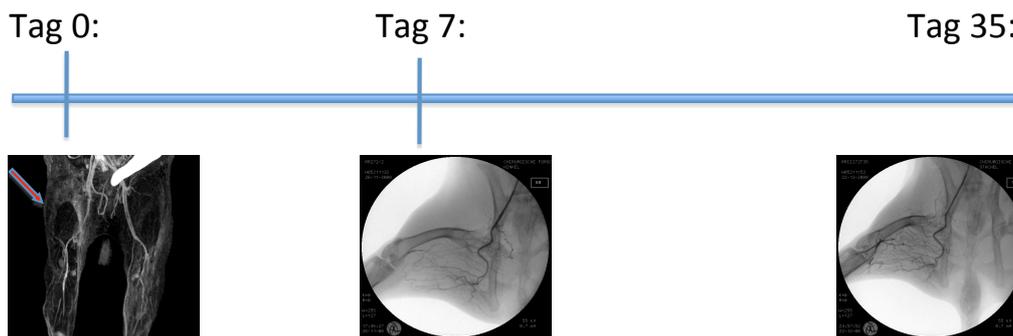
Für das Kaninchenmodell wurden ausschließlich weibliche, zwischen 2,5-3 kg schwere New-Zealand-White Kaninchen verwendet. Die Tiere hatten nach Lieferung mindestens zwei Tage Zeit, um sich zu akklimatisieren, bevor sie in den Versuch genommen wurden. Die

Unterbringung erfolgte in Einzelboxen bei kontrolliertem 12h Tag-Nacht-Zyklus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter.

Sowohl die Haltung der Tiere, als auch die Versuchsdurchführung erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin und entsprach den Richtlinien der Tierschutzverordnung der Regierung von Oberbayern. Tierversuchsnummer: 140-07

### 2.2.11.2 Überblick über das Modell der chronischen Hinterlaufschämie im Kaninchen

Der tierexperimentelle Versuchsablauf im Kaninchen gliederte sich wie folgt:



**Abb. 11:** Versuchsablauf des Kaninchenmodells

*Tag 0:* Induktion der chronischen Hinterlaufschämie mittels Exzision der rechten *A. femoralis* (hier beispielhaft in einer MRT-Aufnahme dargestellt) und intramuskuläre Applikation des Adeno-assoziierten Virus.

*Tag 7:* Durchführung der Ausgangsmessungen: Angiographie der Beinarterien und Mikrosphärenapplikation mit parallelem Referenzabzug

*Tag 35:* Erhebung der Endpunktmessungen und Euthanasie der Tiere, sowie Entnahme von Muskelgewebe und Organen

Versuchsgruppe	Behandlung	n-Zahl
Kontrolle	I.m. Injektion von $5 \times 10^{12}$ AAV 2.9 Lac-Z an Tag 0 in OS und US	n=6
Tb4 OS + US	I.m. Injektion von $5 \times 10^{12}$ AAV 2.9 Tb4 an Tag 0 in OS und US	n=6
Tb4 OS + US + AKT-DN	I.m. Injektion von $5 \times 10^{12}$ AAV 2.9 Tb4 an Tag 0 in OS und US + intramuskuläre Injektion von $1 \times 10^{13}$ AAV 2.9 AKT-DN nur in den US	n=4
Tb4 OS	I.m. Injektion von $5 \times 10^{12}$ AAV 2.9 Tb4 an Tag 0 nur in den OS	n=4
Tb4 US	I.m. Injektion von $5 \times 10^{12}$ AAV 2.9 Tb4 an Tag 0 nur in den US	n=4

**Abb. 12:** Einteilung der Versuchsgruppen des Kaninchenmodells. US= Unterschenkel, OS=Oberschenkel

### 2.2.11.3 Kaninchen: Perioperative Maßnahmen und Anästhesie

Zunächst erhielten die Versuchstiere im Stall eine Sedierung durch intramuskuläre Injektion einer Kurznarkose.

#### **Kurznarkose (Kaninchen):**

---

Rompun	1 ml
Ketamin	2 ml
Atropin	150 µl

---

Folgend wurden die narkotisierten Tiere in den Großtieroperationssaal transportiert und erhielten hier eine Augenprophylaxe zum Schutz vor Hornhautschäden bestehend aus *Bepanthen* Salbe und einer in Natriumchlorid getränkten Augenbinde. Sodann wurde ein intravenöser Zugang mittels einer 22G Braunüle in die rechte Vena (V.) auricularis gelegt. Über diesen Zugang wurde die Langzeitnarkose perfusorgesteuert bei einer Geschwindigkeit von 15ml / h appliziert.

#### **Langzeitnarkose (Kaninchen):**

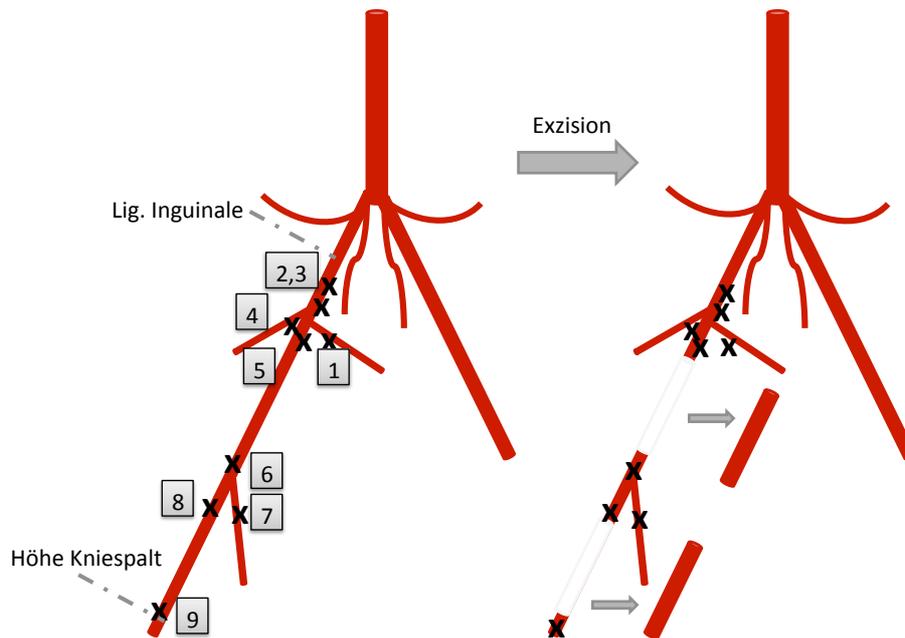
---

Rompun	5 ml
Ketamin	8 ml
NaCl	35 ml

---

Danach wurde der rechte Hinterlauf auf der medialen Seite rasiert und das Operationsgebiet gründlich desinfiziert. Nach Orientierung durch Palpation des Ligamentum inguinale und des Pulses der A. femoralis wurde ein bogenförmiger Hautschnitt beginnend auf der Höhe des Lig. Inguinale bis zum Kniespalt gesetzt. Danach wurde mithilfe eines Overholts die Muskelfaszie stumpf durchtrennt und das Gebiet des femoralen Gefäßnervenstranges vorsichtig freigelegt. Nach Darstellung der Abgänge 1-3 (s. Abb. 13) wurde zuerst der Abgang 1 zusammen mit der parallel verlaufenden Vene mit einer Ligatur unterschlungen und danach ligiert. Weiter wurden die Abgänge 2-5 dargestellt und dann in der in Abb. 13 dargestellten Reihenfolge ligiert. Zur Orientierung wurde eine imaginäre Linie zwischen dem Lig. Inguinale und dem Kniespalt gezogen, diese gedrittelt und am kaudalen Drittelpunkt der Muskel stumpf durchtrennt um den Abgang Nummer 7 aufzufinden. Neben diesem wurden dann auch Nummer 6 und 8 freigelegt und ligiert, um dann als letztes auf Höhe des Kniespaltes den Abgang Nummer 9 freizulegen und diesen zu unterbinden. Nach der Ligatur aller Abgänge wurden dann die zwei in Abb. 13 gekennzeichneten Arterienteile exzidiert und das Operationsgebiet ausgiebig gespült. Die Wunde wurde daraufhin mit einer Einzelknopfnahnt verschlossen und mit Jod desinfiziert. Zuletzt wurde noch ein Verband angelegt und zur Prophylaxe eine Einmaldosis Gentamycin intramuskulär in das

kontralaterale Bein injiziert. Das Kaninchen wurde zurück in den Stall transportiert und erhielt für weitere 5 Tage postoperativ Tramadol Tropfen über das Trinkwasser.



**Abb. 13:** Exzision der A. femoralis an Tag 0. Links ist die Reihenfolge der Ligaturen (1-9) dargestellt. Rechts zeigt sich das Operationsgebiet nach Herausnahme der zwei Gefäßabschnitte.

#### 2.2.11.4 Messungen an Tag 7

7 Tage nach Exzision der A. femoralis wurden die Ausgangsmessungen durchgeführt, welche eine Angiografie der Beingefäße für die spätere Analyse des Kollateralwachstums und der Blutflussgeschwindigkeit beinhalteten sowie die Applikation der Mikrosphären mit Abzug ihrer Referenz zur Analyse der Perfusion.

Nach oben beschriebener Einleitung und Anästhesie des Kaninchens wurde an Tag 7 zusätzlich zu einem intravenösen Zugang rechts, ein arterieller Zugang in die linke Ohrarterie gelegt. Dieser diente für den Referenzabzug während der Mikrosphärenapplikation.

Zunächst wurde der Halsbereich rasiert und reichlich desinfiziert. Sodann wurde der Puls der A. carotis communis, lateral des Larynx getastet. Parallel zur Pulsation wurde ein etwa 3cm langer Hautschnitt in der Medioclavicularlinie gesetzt. Das Platysma wurde stumpf durchtrennt und die A. carotis communis dargestellt. Es folgte die Freilegung der A. carotis communis über eine Strecke von etwa 2 cm und deren Trennung von V. jugularis und N. vagus. Folgend wurde diese mit zwei Ligaturen unterschlungen, wobei der kraniale Faden direkt ligiert wurde. Mithilfe des kaudalen Fadens wurde die Arterie nun unter leichten Zug gesetzt, und dann unter Einsatz einer Mikro-Federschere eine ca. 1-2mm breite Inzision der

Arterie vorgenommen. Hierüber wurde nun eine heparinisierte 4 French Schleuse nach distal vorgeschoben und mit einer Fadenschlinge fixiert. Unter Röntgenkontrolle wurde ein heparinisierte 4 French Katheter langsam in die Schleuse eingeführt. Über diesen wurde nun ein Führungsdraht geschoben und unter röntgenologischer Durchleuchtung im linken Ventrikel positioniert. Hierüber wurde der Katheter in den linken Ventrikel vorgeschoben und nach Erreichen der gewünschten Position konnte der Führungsdraht entfernt werden. Zur Verifizierung der korrekten Lage wurde der Katheter kurzzeitig an eine Druckmessung angeschlossen und eine Druckkurve entsprechend dem linksventrikulären Druck detektiert. Parallel dazu erfolgte die Vorbereitung der fluoreszierenden Mikrosphären. Diese wurden zunächst für 3 Minuten gevortext und folgend 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und dann erneut für 3 Minuten mittels Vortexer aufgemischt. Hiervon wurden nun 3ml mit einer 5ml Spritze aufgezogen und gleichmäßig über 2 Minuten über den liegenden Katheter intraventrikulär injiziert. Parallel wurden unter Anschluss einer Harvard-Abzugspumpe an die arterielle Kanüle 6,18ml Blut konstant über 3 Minuten (Flussrate von 2,06 ml/min) als Referenz für die Mikrosphärenanalyse in einer 50ml Spritze abgezogen. Zur Vermeidung einer frühzeitigen Gerinnung wurde die Perfusorspritze zuvor mit 3ml Natriumcitrat befüllt. Im Anschluss an die Applikation der Mikrosphären wurde der Katheter entfernt und gründlich mit Heparinlösung gespült. Das abgezogene Blut wurde über ein Vakuumabsaugsystem durch ein Filtersystem abgesaugt und der Filter wurde lichtgeschützt bei 4°C bis zur Aufreinigung der Mikrosphären gelagert.

Für die Durchführung der Angiographien der Bein Gefäße wurde nun erneut ein mit Heparinlösung benetzter Führungsdraht unter Röntgenkontrolle über die Schleuse in die A. carotis communis vorgeschoben. Der Draht wurde dann weiter über den Truncus brachiocephalicus in die Aorta descendens und folgend in die Aorta abdominalis geleitet und in der rechten A. iliaca externa positioniert. Über den Führungsdraht wurde sogleich der Katheter bis zur gewünschten Position nachgeschoben und der Draht folgend entfernt. Für die eigentliche angiographische Aufnahme wurden 1,5ml Adenosin appliziert, diese mit 1ml NaCl nachgespült und 2ml Iopamidol-Kontrastmittel injiziert. Parallel wurde ein Angiographiefilm mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 25 Frames / Sekunde erstellt. Für die Auswertung der Angiographien wurde zusätzlich eine Angiographie des linken Kontrollbeins erstellt. Diese wurde im Anschluss in gleicher Vorgehensweise an der Gegenseite durchgeführt. Nach Beendigung der Angiographien wurde der Katheter entfernt, die Schleuse gezogen und die A. carotis communis kaudal der zuvor gesetzten Inzision ligiert. Das Wundareal wurde gründlich mit NaCl gespült und der Hautschnitt mit einer

Einzelknopfnahmt verschlossen. Abschließend wurde die Wunde mit Jod großzügig desinfiziert. Sowohl die intravenöse als auch die intraarterielle Kanüle wurde entfernt, die Blutung durch Abdrücken gestoppt und das Tier zurück in den Stall gebracht. Hier wurde es bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

### 2.2.11.5 Messungen an Tag 35

An Tag 35 wurden die abschließenden Messungen durchgeführt. Hierfür wurde das Tier wie unter 2.2.11.3 beschrieben eingeleitet und narkotisiert. Wie zuvor beschrieben wurde eine Schleuse gelegt, diesmal jedoch in die linke A. carotis communis. Sowohl die Mikrosphärenapplikation inklusive Referenzabzug als auch die Durchführung der Angiographien erfolgte nach zuvor beschriebener Vorgehensweise. Nach Abschluss der Messungen wurden zur Euthanasie der Tiere 10ml gesättigte Kaliumchlorid-Lösung intrakardial injiziert.

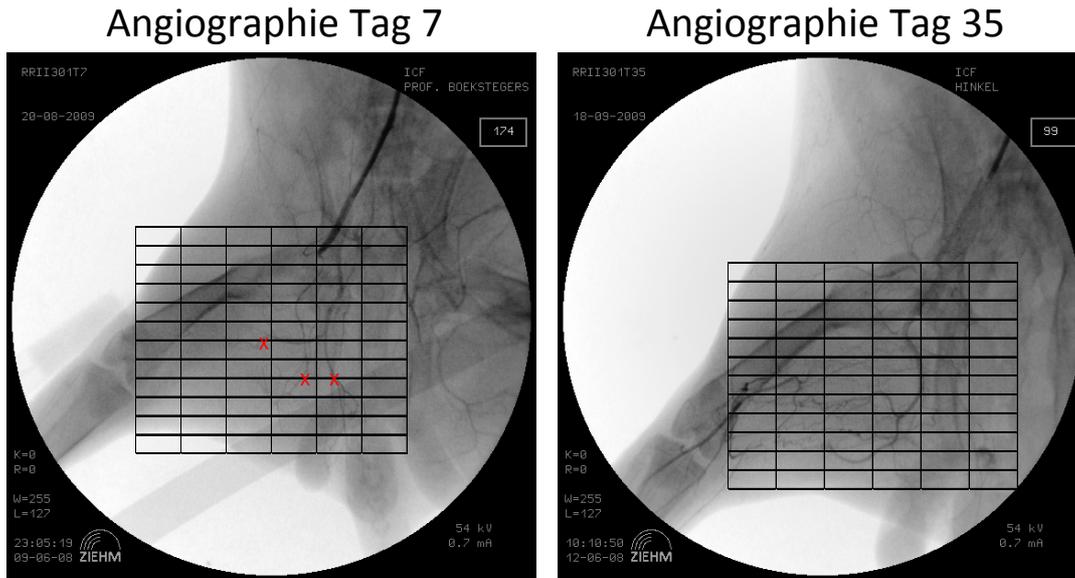
### 2.2.11.6 Entnahme der Gewebeproben (Kaninchen)

Für die histologische Analyse wurden an Tag 35 Muskelproben von Oberschenkel (M. Adduktor, M. Vastus medialis) und Unterschenkel (M. Fibularis, M. Gastrocnemius, M. Tibialis anterior) entnommen.

Die Muskeln wurden zerteilt und jeweils ein Teil für die Histologie in Histokästchen eingebettet und folgend in Methylbutan gegeben. Dieses wurde zuvor durch flüssigen Stickstoff vorgekühlt. Die Proben verblieben 10 Minuten in Methylbutan, um dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren zu werden. Ein weiterer Teil der Muskeln wurde zusammen mit den beiden Nieren in 4%-igem Formalin für die folgende Mikrosphärenanalyse separiert. Zusätzlich wurden noch Proben für die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR entnommen, diese wurden unverzüglich in RNA-Later gegeben und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Proben zur Proteinanalyse wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 2.2.11.7 Bestimmung des Kollateralwachstums

Zur Bestimmung des Kollateralwachstums wurden die an Tag 7 und Tag 35 erstellten Angiografien quantifiziert und eine Ratio des Ausgangswertes von Tag 7 und des Endwertes von Tag 35 erstellt. Hierfür wurden angiografische Bilder ausgewählt, welche die maximale Füllung der Beinarterien mit Kontrastmittel zeigten. Über die Angiografien wurde ein Gitternetz identischer Größe gelegt und die Schnittpunkte von Kollateralen mit Gitternetzlinien gezählt. Ausgewertet wurden sowohl der rechte, ischämische Hinterlauf als auch das linke Kontrollbein (s. Abb. 14).



**Abb. 14:** Quantifizierung des Kollateralwachstums; An Tag 7 und Tag 35 wurde jeweils ein Bild mit der maximalen Kontrastmittelfüllung der Beinarterien ausgewählt. Mithilfe eines Rasters wurden folgend die Kreuzungspunkte (rot) der Gefäße mit dem Raster ausgezählt. Die Werte wurden dann in Prozent (%) von Tag 7 dargestellt.

#### 2.2.11.8 Analyse der Cinedensitometrie

Die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit des Blutes erfolgte ebenfalls mittels der an Tag 7 und Tag 35 erstellten Angiographien. Hierbei wurden anhand festgelegter anatomischer Grenzen, die Anzahl der Frames gezählt, welche benötigt wurden, bis das Blut vom Lig. Inguinale bis zum Kniespalt gelangte. Da die Infusionsgeschwindigkeit konstant blieb und die Aufnahmezeit des C-Bogens stets 25 Bildern pro Sekunde entsprach, war die Anzahl der Bilder direkt proportional zur Blutflussgeschwindigkeit. Auch hier wurde ein Quotient der Werte von Tag 35 zu Tag 7 errechnet und beide Hinterläufe quantifiziert<sup>118</sup>. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Cinedensitometrie mit der Perfusionsbestimmung durch fluoreszierende Mikrosphären (s.u.) verglichen, welche eine gute Übereinstimmung zeigten.

#### 2.2.11.9 Quantifizierung des Blutflusses über fluoreszierende Mikrosphären

Die Bestimmung des Blutflusses über fluoreszierende Mikrosphären gilt als der Goldstandard zur Analyse der regionalen Durchblutung einzelner Gewebe.

Hierfür erfolgten zwei Applikationen, an Tag 7 zur Bestimmung der Ausgangsdurchblutung und an Tag 35 zur Berechnung des Endmesswertes. Es wurden jeweils 3ml Mikrosphären mittels Katheter in den linken Ventrikel des Kaninchenherzens appliziert, von wo aus sie sich homogen über den Blutstrom im gesamten Kreislaufsystem verteilten. Aufgrund ihrer Größe von 10-15µm bleiben sie in den Kapillaren hängen und können als Anzahl an Mikrosphären

pro Gramm Gewebe quantifiziert werden, wodurch sie einen Rückschluss auf die regionale Durchblutung des Gewebes erlauben<sup>119</sup>.

Um eine therapeutische Durchblutungssteigerung zu quantifizieren wurden Mikrosphären unterschiedlicher Fluoreszenz zu definierten Zeitpunkten verabreicht. Parallel wurde arteriell mit konstantem Abzug eine Referenzprobe entnommen, welche einen internen Standard zu den Gewebeproben lieferte.

Nachdem die Muskelproben sowie beide Nieren mindestens 4-5 Tage lichtgeschützt in Formalin (4%) eingelegt waren, konnte mit ihrer Verarbeitung fortgefahren werden. Die einzelnen Muskeln wurden dafür zunächst in Stücke zwischen 0,5g und 2,0g geschnitten und gewogen. Die gewogenen Muskelproben wurden dann jeweils in einem Filter platziert und die Filter in Edelstahlkochgefäße gestellt, welche dann in einen Heizblock überführt wurden<sup>120</sup>. Zur Digestion der Proben wurden dann 15 ml 4M Kalilauge hinzugefügt. Auf die Kalilauge kamen pro Filter noch 1,5ml Isopropanol (100%). Die Filter wurden dann mit einem Deckel verschlossen und die Heizblöcke angeschaltet. Die Proben wurden in der Digestionslösung bei 60 °C für 6-8 Stunden verdaut. Danach wurde die Digestionslösung durch die Filter mit einem Vakuumabzug abgesaugt, so dass nur die einzelnen Mikrosphären noch im Filter hängenblieben.

Nach mehrfachem Spülen mit Phosphatpuffer wurden die Filter in Falcontubes gesetzt und pro Filter 2ml 2-Ethoxyethylacetat hinzupipettiert. Die Falcontubes wurden 3 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, wodurch sich der im 2-Ethoxyethylacetat gelöste Farbstoff am Boden des Falcontubes sammelte. Von jeder Probe wurden dann 100µl in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Platte in einen Fluoreszenzdetektor gesetzt. Die Geräteeinstellungen des Detektors sowie die gemessenen Wellenlängen waren wie folgt definiert: (s. Abb.15a; 15b)

### **Geräteeinstellung Tecan Safire 2:**

---

Temperatur:	25°C
Z-Position:	automatisch angepasst
Integration time:	40 µs
Lag time:	0 µs
Measurement mode:	Fluoreszenz
Number of reads:	3
Shake duration:	5 s

---

*Abb. 15a: Geräteeinstellung des Fluoreszenzdetektors (Tecan Safire 2)*

<b>Farbe:</b>	<b>Exzitationmaximum:</b>	<b>Emissionsmaximum:</b>
Scarlet	651 nm	680 nm
Crimson	612 nm	638 nm
Red	570 nm	598 nm
Orange	534 nm	554 nm
Yellow-Green	490 nm	515 nm
Blue-Green	427 nm	468 nm
Blue	356 nm	424 nm

---

*Abb. 15b: Tecan Safire 2: Gemessene Wellenlängen der Exzitation und Emission der verwendeten Mikrosphären in Abhängigkeit von ihrer Farbe*

Der Detektor quantifizierte die Fluoreszenz der einzelnen Proben und die entstandenen Messwerte wurden mithilfe der XFluor4-Software in Excel überführt. Für die Bestimmung des regionalen Blutflusses wurde eine Ratio des Messwertes der einzelnen Muskeln von Tag 7 und Tag 35 berechnet.

### **2.2.12 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) ermöglicht es den „Ist-Zustand“ der transkriptionellen Zelltätigkeit zu einem Zeitpunkt zu analysieren. Nur aktuell transkribierte RNA wird hierbei quantifiziert. Von besonderer Relevanz für valide Ergebnisse ist die frühzeitige Hemmung von RNAsen, welche RNA abbauen.

Das bei -80° gefrorene Gewebe wurde zunächst abgewogen und jeweils 100mg in ein Homogenisatorröhrchen gegeben. Hierzu wurden je 1ml TRI Reagent® hinzupipettiert und das Gemisch mit Hilfe eines Ultraturax homogenisiert. TRI Reagent® enthält Guanidiniumthiocyanat, wodurch Zellen lysiert werden und RNAsen abgebaut werden. Ein weiterer Bestandteil ist Phenol, in welchem sich Proteine und DNA lösen. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zur Trennung der Phasen wurden nun 200µl Chloroform hinzugegeben und für etwa 15 Sekunden vorsichtig vermischt. Das Gemisch wurde 2-3 Minuten erneut bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert und sogleich mit 500µl Isopropanol zur Präzipitation der RNA vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. Es folgte eine weitere Zentrifugation über 10 Minuten bei 4°C und 12000g. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml Ethanol (75 %) gewaschen, getrocknet und folgend in 50–100µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Hiervon wurden 5µl in eine Küvette pipettiert und 1:100 verdünnt. Der RNA Gehalt wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt und das Verhältnis mit der bei 280 nm gemessenen Proteinmenge berechnet. Bei einer Reinheit von 1,9-2,1 wurde die gemessene RNA Menge jeweils mal vier genommen und dann auf 1µg RNA / µl eingestellt und erneut gemessen. Für den DNase Verdau wurde folgendes Gemisch angesetzt:

### **DNase Verdau**

---

1µg RNA	1 µl
DNase Puffer	1 µl
Dnase	1 µl
Aqua dest.	7 µl

---

Das Endvolumen von 10µl wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 1µl 25mM EDTA gestoppt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 70°C, um die cDNA Umschreibung vorzubereiten. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in einem Eppendorfgefäß vorsichtig vermischt und dann auf Eis gestellt.

### Umschreibung der RNA in cDNA:

Die Umschreibung des RNA Stranges in einen cDNA Einzelstrang erfolgte mittels des *Reverse Transcription Systems* von Promega und wurde nach den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt. In ein Reaktionsgefäß wurden nacheinander folgende Bestandteile pipettiert:

### **Ansatz Umschreibung RNA zu cDNA**

---

MgCl <sub>2</sub> , 25mM	4 µl
Reverse Transcription 10X Buffer	2 µl
dNTO Mixture, 10mM	2 µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
AMV Reverse Transcriptase	0,5 µl
Primer	0,5 µg
RNA	1 µg

---

Das Endgemisch wurde für 45 Minuten bei 42°C inkubiert, dann für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und schließlich für 5 Minuten auf Eis gestellt.

### Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR:

Für die PCR wurde pro Well folgender Ansatz hergestellt und in ein PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

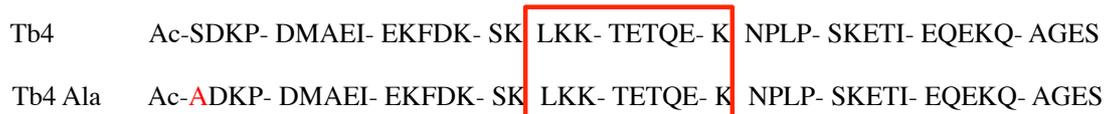
**Ansatz quantitative Echtzeit-PCR pro Well**

cDNA (umgeschrieben)	2 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Aqua dest.	6 µl
Biorad, Green Supermix iQ™ SYBR ®	10 µl

Das PCR Reaktionsgefäß wurde in dem *My IQ single color real-time PCR detection system* platziert und die PCR gestartet. Das Prinzip basiert auf der einer regulären PCR kombiniert mit einer Quantifizierung der entstehenden doppelsträngigen DNA. Hierbei interkalieren die zugesetzten Farbstoffe mit der doppelsträngigen DNA, so dass diese mittels Fluoreszenzmessung detektiert und quantifiziert werden kann. Das Fluoreszenzsignal steigt dabei proportional zu der Anzahl an PCR Produkten. Quantifiziert wurde die Fluoreszenz mithilfe der MyIQ Software in der exponentiellen Phase, da hier die Reaktionsbedingungen ihr Optimum haben. Zur Analyse der Daten wurde das relative Expressionslevel des Zielgens im Vergleich zu dem „House-keeping“-Gen GAPDH berechnet.

**2.2.13 HPLC- Analyse von Gewebeproben**

Dank einer Kooperation mit Prof. Ewald Hannappel (Universität Nürnberg-Erlangen), konnten wir Analysen der Mäusemuskulatur nach Ligatur oder nach Sham-Operation in behandelten und unbehandelten Mäusen über HPLC-Analysen (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) vornehmen. Ebenso wurden Muskeln des Kaninchenhinterlaufs mittels HPLC auf ihren jeweiligen Thymosingehalt untersucht. Die Spezies des Kaninchens hat einen besonderen Vorteil bei der Analyse der Thymosine, da sich ihr endogenes Tb4 in einer Aminosäure von dem murinen und humanen Tb4 unterscheidet. Diese spezielle Form des Tb4 im Kaninchen ist ein sogenanntes Tb4-Ala da die erste Aminosäure kein Serin sondern ein Alanin darstellt (s. Abb. 16). Unter Anwendung einer HPLC können die beiden Tb4 Varianten voneinander unterschieden werden, und so eine Quantifizierung von endogenem Tb4-Ala und exogen hinzugefügtem Tb4 erfolgen.



**Abb. 16:** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von Tb4 und Tb4-Ala. Das Tb4-Ala unterscheidet sich durch das Vorhandensein eines Alanins anstelle eines Serins am N-Terminus des Proteins. Ebenso markiert ist das zentrale Aktinbindemotiv ‚LKKTETQEK‘ (modifiziert nach Huff et al.<sup>121</sup>)

### 2.2.13.1 Probenvorbereitung HPLC

Die Muskeln wurden wie unter 2.2.10.5 und 2.2.11.6 beschrieben entnommen, folgend mit PBS gewaschen und trocken getupft. Danach wurde das Gewebe gewogen und gewichtsadaptiert Perchlorsäure hinzugefügt. Pro Gramm Gewebe wurden je 4ml 0,4 molare Perchlorsäure sowie 1% Thiodiglycoll hinzugegeben. Das Gemisch wurde rasch homogenisiert und dann für 30 Minuten auf Eis gestellt. Folgend wurden die Proben bei 14.000g für 10 Minuten und 4°C scharf abzentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Dieser wurde auf Eis nach Erlangen geschickt und dort im Labor von Prof. Hannappel analysiert.

### 2.2.13.2 Prinzip der RP (Reverse-Phase) -HPLC

Die Analyse der Proben erfolgte mittels Reverse-Phase Chromatographie, welche eine Unterform der Adsorptionschromatographie darstellt auf diese hier nur rudimentär eingegangen werden soll.

Das Prinzip basiert auf einer Auftrennung der einzelnen Peptide durch ihre Verteilung innerhalb zweier nicht mischbarer Phasen. Diese Phasen befinden sich innerhalb einer Säule und gliedern sich in eine stationäre Phase bestehend aus unpolaren Alkylresten welche an Silicagel gebunden sind und einer mobilen, polaren Phase. Die mobile Phase, auch Laufmittel genannt, besteht aus einem Gemisch von Wasser und Lösungsmitteln.

Die Auftrennung eines Gemisches erfolgt in Abhängigkeit seiner Hydrophobizität. Hierbei eluieren polare Moleküle schneller, wohingegen weniger polare Teile eine längere Retentionszeit haben. Durch Zugabe von Wasser zur mobilen Phase kann die Retentionszeit verlängert werden. Ebenso kann diese durch Erhöhung der Lösungsmittel verringert werden. Die eluierten Peptide können dann mithilfe eines UV- oder Fluoreszenzdetektors detektiert werden.

### **2.2.14 Histologie**

Für alle Färbungen wurden 5µm dicke Kryoschnitte angefertigt. Dafür wurden die Muskelproben bei -20C° in *Tissue Tec* eingebettet und auf Schneideträgern befestigt. Pro Objektträger wurden 4-6 Schnitte aufgezogen und diese bei 4°C zwischengelagert. Je nach Färbeprozedur wurden im Anschluss Durchlicht- oder Fluoreszenzphotografien angefertigt und analysiert.

### 2.2.14.1 Pecam-NG2 Doppelimmunhistologie

Die Pecam-NG2 Doppelfärbung bietet eine Möglichkeit sowohl Endothelzellen als auch Perizyten parallel zu beurteilen, und somit nicht nur eine Aussage über die Neuentstehung von Kapillaren zu treffen sondern auch deren Reifung durch Anlagerung von Perizyten zu beurteilen.

Zunächst wurden die Schnitte 15 Minuten bei 4°C in vorgekühltem Aceton fixiert. Es folgten drei Waschungen von jeweils 5 Minuten in PBS. Das überflüssige PBS wurde abgeklopft und die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Stift umfahren. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Schnitte nun mit *Antibody diluent* beträufelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneut drei Waschungen über 5 Minuten mit PBS. Folgend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Primärantikörper gegen CD31, verdünnt in 2%-igem BSA, über Nacht bei 4°C inkubiert. Dieser wurden dann mittels dreier Waschschrte in PBS entfernt und es folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers für 2h bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde der zweite Primärantikörper gegen NG2 auf die Objektträger pipettiert und diese wieder über Nacht bei 4° inkubiert. Vor der Zugabe des zweiten Sekundärantikörpers wurden die Schnitte erneut dreimal gewaschen und folgend bei Raumtemperatur für 2h inkubiert. Nach den letzten drei Waschungen mit PBS wurden die Kerne mittels Zugabe von *Dapi* gefärbt und die Objektträger eingedeckelt.

### 2.2.14.2 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die alkalischen Phosphatase dient als Marker endothelialer Zellen und ist vor allem an der Membran arterieller Endothelzellen zu finden. Diese lassen sich durch die von Ziada et al. beschriebene Färbemethode dunkelblau anfärben<sup>122</sup> und in Kombination mit einer Kernechtrot Gegenfärbung der Muskelfasern von diesen differenzieren. Für die Analyse der Kapillardichte wurden Kryoschnitte von 5µm Dicke hergestellt und für 1h bei 37C° mit der Alkalischen-Phosphatase (AP)-Lösung inkubiert.

#### **AP-Puffer**

---

MgSO <sub>4</sub>	6.9 mmol/L
B <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	27,5 mmol/L
Aqua dest.	1000 ml
pH-Wert von 9,2-9,4	

---

#### **AP-Färbelösung**

---

Nitroblue-Tetrazolium	30 mg
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat p-Toluidine Salz	6 mg
AP – Puffer	30 ml

---

Folgend wurden die Schnitte mit PBS gespült und anschließend über 5 Minuten in 4%-igem Formaldehyd (pH 7,3) fixiert. Nach einem weiteren Spülschritt wurden die Muskelfasern mit Kernechtrot (0,1%) über 1 Minute gegengefärbt und folgend in Aqua dest. gewaschen.

Pro Muskel wurden acht zufällig gewählte Abschnitte bei 32-facher Vergrößerung fotografiert und von zwei unabhängigen Untersuchern ausgezählt. Dabei wurden sowohl Kapillaren als auch Muskelfasern gezählt und deren Verhältnis berechnet.

### 2.2.14.3 $\beta$ -Galaktosidase Färbung

Das Lac-Z-Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches als Reporter gen Verwendung findet. Das Substrat X-Gal wird von der  $\beta$ -Galaktosidase unter Freisetzung eines Indolderivates gespalten, welches dann als blaue Ablagerung zu erkennen ist.

Wie zuvor beschrieben wurden 5 $\mu$ m dicke Kryoschnitte angefertigt und zur Fixierung in einer 0,5%-igen Glutaraldehydlösung (Glutaraldehyd 25% gelöst in PBS+) für 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem Färbetrog inkubiert. Danach wurden die Schnitte für dreimal 5 Minuten in PBS unter konstantem Schwenken gewaschen und folgend abgeklopft. Die X-Gal Färbelösung wurde wie folgt angesetzt (siehe unten) und vor dem Auftragen auf die fixierten Schnitte filtersterilisiert.

#### **PBS PLUS**

---

MgCl <sub>2</sub> 1M	100 $\mu$ l
gelöst in: PBS	100 ml

---

#### **20 X KC-Lösung**

---

K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 0,5 M	250 $\mu$ l
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> 0,5 M	250 $\mu$ l
gelöst in: PBS	25 ml

---

#### **X-Gal Färbelösung**

---

PBS-PLUS	20 ml
X-Gal 40 mg / ml	500 $\mu$ l
20 X KC	1 ml

---

Die Lösung wurde mit Pasteurpipetten aufgetragen, wobei in etwa 1ml Lösung pro Objektträger verwendet wurde. Die beschichteten Schnitte wurden dann für 6h bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen, und dann luftgetrocknet. Die X-Gal Färbung wurde danach mikroskopisch analysiert.

### **2.2.15 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Berechnung signifikanter Unterschiede erfolgte mittels eines ungepaarten t-Tests, ANOVA Analysen und eines Bonferroni Tests. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0.05$  festgelegt und entsprechende Ergebnisse in den Abbildungen mit einem (\*) markiert. Hochsignifikante Ergebnisse mit einem  $p < 0.01$  wurden mit (\*\*) versehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Effekte von Tb4 *in vitro*

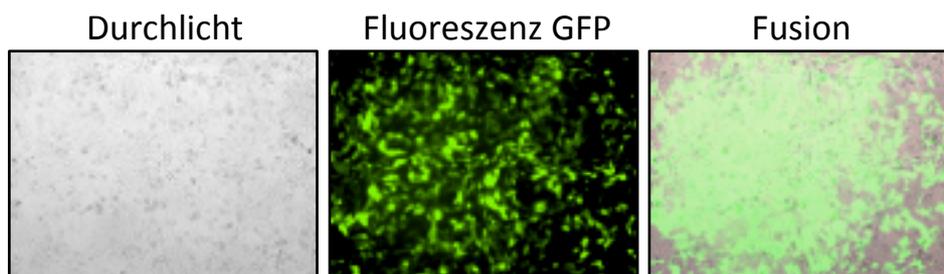
##### 3.1.1 Nachweis der Plasmidtransfektion *in vitro*

Für die *in vitro* Versuche wurde zur Überexpression der gewünschten Proteine Plasmid-DNA als gentechnisches Werkzeug eingesetzt, da mit Ausnahme des AAV6 die meisten AAVs nur eine geringe Transduktionsrate in Zellkultur erzielen können.

Zunächst wurde in Vorversuchen die Effizienz der Plasmidtransfektion überprüft. Hierfür wurden HMEC- und HL-1-Zellen mit einem GFP-exprimierendem Reporter-genplasmid transfiziert und nach 48h unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es zeigte sich eine effiziente Überexpression, nachgewiesen durch GFP-positive (grün-fluoreszierende) Zellen (s. Abb. 17a; 17b).



**Abb. 17a:** HMEC-Zellen 48h nach Transfektion mit einem GFP-Plasmid. Grün fluoreszierende Zellen repräsentieren erfolgreich transfizierte Zellen. (Vergrößerung 10x)

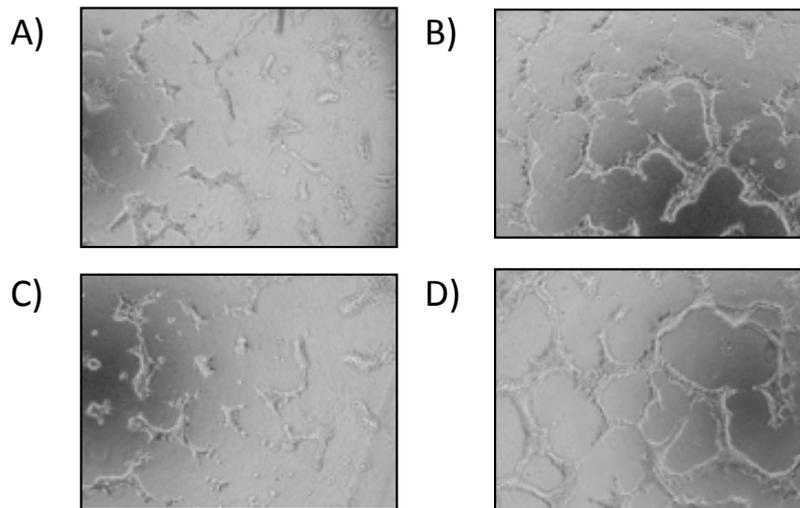


**Abb. 17b:** HL-1-Zellen 48h nach Transfektion mit einem grün fluoreszierenden GFP-Plasmid. (Vergrößerung 10x)

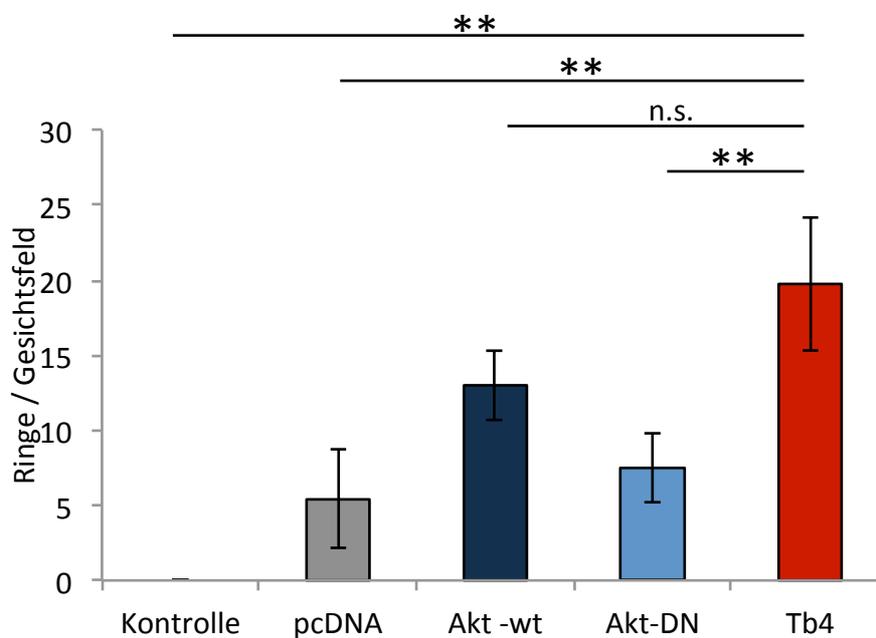
##### 3.1.2 Tb4 stimuliert Ringformationen endothelialer Zellen *in vitro*

Zunächst wurde die angiogene Wirkung von Tb4 in einem *in vitro* Angiogeneseassay auf Matrigel untersucht. Hierzu wurden HMEC-Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben mit folgenden Plasmiden transfiziert: Tb4, AKT-Wildtyp (wt), AKT-dominant-negativ (DN) und pcDNA (Kontrolle); Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen mit der gleichen Menge an PBS behandelt. Die transfizierten Zellen wurden nach 18h auf Matrigel fotografiert und quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Überexpression von Tb4 oder der AKT-wt zu einer

signifikanten Steigerung an endothelialen Ringformationen führte ( $19,8 \pm 4,4$  oder  $13,0 \pm 2,3$  R/G = Ringe / Gesichtsfeld), wohingegen die Transfektion mit einer AKT-DN ( $7,5 \pm 2,3$  R/G) keinen angiogenen Effekt im Vergleich zur pcDNA transfizierten Kontrollgruppe ( $5,4 \pm 3,3$  R/G) aufwies. PBS behandelte Endothelzellen zeigten keinerlei angiogenes Potential (s. Abb. 18a; 18b).



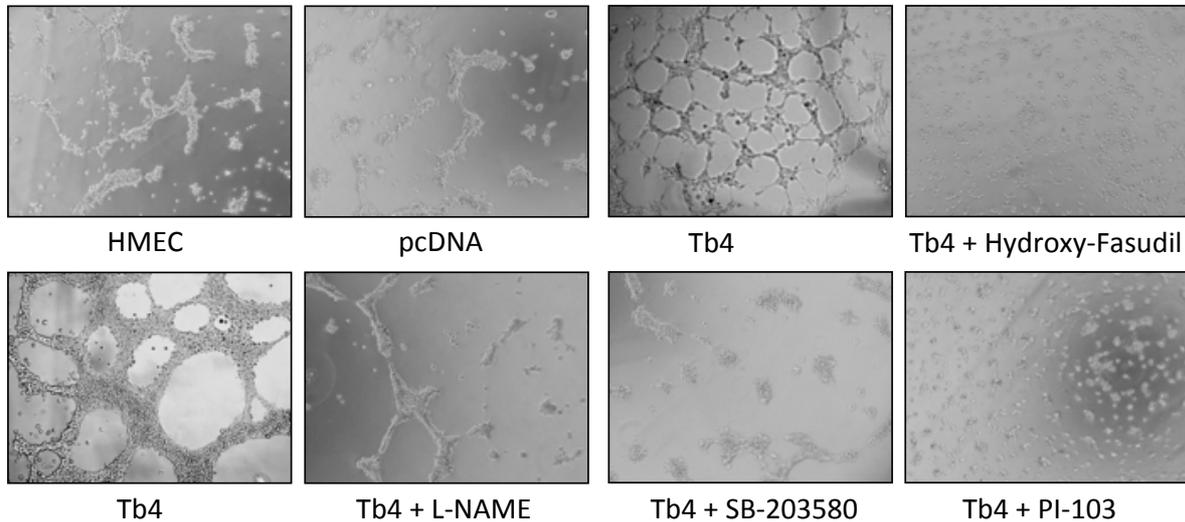
**Abb. 18a:** Beispielbilder der von den HMECs gebildeten Ringformationen auf Matrigel. A=pcDNA, B=AKT-wt, C=AKT-DN, D=Tb4; (Vergrößerung 32x)



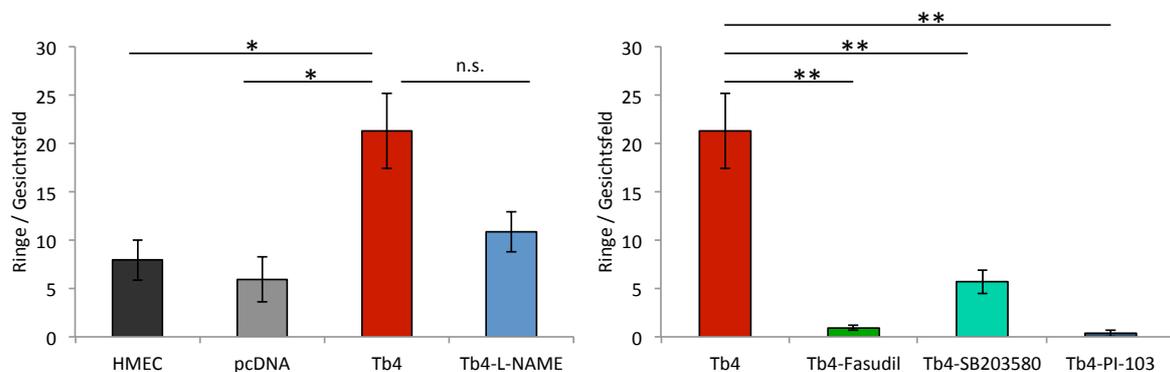
**Abb 18b:** Die Überexpression von Tb4 oder einer AKT-wt in HMEC-Zellen induzierte die Ausbildung von endothelialen Ringformationen auf Matrigel, quantifiziert nach 18h. Bei Anwesenheit einer AKT-DN zeigte sich keine Ausbildung von Ringstrukturen im Vergleich zu pcDNA-transfizierten Kontrollen. Mit PBS stimulierte Zellen wiesen kein angiogenes Potential auf.

### 3.1.3 Pharmakologische Inhibierung der Tb4 Wirkung in vitro

Zur näheren Untersuchung Tb4-vermittelter Signalwege wurden eine Reihe pharmakologischer Inhibitoren in dem unter 2.2.3 beschriebenen Matrigelassay getestet. Hierbei wurden Tb4-überexprimierende Zellen erneut auf Matrigel kultiviert jedoch parallel mit unterschiedlichen Inhibitoren behandelt.



**Abb. 19a:** Beispielfotografien der Ringformationen nach 18h Inkubation auf Matrigel unter Behandlung mit spezifischen, pharmakologischen Inhibitoren. L-NAME= NO-Syntheseantagonist (2 mmol), Hydroxy-Fasudil= Rho-Kinase Inhibitor (10  $\mu$ mol), SB-203580=p38-Inhibitor (10  $\mu$ mol), PI-103= PIK-alpha-Inhibitor (0,25  $\mu$ mol). (Vergrößerung 32x)



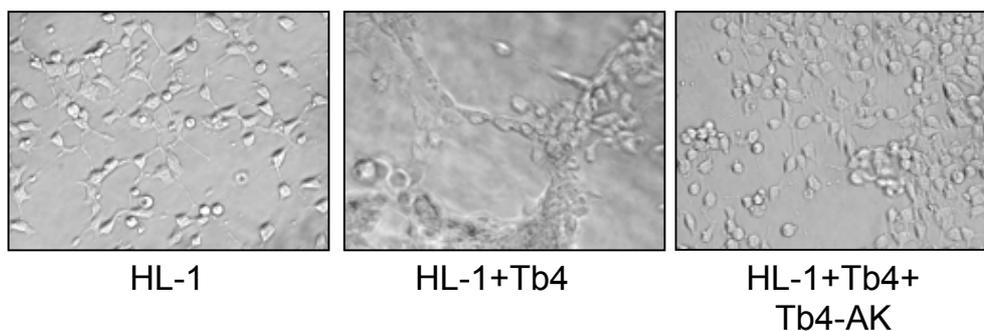
**Abb. 19b:** Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Ringformationen. Kontrolle=HMEC untransfiziert, pcDNA, Tb4 +/- Inhibitoren: L-NAME, Hydroxy-Fasudil, SB203580 und PI-103.

Es zeigte sich, dass die Applikation des NO-Inhibitors L-NAME ( $10,8 \pm 2,1$  R/G) die Tb4 induzierten Ringformationen nicht signifikant reduzierte ( $18,4 \pm 4,0$  R/G). Die Co-Stimulation mit dem PI3-K- $\alpha$ -Inhibitor, PI-103 ( $0,4 \pm 0,3$  R/G) und dem Rho-Kinase-Hemmstoff, Hydroxyfasudil ( $0,9 \pm 0,3$  R/G) resultierte in einer kompletten Hemmung der Ringbildungen. Ebenso erniedrigte der p38-Inhibitor, SB203580 ( $5,7 \pm 1,2$  R/G) die Anzahl an Kapillarformationen in vitro signifikant. (s. Abb. 19a; 19b)

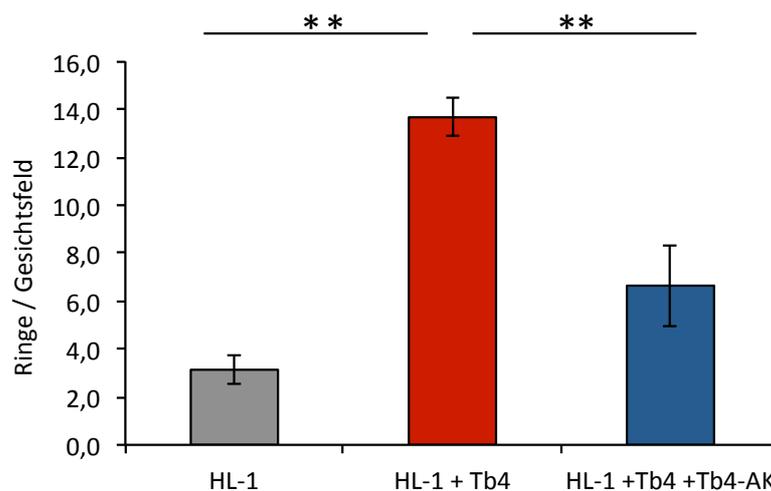
### 3.1.4 Interaktion von Myozyten und Endothelzellen in vitro

Potentielle Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Myozyten wurden in vitro unter Verwendung eines Matrigel Co-Kultur Assays untersucht.

Ein direkter Kontakt zwischen den Zelltypen bestand hierbei nicht, sondern gelang nur über das umgebende Medium. Verglichen wurde die Anzahl an endothelialen Ringformationen bei parallelem Vorhandensein von untransfizierten HL-1-Zellen im Vergleich zu stabil mit Tb4-transfizierten HL-1-Zellen. Zudem wurde eine dritte Gruppe untersucht, in welcher ein inhibitorischer, Tb4-spezifischer Antikörper in das Medium gegeben wurde. Nach 18 Stunden Inkubation wurden die endothelialen Ringformationen quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme an Ringstrukturen in Co-Kulturen von HL-1-Tb4 stabil transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tb4:  $13,7 \pm 0,8$  R/G vs. Kontrolle:  $3,1 \pm 0,6$  R/G). Die Zugabe eines inhibitorischen Tb4-Antikörpers reduzierte die Anzahl an endothelialen Ringen signifikant (Tb4 + Tb4-AK:  $6,6 \pm 1,7$  R/G) (s. Abb. 20a; 20b).



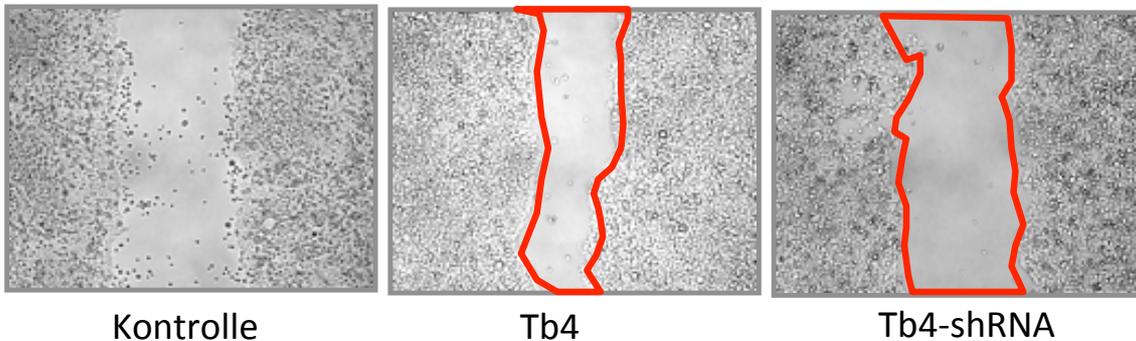
**Abb. 20a:** Repräsentative Beispielbilder der Co-Kulturen aus HL-1 und HMEC-Zellen nach 18h Inkubation. (Vergrößerung 32x)



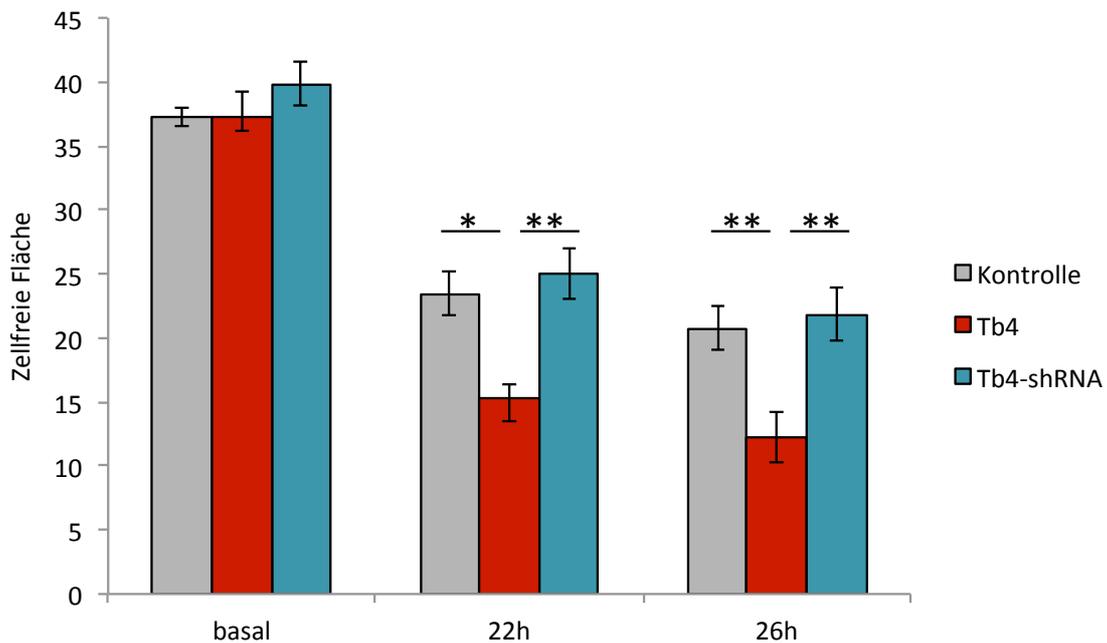
**Abb. 20b:** Quantifizierung der endothelialen Ringformationen pro Gesichtsfeld nach 18h Inkubation auf Matrigel. HL-1= Kontrollgruppe, HL-1+Tb4 stabil transfizierten Zellen +/- Tb4 Antikörper; Die stabile Transfektion von HL-1-Zellen mit Tb4 erhöhte die Anzahl an endothelialen Ringbildungen hoch signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe und im Vergleich zur zusätzliche Gabe eines Tb4-Antikörpers (Tb4-Ak).

### 3.1.5 Tb4 stimuliert die Migration endothelialer Zellen in vitro

Ein wichtiger Bestandteil der Angiogenese ist die Migrationsfähigkeit von Endothelzellen. Diese wurde im Hinblick auf eine Tb4-vermittelte proangiogene Wirkung näher in dem unter 2.2.6 erläuterten Migrationsassay untersucht.



**Abb. 21a:** Repräsentative Bilder der Migrationsfähigkeit endothelialer Zellen nach 22h. Beispielhaft rot umrandet ist die verbliebene zellfreie Fläche. (Vergrößerung 10x)



**Abb. 21b:** Dargestellt ist die verbliebene zellfreie Fläche zu den Zeitpunkten 0h, 22h und 26h. Zum Ausgangszeitpunkt 0h bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Nach 22 und 26h war die zellfreie Fläche in Tb4-überexprimierenden Zellen signifikant erniedrigt, wohingegen die Anwesenheit einer Tb4-shRNA keine statistisch signifikante Änderung der zellfreien Fläche im Vergleich zur Kontrolle erzielte.

Die Ausgangsdistanz zwischen den beiden konfluenten Zellrasen zeigte zum Zeitpunkt 0 in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Tb4-überexprimierende Zellen zeigten im Vergleich zu Kontrollen eine gesteigerte Migrationsfähigkeit, welche nach 22h (Tb4:  $15,3 \pm$

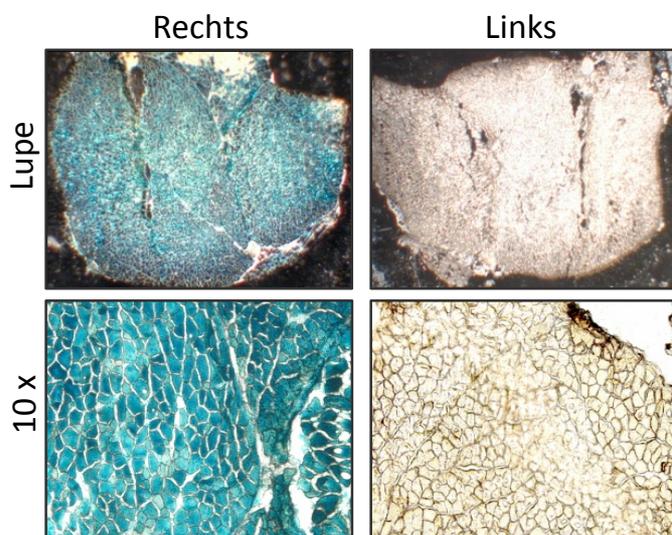
1,9 ZF=zellfreie Fläche vs. Kontrolle:  $23,4 \pm 1,7$  ZF) und 26h (Tb4:  $12,3 \pm 2,0$  ZF vs. Kontrolle:  $20,8 \pm 1,7$  ZF) signifikant war. Die Blockierung der Tb4-Expression mittels einer Tb4-shRNA inhibierte diesen Effekt (Tb4-shRNA: 22h:  $25,0 \pm 2,1$  ZF; 26h:  $21,8 \pm 2,1$  ZF) (s. Abb. 21a; 21b)

### 3.2 Nachweis des AAV 2.9 in vivo

Die effektive Expression des AAV2.9 nach intramuskulärer Injektion wurde mit Hilfe folgender Methoden gezeigt:

#### 3.2.1 $\beta$ -Galaktosidase Färbung: Mausmodell

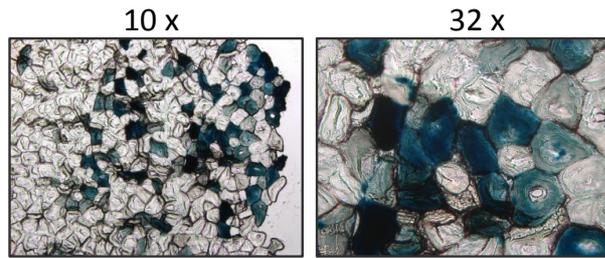
21 Tage nach intramuskulärer Injektion des AAV2.9-Lac-Z ( $3 \times 10^{12}$ ) wurden  $\beta$ -Galaktosidase Färbungen des M. Gastrocnemius und M. Adduktor angefertigt und mit dem kontralateralen PBS-injizierten Hinterlauf verglichen. Es zeigte sich eine homogene Transduktion der Myozyten im AAV2.9-Lac-Z-injizierten Hinterlauf. Im kontralateralen Hinterlauf konnte keine Lac-Z-Expression nachgewiesen werden (s. Abb. 22).



**Abb. 22:** Nachweis des Lac-Z-Konstrukts mittels  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung (blau) in der murinen Muskulatur; A= injizierter M. Gastrocnemius und B= sham-injizierter Muskel.

#### 3.2.2 $\beta$ -Galaktosidase Färbung: Kaninchenmodell

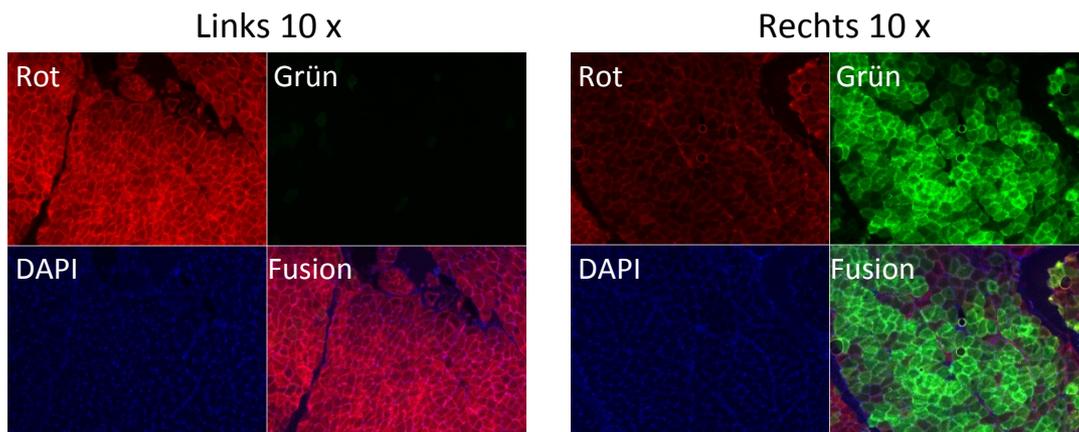
35 Tage nach intramuskulärer Injektion in den Hinterlauf konnte auch im Kaninchenmodell das Vorhandensein von Lac-Z positiven Myozyten (s. Abb. 23) nachgewiesen werden.



*Abb. 23: Nachweise des AAV 2.9-Lac-Z 35 Tage nach intramuskulärer Injektion in die Muskulatur des Kaninchenhinterlaufs.*

### 3.2.3 Nachweis des AAV2.9 unter Verwendung einer „Tomato Maus“

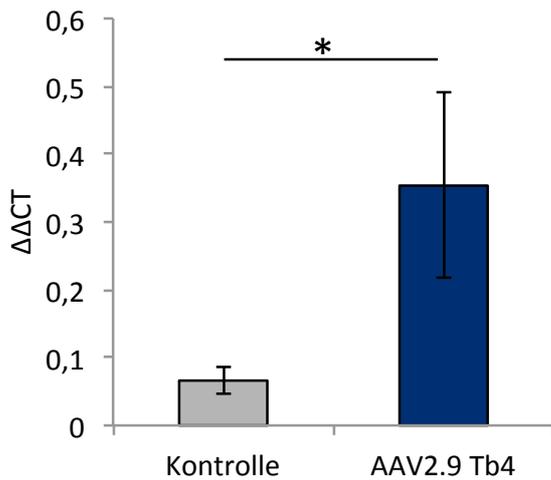
Des Weiteren wurde die Expression des AAV2.9 mithilfe der *ACTB-tdTomato-EGFP* Tomato-Mäuse untersucht. Hierbei wurde ein AAV2.9-Cre einseitig intramuskulär injiziert und nach 21 Tagen das Muskelgewebe entnommen. Im Hinterlauf der AAV2.9-Cre injizierten Seite kam es zum Farbumschlag (von rot zu grün) in den Myozyten, induziert durch eine erfolgreiche Expressionsänderung bei Präsenz der exogenen Cre-Rekombinase. Die Myozyten des nicht injizierten, kontralateralen Hinterlaufs zeigten keine Farbänderung (s. Abb. 24).



*Abb. 24: Links: Beispielbilder der nicht-injizierten Kontrollseite; Rechts: Dargestellt ist die Muskulatur nach AAV2.9-Cre Injektion (Farbumschlag in den Myozyten). (Vergrößerung 10x)*

### 3.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR Analysen: Maus

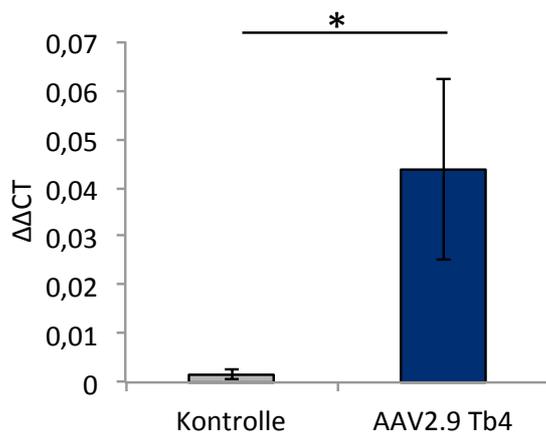
Das Expressionsniveau von Tb4 wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert. Hierfür wurden 3 Tage nach Ischämieinduktion (= 17 Tage nach AAV2.9-Tb4 Injektion) die Muskeln des Hinterlaufs entnommen und PCR-Analysen durchgeführt. Verglichen wurden die Expressionslevel von AAV2.9-Tb4 injizierten Mäusen und AAV2.9 Lac-Z behandelten Kontrollmäusen. Die RNA-Level von Tb4 wurden hierbei jeweils zur GAPDH normalisiert. Es zeigte sich, dass nach AAV2.9-Tb4 Injektion das Expressionsniveau von Tb4 signifikant erhöht war ( $0,35 \pm 0,14$ ) im Vergleich zu Mäusen, welche einen Kontrollvirus erhalten hatten ( $0,07 \pm 0,19$ ). (s. Abb. 25)



**Abb. 25:** Auf RNA-Ebene resultierte die Transduktion der murinen Muskulatur mit einem AAV2.9-Tb4 in einer signifikanten Erhöhung der Tb4-Expression im Vergleich zu mit Kontrollvirus behandelten Mäusen. Dargestellt als Verhältnis zur GAPDH-Expression;

### 3.2.5 Quantitative Echtzeit-PCR Analysen: Kaninchen

Die Analyse der Tb4-Expression im Kaninchenmodell ergab 35 Tage nach intramuskulärer Injektion des AAV2.9-Tb4 eine signifikante Steigerung des Tb4-RNA-Niveaus im Vergleich zu mit Kontrollvirus behandelten Tieren ( $0,047 \pm 0,019$  vs.  $0,0016 \pm 0,001$ ) (s. Abb. 26).

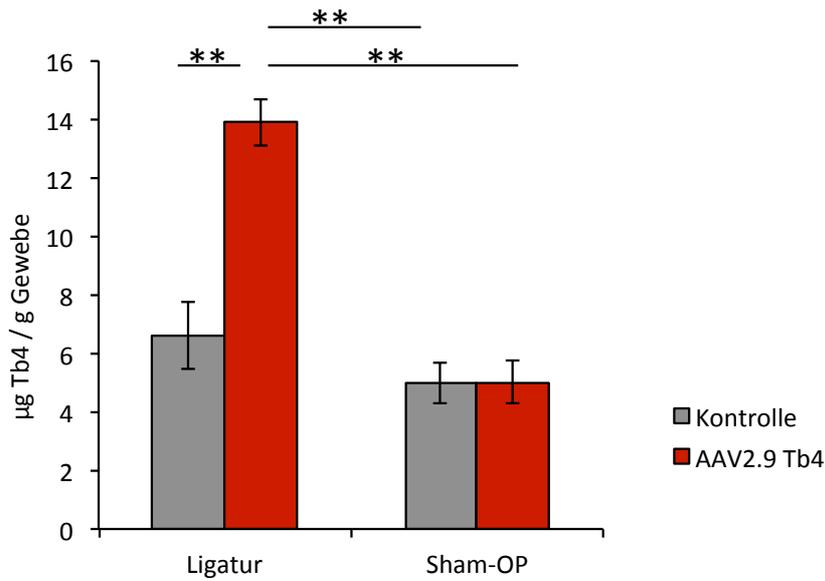


**Abb. 26:** Im Kaninchenmodell zeigte sich eine signifikante Steigerung der Tb4-Expression im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Werte sind im Verhältnis zur Expression der GAPDH dargestellt.

### 3.2.6 Tb4-Proteinbestimmung mittels HPLC

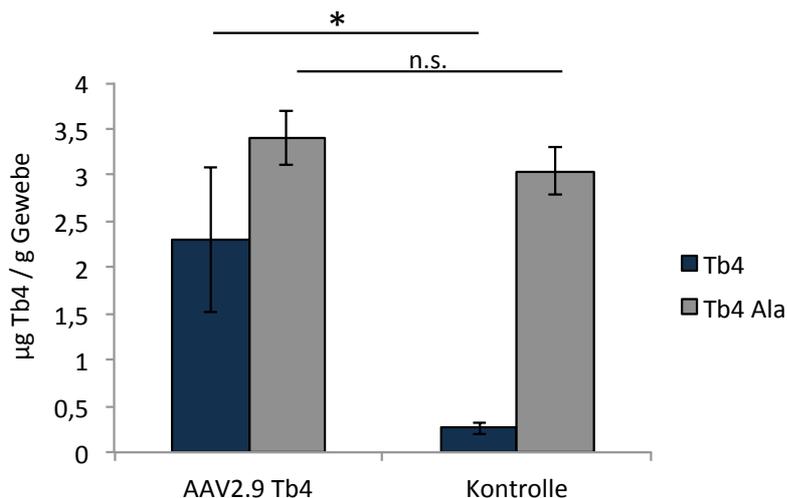
Aufgrund der geringen Größe von Tb4 wurde dessen Proteinniveau in der Muskulatur mittels HPLC-Analysen gemessen. Das Gewebe für die HPLC-Analysen der murinen Hinterlaufmuskulatur wurde 3 Tage nach Induktion der Hinterlaufischämie entnommen.

Mausmodell: Die Messung des Proteingehalts an Gesamtthymosin (angegeben in  $\mu\text{g Tb4} / \text{g}$  Gewebe) des mit AAV2.9-Tb4 injizierten Hinterlaufs zeigte einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur nicht-injizierten, shamoperierten Seite (AAV2.9-Tb4-Ischämie:  $13,9 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$  ( $\mu\text{g Tb4/g}$  Gewebe) vs. Sham-OP:  $5,0 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$ ). In Kontrollmäusen zeigte sich nur ein minimaler Anstieg an Tb4 im Gewebe nach Ischämieinduktion im Vergleich zur shamoperierten Seite (Kontrolle Ischämie:  $6,6 \pm 1,1 \mu\text{g/g}$  vs. Kontrolle sham-OP:  $5,0 \pm 0,7 \mu\text{g/g}$ ). (s. Abb. 27)



**Abb. 27:** Dargestellt ist der Tb4-Proteingehalt gemessen in  $\mu\text{g Tb4 / g Gewebe}$ . In nicht injizierten Mäusen zeigt sich ein leichter Anstieg des Tb4-Gehalts 3 Tage nach Ischämieinduktion. AAV2.9-Tb4-Injizierte Mäuse zeigen eine Verdopplung des Tb4-Levels, jedoch nur auf der injizierten Seite und nicht im kontralateralen Hinterlauf.

Kaninchenmodell: Durch die Möglichkeit der separaten Analyse von Tb4 und Tb4-Ala in Muskelproben des Kaninchens konnte hier das Gesamthymosin näher in endogenes und exogenes Tb4 differenziert werden. Hierunter präsentierte sich der Proteingehalt an endogenem Tb4 (Tb4 Ala) stabil (AAV2.9- Tb4  $3,4 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$  vs. Kontrolle  $3,0 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ), während das exogene Tb4 nach AAV2.9-Tb4 Injektion signifikant hochreguliert wurde (AAV2.9- Tb4  $2,3 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$  vs. Kontrolle  $0,3 \pm 0,3 \mu\text{g/g}$ ) (s. Abb. 28).

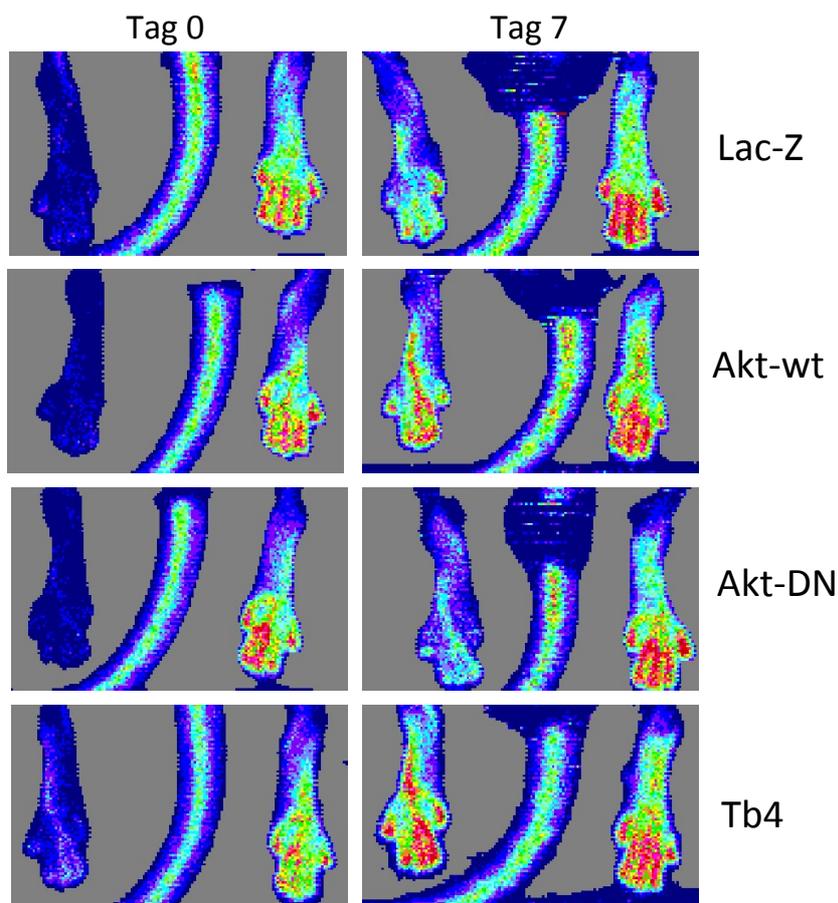


**Abb. 28:** 35 Tage nach AAV2.9-Tb4 Injektion zeigte sich der Gehalt an endogenem Tb4-Ala (grau) nicht signifikant verändert. Die Proteinmenge an exogenem Tb4 (blau), welche vorher kaum nachweisbar war zeigte sich signifikant erhöht.

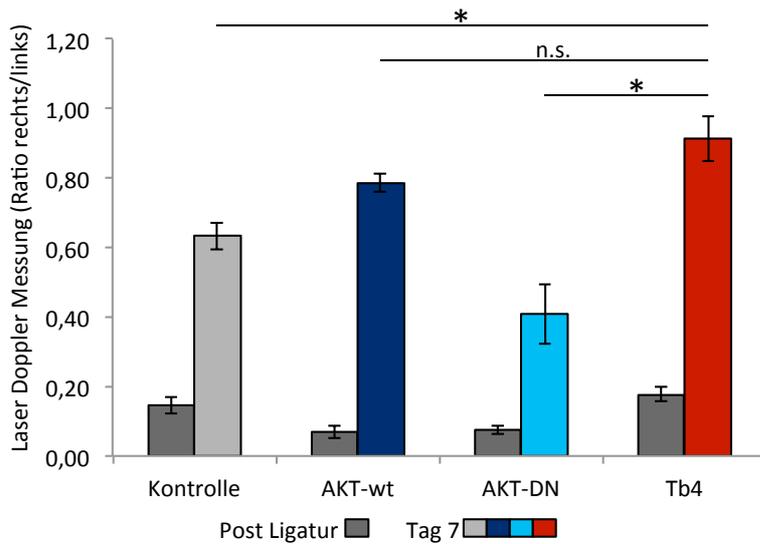
### 3.3 Tb4 stimuliert die postischämische Revaskularisierung *in vivo* (Mausmodell)

#### 3.3.1 Tb4 und die Proteinkinase B / AKT *in vivo*

Zur Untersuchung der Angiogenese und Arteriogenese *in vivo*, wurden C57/Bl6 Mäuse wie unter 2.2.10 beschrieben operiert und im Verlauf Laser-Doppler-Perfusionsmessungen durchgeführt. 14 Tage präoperativ wurde mittels intramuskulärer AAV2.9-Injektion eine Überexpression von Tb4, wt-AKT oder AKT-DN induziert. Die Überexpression von Tb4 erzielte eine signifikante Zunahme der Perfusion an Tag 7 ( $0,91 \pm 0,06$  L/S = Verhältnis ligiert/shamoperiert). Simultane Ergebnisse zeigte die Applikation der wt-AKT ( $0,79 \pm 0,02$  L/S). Die Gabe der AKT-DN ( $0,41 \pm 0,04$  L/S) führte hingegen zu einer Inhibierung der physiologischen Revaskularisierung unterhalb des Kontrollniveaus ( $0,63 \pm 0,04$  L/S) (s. Abb. 29a; 29b).

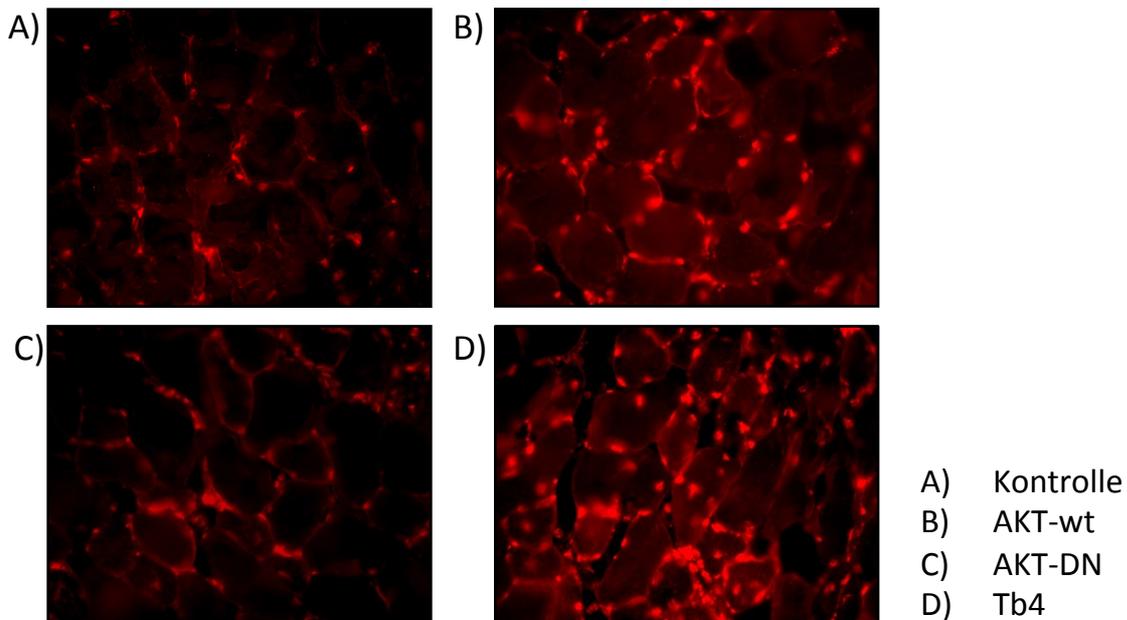


**Abb. 29a:** Beispielbilder der Laser-Doppler-Messungen an Tag 0 unmittelbar nach Ligatur der *A. femoralis* rechts, sowie 7 Tage nach Ischämieinduktion.

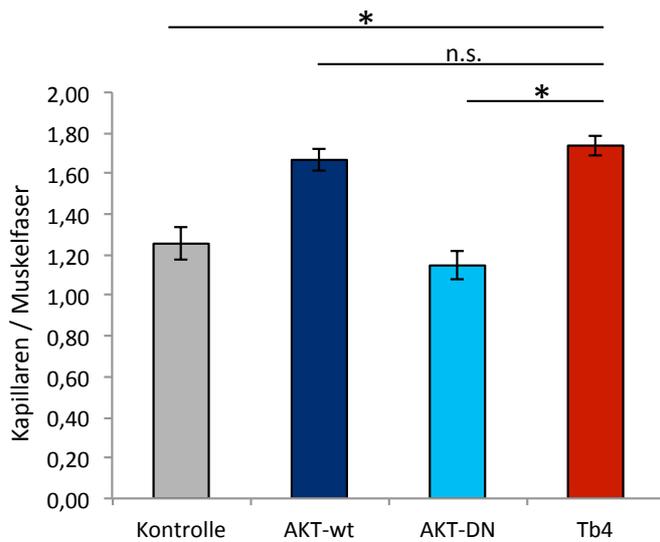


**Abb. 29b:** Quantifizierung der Laser-Doppler Perfusionmessungen als Ratio des ligierten Beins zum sham-operierten Bein. Grau: Tag 0 postoperativ; Farbig: Tag 7

Neben der Perfusion wurde auch die Angiogenese näher betrachtet. Hierzu wurden Alkalische Phosphatase Färbungen, sowie PECAM-1-Färbungen angefertigt und das Verhältnis von Kapillaren pro Muskelfaser (K/MF) in der Unterschenkelmuskulatur quantifiziert. Mit Tb4 behandelte Mäuse zeigten hierbei eine signifikante Zunahme der Kapillardichte im Vergleich zu Kontrolltieren (Tb4:  $1,74 \pm 0,1$  K/MF vs. Kontrolle:  $1,26 \pm 0,1$  K/MF) oder mit einer AKT-DN ( $1,15 \pm 0,1$  K/MF) behandelten Tieren. Das Vorhandensein einer AKT-wt ( $1,67 \pm 0,1$  K/MF) ergab keinen signifikanten Unterschied zur Therapie mit Tb4 (s. Abb. 30a; 30b).



**Abb. 30a:** Repräsentative Beispielbilder der PECAM-1 Färbung des M. Gastrocnemius nach 7-tägiger Ischämie. (Vergrößerung 40x)

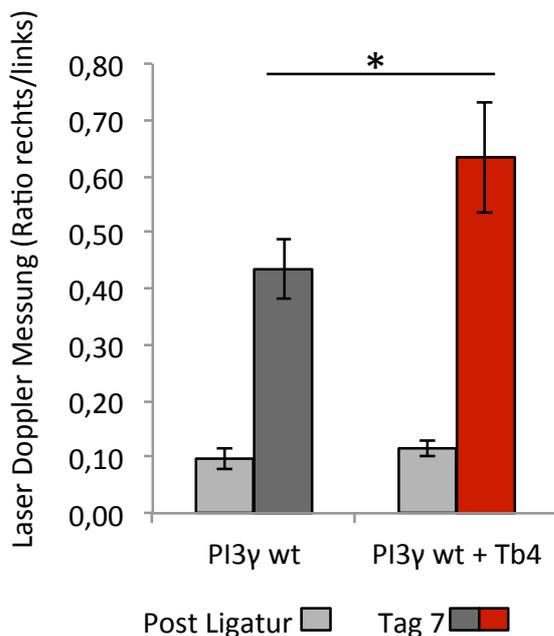


**Abb. 30b:** Quantifizierung der Kapillarbildung des *M. Gastrocnemius* 7 Tage nach Ligatur der *A. Femoralis*. Ergebnisse sind dargestellt als Ratio von Kapillaren pro Muskelfaser.

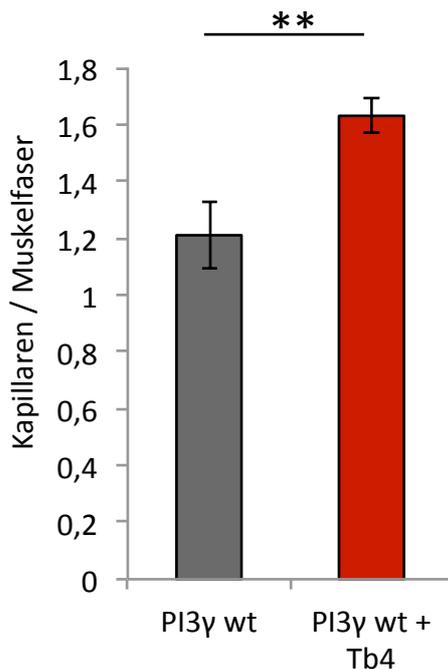
### 3.3.2 Tb4 und die PI3-Kinase gamma in vivo

Zur näheren Differenzierung der Rolle der PI3-Kinase innerhalb des Tb4-vermittelten Signalweges wurden PI3-Kinase-gamma Knockout-Mäuse mit dem AAV2.9-Tb4 behandelt. Aufgrund des von Vorversuchen (C57/Bl6-Mäuse) unterschiedlichen Mausstammes wurden die Geschwister-Wildtypen der Knockout-Mäuse (SV-129-Mäuse) als regelrechte Kontrollen untersucht.

Die Behandlung der SV-129-Wildtyp-Mäuse mit dem AAV2.9-Tb4 resultierte in einer signifikanten Steigerung der Perfusion an Tag 7 im Vergleich zu mit Kontrollvirus behandelten Mäusen (PI3- $\gamma$ -wt+Tb4:  $0,63 \pm 0,1$  L/S vs. PI3- $\gamma$ -wt:  $0,43 \pm 0,05$  L/S) (s. Abb. 31a). Die Kapillarisation der wt-Tiere konnte ebenfalls durch Tb4-Überexpression gesteigert werden (PI3- $\gamma$ -wt+Tb4:  $1,63 \pm 0,06$  K/MF vs. PI3- $\gamma$ -wt:  $1,21 \pm 0,12$  K/MF) (s. Abb. 31b).

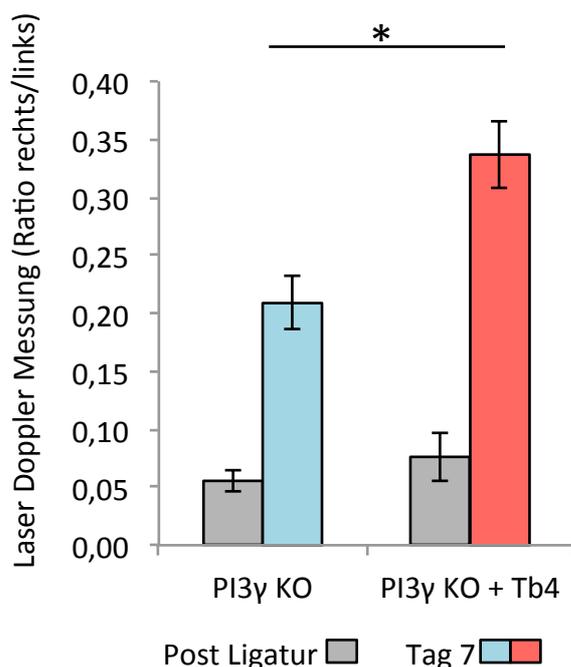


**Abb. 31a:** Quantifizierung der Perfusion nach 7-tägiger Ischämie in PI3 $\gamma$ -Wildtyp-(wt)-Mäusen (Kontrolle) im Vergleich zu PI3 $\gamma$ -Wildtyp-(wt)-Mäusen nach AAV2.9 vermittelter Überexpression von Tb4.

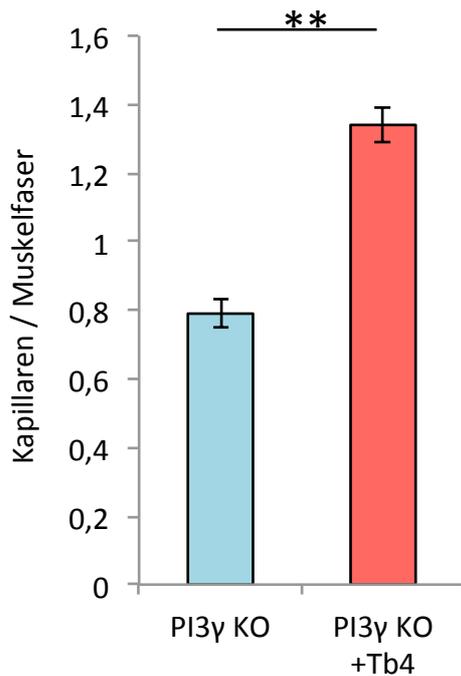


**Abb. 31b:** Analyse der Kapillardichte des *M. Gastrocnemius* 7 Tage postoperativ. Tb4-Überexpression induziert eine signifikante Steigerung der Kapillaren pro Muskelfaser im Vergleich zu unbehandelten PI3γ-wt-Mäusen.

Wie bereits von Emilio Hirsch beschrieben, zeigten die PI3-gamma Knockout-Mäuse eine signifikant schlechtere Angiogenese und Arteriogenese nach Ligatur der A. femoralis<sup>32</sup>. Überraschenderweise erzielte jedoch die Applikation von Tb4 einen signifikanten Anstieg in der Perfusionsmessung mittels Laser-Doppler (PI3-γ-KO+Tb4:  $0,34 \pm 0,03$  L/S vs. PI3-γ-KO-Kontrolle:  $0,21 \pm 0,02$  L/S). Des Weiteren zeigte sich auch eine signifikante Zunahme der Kapillarisation nach Tb4-Behandlung in PI3-gamma-Knockout-Mäusen (PI3-γ-KO+Tb4:  $1,34 \pm 0,05$  K/MF vs. PI3-γ-KO-Kontrolle:  $0,79 \pm 0,04$  K/MF) (s. Abb. 32a; 32b).



**Abb. 32a:** Laser-Doppler-Perfusionsmessung postoperativ und nach 7 Tagen. Die Applikation von Tb4 in PI3γ-Knockout(KO)-Mäusen induzierte eine signifikante Zunahme der Perfusion an Tag 7.



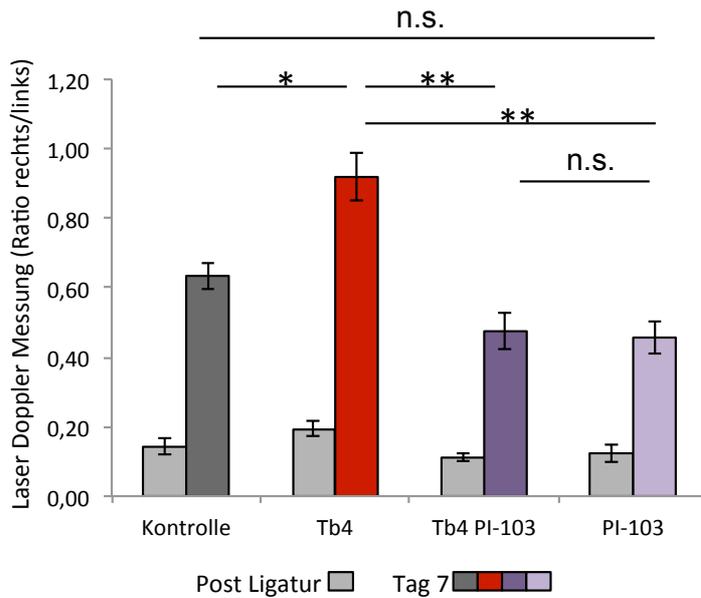
*Abb. 32b:* Die Anzahl an Kapillaren pro Muskelfaser konnte in PI3γ-KO Mäusen durch Behandlung mit Tb4 hochsignifikant gesteigert werden.

### 3.3.3 Tb4 und die PI3-Kinase alpha in vivo

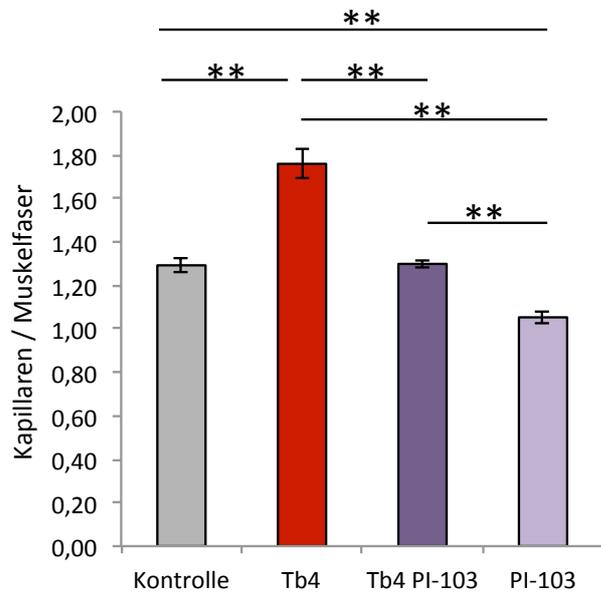
Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchung der PI3-Kinase-gamma Knockout-Mäuse wurde die Relevanz der PI3-Kinase Isoform-alpha für die Tb4 vermittelte Wirkung untersucht. Da PI3-Kinase-alpha Knockout-Mäuse embryonal letal sind<sup>26</sup>, wurde anstelle der Knockout-Mäuse ein isoformspezifischer, pharmakologischer Inhibitor (PI-103) eingesetzt. Dieser wurde in DMSO gelöst über 1 Woche täglich intraperitoneal injiziert. Kontrollmäuse erhielten über 7 Tage eine tägliche, intraperitoneale DMSO-Gabe.

Die Kombination von PI-103 mit dem AAV2.9 Tb4 resultierte in einer Hemmung der Tb4-induzierten Perfusionssteigerung (Tb4+PI-103:  $0,47 \pm 0,05$  L/S vs. Tb4:  $0,92 \pm 0,07$  L/S). Die alleinige Behandlung mit PI-103 zeigte einen Trend in der Perfusion unterhalb des Kontrollniveaus, welcher jedoch statistisch nicht signifikant war (PI-103:  $0,46 \pm 0,05$  L/S vs. Kontrolle:  $0,63 \pm 0,04$  L/S). (s. Abb. 33a)

Die Untersuchung der Angiogenese ergab eine deutliche Hemmung der Tb4-vermittelten Kapillarisation bei Co-Applikation von PI-103 (Tb4 + PI-103:  $1,3 \pm 0,02$  K/MF vs. Tb4:  $1,76 \pm 0,07$  K/MF). Ebenso führte auch die alleinige Gabe von PI-103 zu einer signifikanten Reduzierung der Kapillardichte, unterhalb des Kontrollniveaus (PI-103  $1,05 \pm 0,03$  K/MF vs. Kontrolle:  $1,29 \pm 0,04$  K/MF) (s. Abb. 33b).



**Abb. 33a:** Quantitative Analyse der Perfusion als Verhältnis des operierten Hinterlaufs zum sham-operierten Bein direkt postoperativ und nach 7 Tagen. Die signifikante Steigerung des Blutflusses durch Tb4 wurde durch die Behandlung mit PI-103 blockiert.



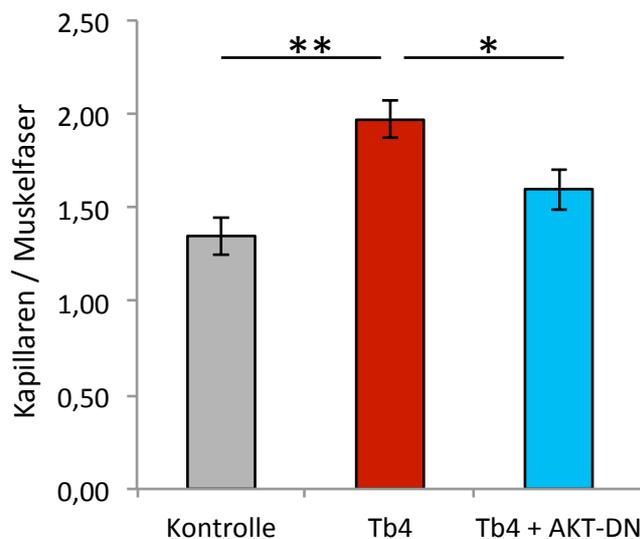
**Abb. 33b:** Die Auswertung der Kapillardichte im *M. Gastrocnemius* zeigte eine Hemmung der Tb4-vermittelten Kapillarisation durch den spezifischen PI3-Kinase-alpha Inhibitor, PI-103. Die alleinige Behandlung mit PI-103 führte zu einer Rarefizierung der Kapillardichte unterhalb des Kontrollniveaus.

### 3.4 Funktionelle Effekte von Tb4 *in vivo* I (Kaninchenmodell)

Für die Analyse der Neovaskularisierung im Kaninchenmodell wurde die Angiogenese durch Quantifizierung der Kapillardichte und die Arteriogenese durch Analyse von Angiographien der Beinarterien bestimmt. Hierbei wurde die Anzahl an Kollateralen quantifiziert und der funktionelle Blutfluss mittels Cinedensitometrie ausgewertet. Des Weiteren wurde die Perfusion der Beinmuskulatur durch fluoreszierende Mikrosphären detektiert und quantifiziert. Zudem wurde auch die Reifung der Kapillaren durch Analyse der Anzahl an Perizyten pro Kapillare mittels Doppelimmunofluoreszenzfärbung der Muskelproben beurteilt.

### 3.4.1 Tb4 stimuliert das Kapillarwachstum

Die Kapillardichte wurde nach Versuchsende an Tag 35 durch Quantifizierung der Kapillaren pro Muskelfaser (K/MF) ermittelt. Die AAV2.9 vermittelte Überexpression von Tb4 in Ober- und Unterschenkel führte zu einer signifikanten Steigerung der Kapillarisation im Unterschenkel ( $1,97 \pm 0,1$  K/MF) im Vergleich zur Lac-Z behandelten Kontrollgruppe ( $1,35 \pm 0,1$  K/MF). Die Co-Applikation einer AKT-DN im Unterschenkel senkte die Kapillardichte signifikant ( $1,60 \pm 0,1$  K/MF). Anzeichen für Muskelnekrosen zeigten sich in keiner der untersuchten Gruppen (s. Abb. 34).

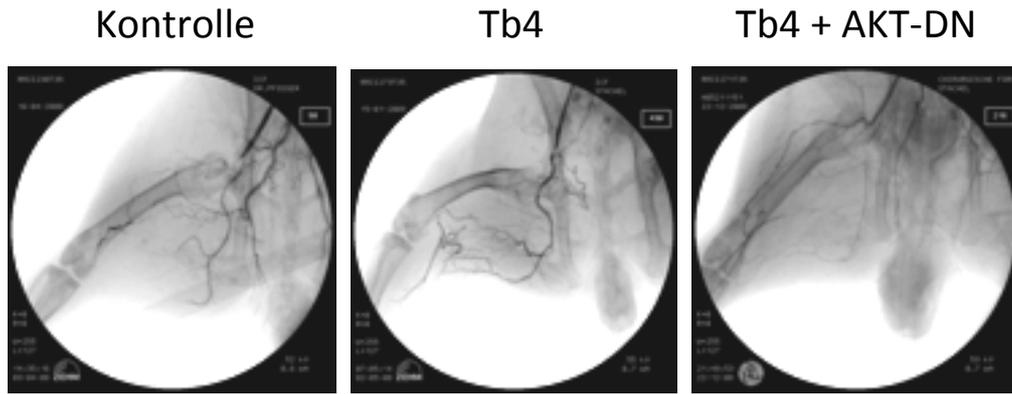


*Abb. 34:* Die Applikation von Tb4 mittels AAV2.9 stimulierte signifikant die Kapillardichte 35 Tage nach Exzision der *A. femoralis*. Die AAV2.9-vermittelte Überexpression einer AKT-DN im Unterschenkel hob diesen Effekt nahezu auf.

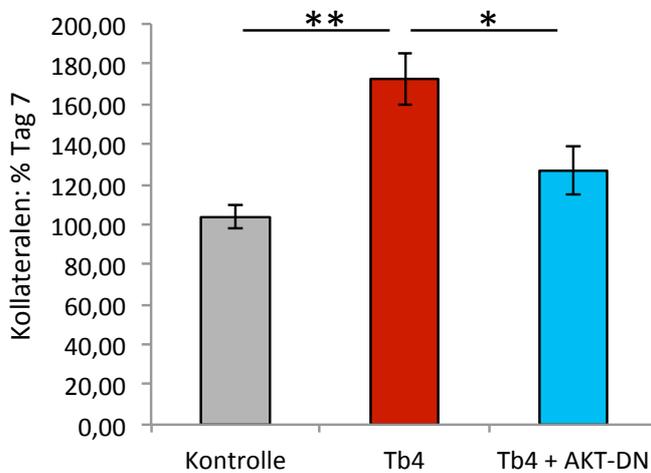
### 3.4.2 Analyse des Kollateralwachstums

Die an Tag 7 und Tag 35 durchgeführten Angiographien der Beinarterien wurden mithilfe eines Kreuzungsgitters analysiert. Die dargestellten Werte sind als Prozentwerte des Referenzwerts von Tag 7 (%T7) dargestellt.

In der Gruppe der Tb4 behandelten Kaninchen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Kollateralen zwischen Tag 7 und Tag 35 ( $172,6 \pm 13,1$  %T7) im Vergleich zur geringen Zunahme des Kollateralscores in der Kontrollgruppe ( $103,7 \pm 5,7$  %T7). Die parallele Transduktion der AKT-DN in die Unterschenkelmuskulatur der Tb4 behandelte Gruppe führte zu einer signifikanten Abnahme der Kollateralen im Vergleich zur alleinigen Tb4-Gabe ( $126,7 \pm 11,8$  % T7) (s. Abb. 35a; 35b).



**Abb. 35a:** Repräsentative Angiographien 35 Tage nach Exzision der *A. femoralis*.

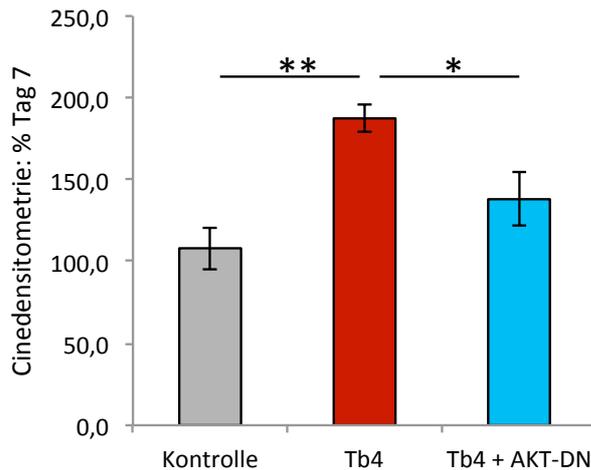


**Abb. 35b:** Dargestellt ist die prozentuale Zunahme der Kollateralenanzahl zwischen Tag 7 und Tag 35. Während die Kollateralisierung in den Kontrolltieren weitestgehend stabil blieb zeigte sich nach Tb4 Injektion eine signifikante Steigerung, welche durch die Anwesenheit der AKT-DN weitestgehend herunterreguliert wurde.

### 3.4.3 Analyse der Blutflussgeschwindigkeit mittels Cinedensitometrie

Neben der Kollateralisierung wurde auch die Zunahme der Geschwindigkeit des Blutflusses zwischen Tag 7 und Tag 35 mittels eines *Framecountscores* der Angiographien bestimmt und als %T7 quantifiziert.

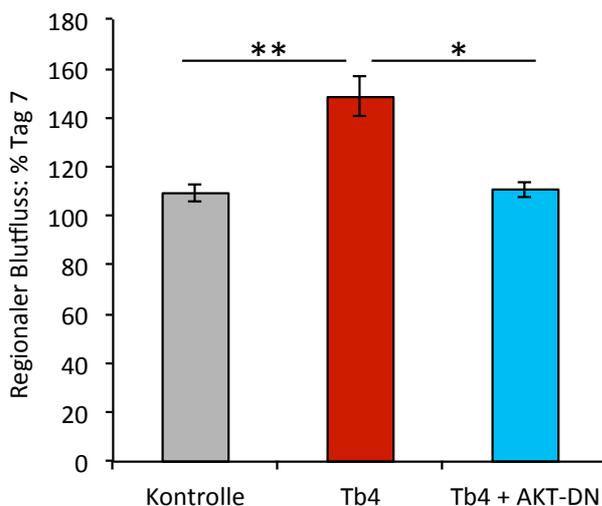
Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante Verbesserung des Blutflusses in der Tb4-überexprimierenden Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tb4:  $187,5 \pm 8,2$  %T7 vs. Kontrolle:  $108,1 \pm 12,9$  %T7). Die Analyse der Cinedensitometrie der doppeltransduzierten Tiere mit Tb4 und AKT-DN ergab keine signifikante Steigerung der Blutflussgeschwindigkeit ( $138,1 \pm 16,3$  %T7) im Vergleich zu Kontrolltieren (s. Abb. 36).



*Abb. 36:* Darstellung der Cinedensitometrie als prozentualer Wert bezogen auf Tag 7 (%T7). Die Tb4 Überexpression erzielte eine signifikante Steigerung der Perfusion, welche durch Anwesenheit der AKT-DN signifikant reduziert wurde.

### 3.4.4 Perfusionsbestimmung mittels fluoreszierender Mikrosphären

Der regionale Blutfluss im ischämischen Gewebe wurde durch die Applikation fluoreszierender Mikrosphären an Tag 7 und Tag 35 ermittelt. Bei der Berechnung der Perfusion wurde jeweils ein an beiden Messtagen erhobener Referenzwert eingerechnet und die Ergebnisse als %T7 dargestellt.



*Abb. 37:* Der mittels Mikrosphärenmessung analysierte regionale Blutfluss ergab eine hochsignifikante Steigerung im ischämischen Muskelgewebe von Tb4-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die parallele Transduktion des Unterschenkels mit einer AKT-DN inhibierte diesen Effekt signifikant.

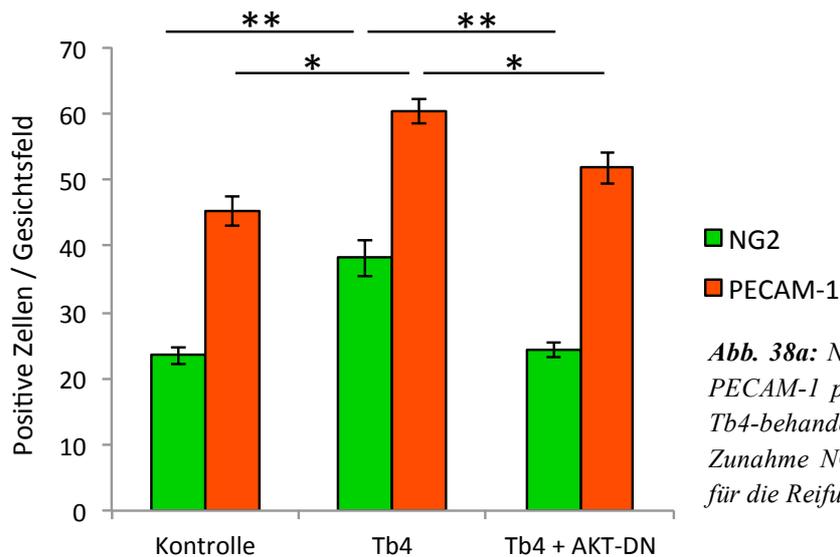
Die Tb4-transduzierte Gruppe erzielte einen signifikanten Anstieg des regionalen Blutflusses im ischämischen Hinterlauf zwischen Tag 7 und Tag 35 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tb4:  $148,4 \pm 8,1$  %T7 vs. Kontrolle:  $109,2 \pm 3,3$  %T7). Die Inhibierung der AKT im Unterschenkel war ausreichend um die Wirkung der Tb4-Überexpression zu unterdrücken ( $110,8 \pm 3,1$  %T7) (s. Abb. 37).

### 3.4.5 Doppelimmunofluoreszenzhistologie zur Bestimmung der Kapillarreifung

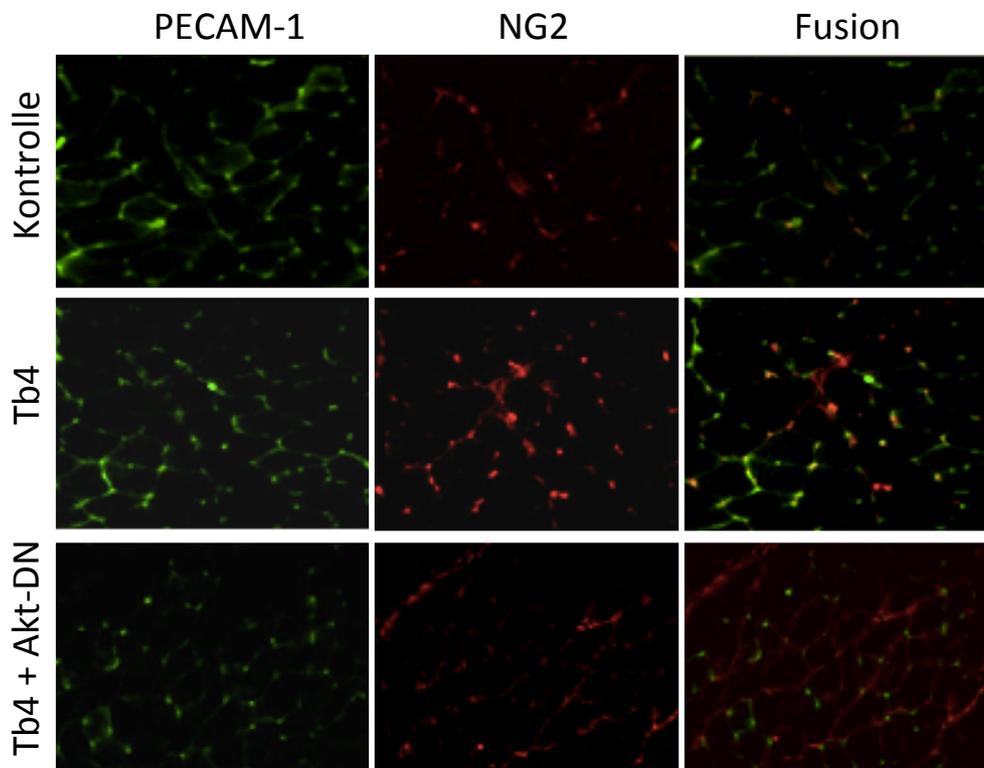
Neben der Kapillardichte wurde auch die Anlagerung von Perizyten als Indikator für die Kapillarreifung untersucht. Hierzu wurden Doppelimmunofluoreszenzfärbungen angefertigt,

wobei PECAM-1 als Marker für Kapillaren (K) und NG2 als Nachweis für Perizyten (P) analysiert wurde.

Es zeigte sich, dass Tb4 nicht nur die Anzahl an Kapillaren erhöhte (Tb4:  $120,4 \pm 3,8$  (K) vs. Kontrolle  $90,4 \pm 4,4$  (K)) sondern auch die Anzahl an Perizyten (Tb4:  $76,2 \pm 5,3$  (P) vs. Kontrolle:  $46,8 \pm 2,5$  (P)). Das Vorhandensein der AKT-DN reduzierte diesen Effekt signifikant Tb4+AKT-DN ( $103,5 \pm 4,7$  (K),  $48,5 \pm 2,3$  (P)) (s. Abb. 38a; 38b).



**Abb. 38a:** Neben einer signifikanten Zunahme PECAM-1 positiver Zellen in der Muskulatur Tb4-behandelter Tiere, zeigte sich auch eine Zunahme NG2 positiver Zellen, als Indikator für die Reifung neuentstandener Kapillaren.



**Abb. 38b:** Immunofluoreszenzbilder der PECAM-1 / NG2 Doppelfärbung. (Vergrößerung 40x)

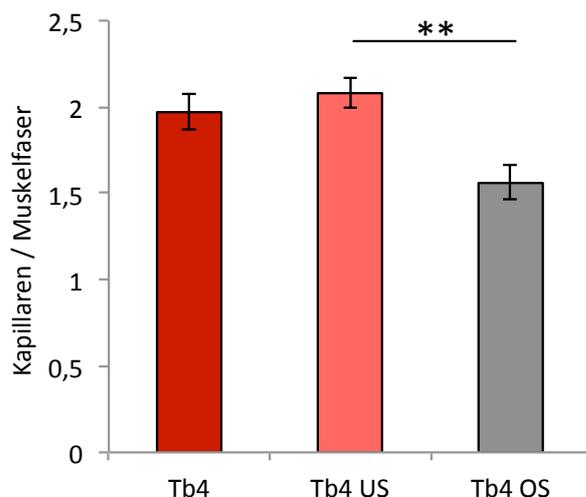
### 3.5 Funktionelle Effekte von Tb4 *in vivo* II (Kaninchenmodell)

#### 3.5.1 Allgemein: von der Mikro-zur Makrozirkulation

Das Kaninchenmodell bietet im Vergleich zum Mausmodell die Möglichkeit zwischen Angiogenese im Unterschenkel und Arteriogenese im Oberschenkel zu differenzieren. Dieser Vorteil wurde genutzt, um zu entschlüsseln, welcher der beiden Vorgänge primär für die förderliche Wirkung von Tb4 relevant erscheint. Hierfür wurden 3 Gruppen verglichen, die mit AAV2.9-Tb4 entweder nur im Unterschenkel, oder nur im Oberschenkel oder in beiden Kompartimenten behandelt wurden.

#### 3.5.2 Angiogenese

Die Quantifizierung der Angiogenese in der Unterschenkelmuskulatur ergab keine relevanten Unterschiede zwischen der Applikation des Vektors über das gesamte Bein ( $1,97 \pm 0,1$  K/MF) oder nur in den Bereich der Unterschenkelmuskulatur ( $2,08 \pm 0,1$  K/MF). Eine reine Transduktion der Oberschenkelmuskulatur führte jedoch zu einer geringeren Angiogenese in der Unterschenkelmuskulatur ( $1,56 \pm 0,1$  K/MF) (s. Abb. 39).



*Abb. 39:* Dargestellt ist die Kapillardichte der selektiv US (Unterschenkel) und OS (Oberschenkel) injizierten Tiere im Vergleich zur Tb4 (Oberschenkel + Unterschenkel) Gruppe. Während die selektive Injektion in den Unterschenkel keine signifikanten Unterschiede aufwies, resultierte die alleinige Applikation von Tb4 in den Oberschenkel in einer signifikant geringeren Kapillardichte.

#### 3.5.3 Kollateralwachstum

Für die signifikante Zunahme des Kollateralwachstums war die alleinige Tb4 Überexpression im Oberschenkel nicht suffizient ( $150,7 \pm 1,4$  %T7), wohingegen die Erhöhung des Tb4-Niveaus im Unterschenkel ausreichte um die Ausbildung der Kollateralen im Hinterlauf signifikant zu stimulieren ( $178,3 \pm 1,7$  %T7). Die erzielten Werte zeigten hierbei keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Tb4 Ober- und Unterschenkel behandelten Gruppe ( $172,6 \pm 11,9$  % T7) (s. Abb. 40a; 40b).

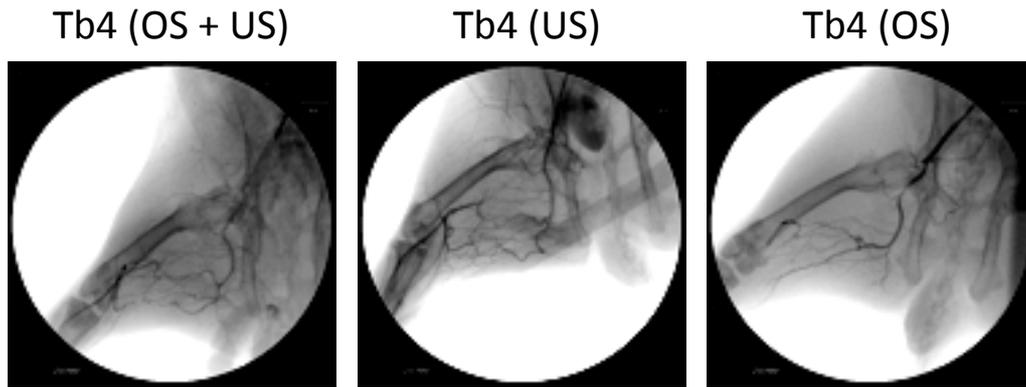


Abb. 40a: Repräsentative Beispielbilder der Angiographien von Tag 35

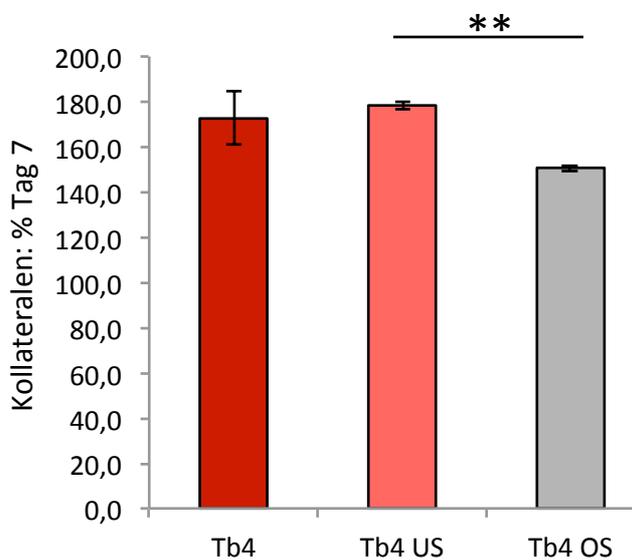
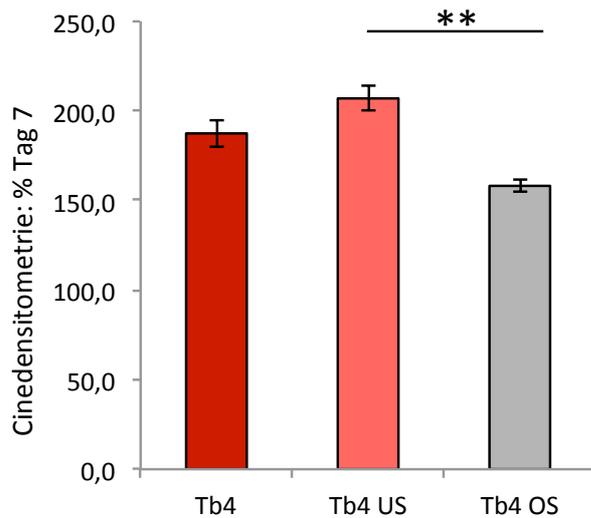


Abb. 40b: Die alleinige Applikation von Tb4 in die Unterschenkelmuskulatur induzierte eine nahezu identische Kollateralreifung wie die Injektion in Ober- und Unterschenkel. Im Gegensatz dazu induzierte das selektive Vorhandensein von Tb4 im Oberschenkel ein signifikant geringeres Wachstum der Kollateralen.

### 3.5.4 Cinedenistometrie

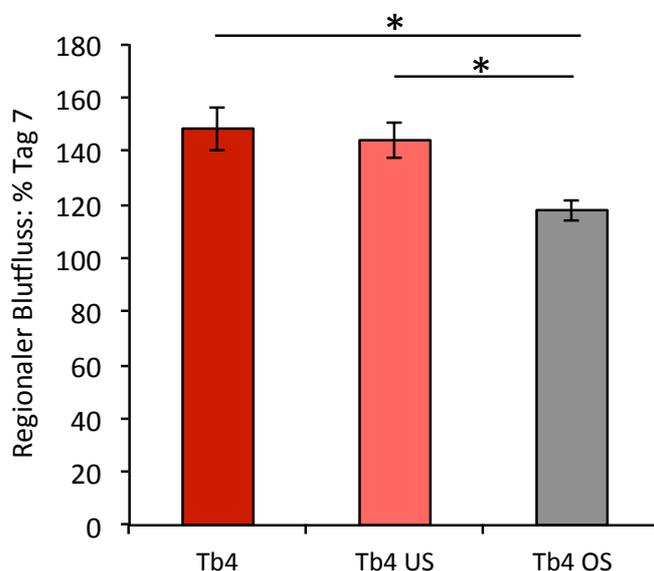
In der Analyse des Blutflusses zeigte sich, dass das alleinige Vorhandensein von Tb4 im Unterschenkel ausreichte ( $207,0 \pm 6,9 \%T7$ ), um den Blutfluss auf das Niveau der Tb4 (OS + US) Gruppe zu steigern ( $187,5 \pm 7,5 \%T7$ ), während die Applikation in die Oberschenkelmuskulatur zu einer signifikant geringeren Zunahme des Blutflusses führte ( $158,2 \pm 3,2 \%T7$ ) (s. Abb. 41).



*Abb. 41:* Dargestellt ist die Messung des Blutflusses in % von Tag 7. Die alleinige Tb4-Behandlung des Unterschenkels (US) resultierte in einer signifikant höheren Perfusion als die selektive Tb4-Überexpression im Oberschenkel (OS) des ischämischen Hinterlaufs.

### 3.5.5 Regionaler Blutfluss (Perfusion)

Der durch Mikrosphärenmessung bestimmte regionale Blutfluss zeigte ähnliche Ergebnisse. Die alleinige Applikation von Tb4 in die Oberschenkelmuskulatur resultierte auch hier in einer signifikant geringeren Perfusion ( $117,8 \pm 4,1$  %T7) als nach Injektion in die Unterschenkelmuskulatur ( $144,0 \pm 6,6$  %T7) bzw. im Vergleich zur kombinierten Therapie ( $148,4 \pm 8,1$  %T7) (s. Abb. 42).

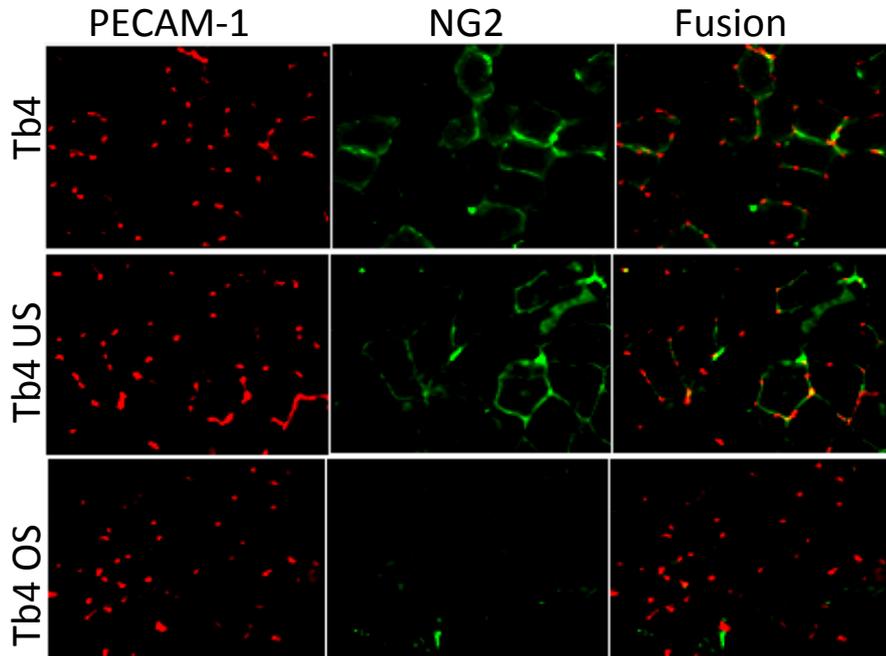


*Abb. 42:* Der regionale Blutfluss nach 35 Tagen Ischämie konnte durch Tb4-Überexpression im US signifikant mehr gesteigert werden als durch die Behandlung der OS-Muskulatur. Dargestellt als %-Wert von Tag 7.

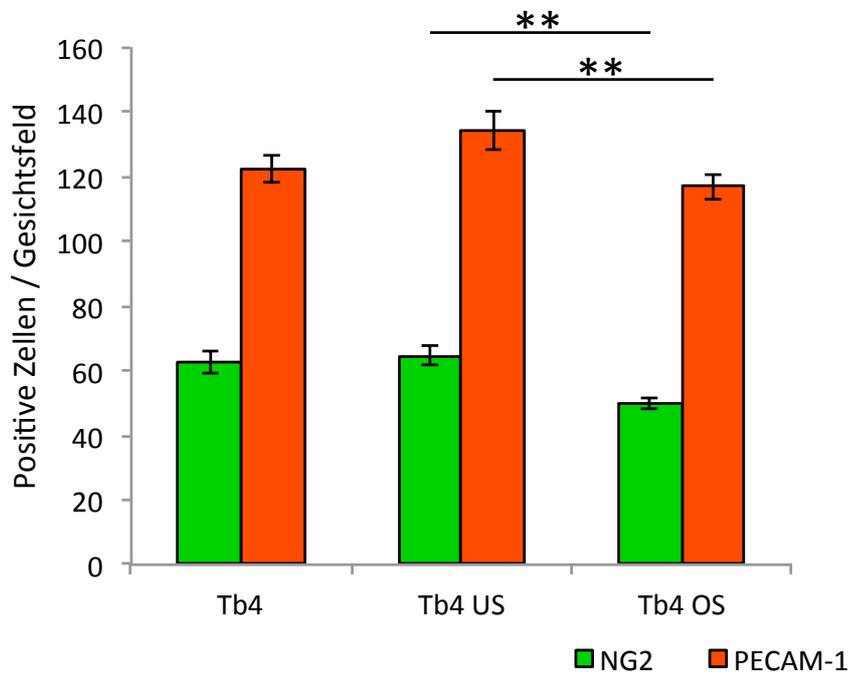
### 3.5.6 Gefäßmaturierung

Die Analyse der Neovaskularisierung in der Unterschenkelmuskulatur ergab, dass die Anzahl an PECAM-1 positiven Kapillaren (K) in den US-transduzierten Tieren signifikant höher war als in der OS-behandelten Gruppe (Tb4-US:  $134,3 \pm 6,0$  (K) vs. Tb4-OS:  $116,8 \pm 3,8$  (K)). Zudem zeigte sich auch die Anzahl an NG2-positiven Perizyten (P) signifikant erhöht (Tb4-

US:  $64,7 \pm 3,0$  (P)) im Vergleich zur OS-therapierten Gruppe (Tb4-OS:  $49,8 \pm 1,5$  (P)) (s. Abb. 43a; 43b).



**Abb. 43a:** Repräsentative Beispielbilder der PECAM-1 / NG2-Doppelfärbung der einzelnen Kaninchengruppen an Tag 35. (Vergrößerung 40x)

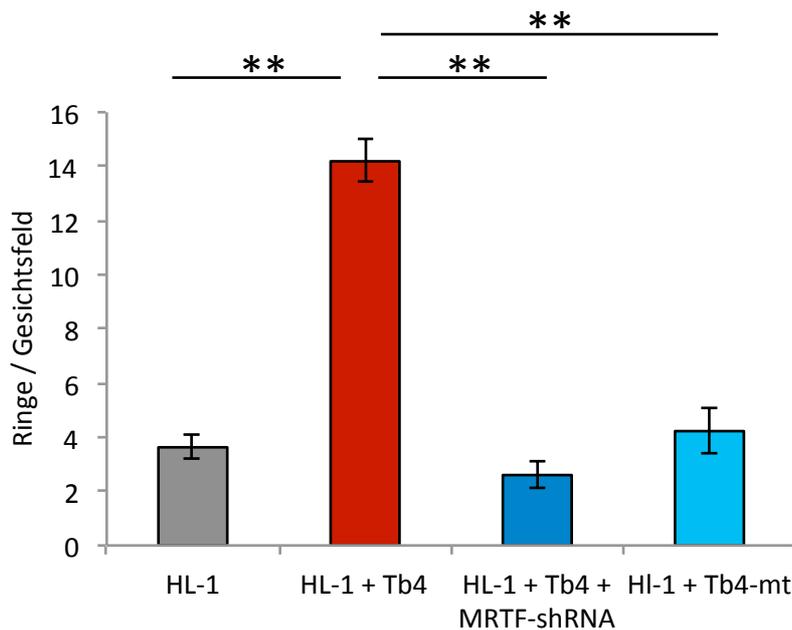


**Abb. 43b:** Sowohl die Anzahl an Kapillaren (PECAM-1), als auch die Anzahl an Perizyten (NG-2) zeigte signifikant höhere Werte nach alleiniger US-Behandlung mit Tb4 im Vergleich zur alleinigen Injektion in die OS-Muskulatur.

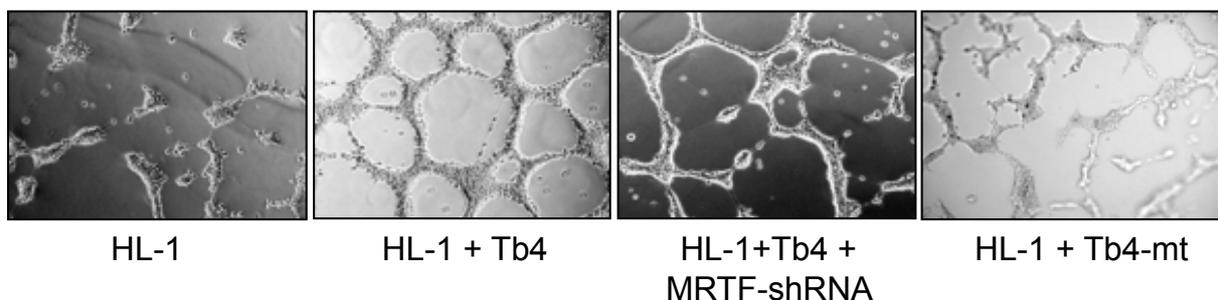
### 3.6 Tb4 und der MRTF / SRF Signalweg *in vitro* und *in vivo*

#### 3.6.1 Angiogene Effekte von Tb4 benötigen die Expression von MRTF *in vitro*

In Co-Kultur Versuchen von HL-1 und HMEC-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Tb4-induzierte Ausbildung von Ringformationen (HL-1-Tb4:  $14,2 \pm 0,8$  R/G vs. HL-1:  $3,6 \pm 0,4$  R/G) durch Anwesenheit einer MRTF-shRNA ( $2,6 \pm 0,5$  R/G) blockiert wurde. Im Unterschied zu Tb4 erzielte auch die Tb4-Mutante welche eine nicht-funktionale Aktinbindedomäne besitzt, keine signifikante Zunahme an Ringbildungen ( $4,2 \pm 0,8$  R/G). (s. Abb. 44a; 44b)



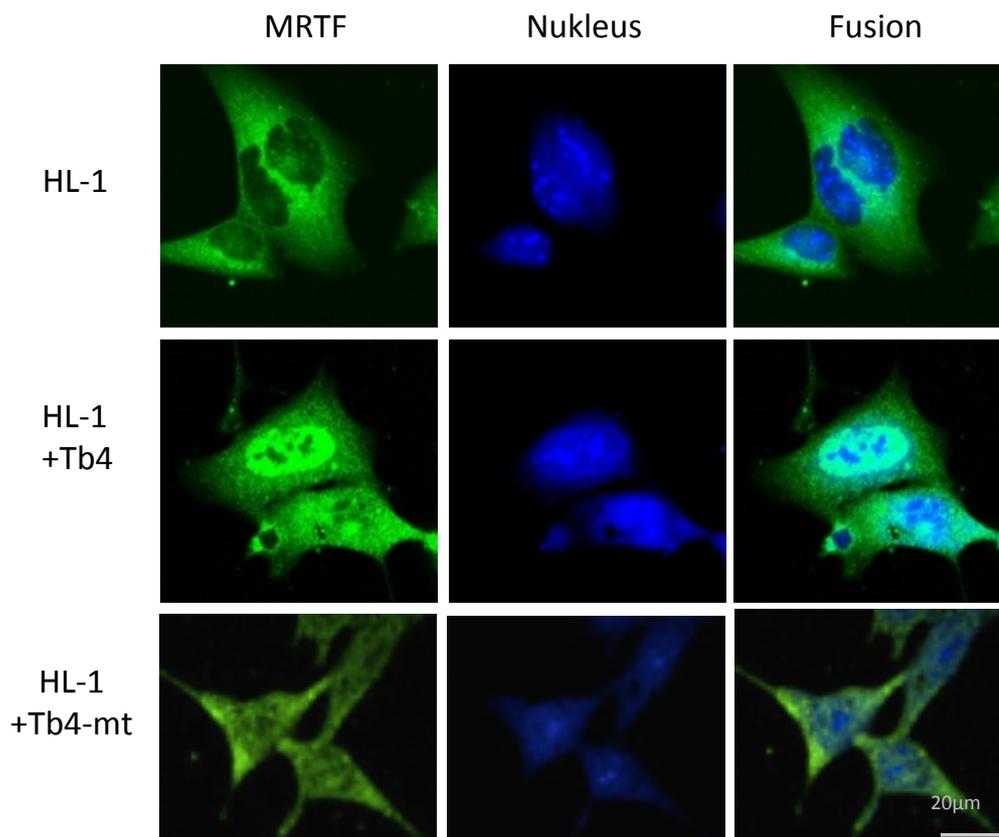
**Abb. 44a:** Nach 18h Inkubation auf Matrigel zeigte sich die Anzahl an endothelialen Ringformationen in Co-Kultur mit Tb4-überexprimierenden HL-1-Zellen signifikant erhöht. Das parallele Vorhandensein einer MRTF-shRNA inhibierte diesen positiven Effekt. Die Überexpression einer Tb4-Mutante (mt) induzierte keine nennenswerte Steigerung endothelialer Ringausbildungen.



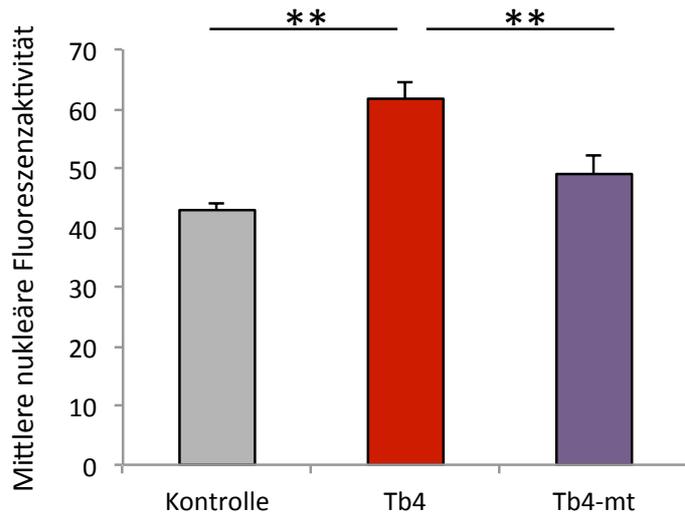
**Abb. 44b:** Repräsentative Beispielbilder der endothelialen Ringformationen nach 18h Co-Kultur mit HL-1-Zellen. (Vergrößerung 32x)

### 3.6.2 Tb4 induziert die nukleäre Translokation von MRTF

In unstimulierten Zellen befindet sich MRTF weitestgehend im Zytosol, wo es durch monomeres G-Aktin gebunden wird. Die Translokation in den Zellkern befähigt MRTF an den SRF-Promoter zu binden und dessen Aktivität zu verstärken. Aus diesem Grund wurde die Lokalisation von MRTF in unstimulierten im Vergleich zu Tb4- oder Tb4-mt-überexprimierenden Zellen untersucht. Hierbei wurde mittels Doppelimmunofluoreszenzfärbung MRTF-A/B markiert, sowie eine Kernfärbung durchgeführt und das Fluoreszenzmuster durch konfokale Lasermikroskopie analysiert. Quantifiziert wurde hierbei die mittlere Fluoreszenzintensität im Zellkern (M-FI). In kontrolltransfizierten Zellen ergab sich eine durchschnittliche Fluoreszenzaktivität von  $42,9 \pm 0,9$  M-FI wohingegen die Überexpression von Tb4 zu einer signifikanten Steigerung der nukleären Fluoreszenz auf  $61,7 \pm 2,8$  M-FI führte. Die Transfektion von Tb4-mt resultierte in keiner signifikanten Zunahme der Fluoreszenzintensität im Zellkern ( $49,0 \pm 3,0$  M-FI). (s. Abb. 45a; 45b)



**Abb. 45a:** Beispielbilder der Doppelimmunofluoreszenzfärbung von MRTF-A/B (grün) und des Nukleus (blau). Obere Zeile: Unstimulierte HL-1 Zellen, Unten: Mit Tb4 transfizierte HL-1-Zellen. (Vergrößerung 80x)



**Abb. 45b:** Analyse der mittleren grünen (MRTF-A/B) Fluoreszenz im Zellkern. Die Überexpression von Tb4 führte zu einer hochsignifikanten Zunahme der nukleären Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Kontrollzellen oder im Vergleich zur Überexpression Tb4-Mutante (Tb4-mt).

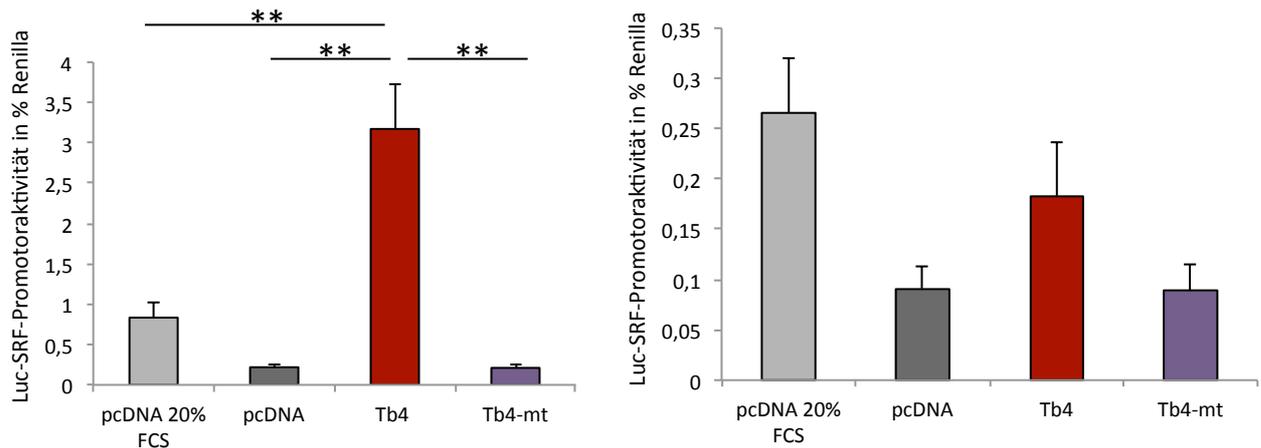
### 3.6.3 Tb4 induziert die MRTF-abhängige Aktivierung des SRF Promoters

Die MRTF-abhängige SRF-Promoteraktivität wurde mithilfe des unter 2.2.8 beschriebenen Luciferase-Assays gemessen. Hierbei konnte die SRF-Promoteraktivierung durch Kopplung an eine Luciferase relativ zur parallel gemessenen *Renilla* Luciferase-Aktivität quantifiziert werden. Die Werte sind dargestellt als SRF-Promoter-Luciferaseaktivität in % der *Renilla*-Aktivität (% Renilla).

*Endothelzellen (HMEC-Zellen):* Die Stimulation von mit pcDNA transfizierten Zellen mit 20% FCS diente hierbei als Positivkontrolle ( $0,8 \pm 0,2$  % Renilla), wohingegen FCS-freie, pcDNA transfizierte Zellen als Negativkontrolle ( $0,2 \pm 0,02$  % Renilla) verwendet wurden.

Die Überexpression von Tb4 in Endothelzellen führte zu einer signifikanten Steigerung der Promoteraktivität ( $3,2 \pm 0,6$  % Renilla), wohingegen die Tb4-Mutante keinerlei Effekt erzielte ( $0,2 \pm 0,04$  % Renilla). (s. Abb. 46 links)

*HL-1-Zellen:* In der HL-1 Zelllinie führte die FCS-Gabe ebenfalls zu einer Induktion der Promoteraktivität ( $0,3 \pm 0,05$  % Renilla vs.  $0,1 \pm 0,02$  % Renilla), welche als Trend durch Tb4-Überexpression nachgewiesen werden konnte ( $0,2 \pm 0,05$  % Renilla). Die Tb4-mt führte zu keiner Änderung der SRF-Promoteraktivierung ( $0,1 \pm 0,03$  % Renilla). (s. Abb. 46 rechts)



**Abb. 46: Links (Endothelzellen):** Die SRF-abhängige Aktivität des Luciferase-Reportergens wird nach Tb4-Transfektion hochreguliert. 20%FCS als Aktivator von SRF diente als Positivkontrolle. FCS-freie Zellen, welche mit einer pcDNA transfiziert wurden, entsprechen der Negativkontrolle. Die Transfektion der Tb4-mt ohne aktive Aktinbindedomäne hatte keinen Effekt auf die SRF Aktivität.

**Rechts (HL-1-Zellen):** Die Transfektion von Tb4 induzierte eine Erhöhung der SRF-abhängigen Luciferaseaktivität, welche als positiver Trend zu erkennen ist.

### 3.6.4 Tb4 induziert die MRTF/SRF-Zielgene CCN1 und CCN2

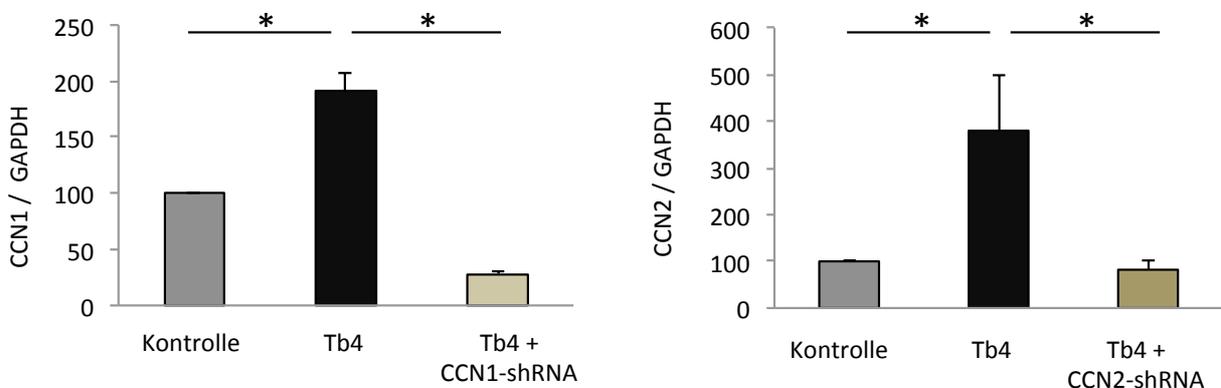
#### 3.6.4.1 CCN1 / CCN2 Expression in vitro

In HL-1-Zellen wurde die Expression der MRTF/SRF-Zielgene CCN1 und CCN2 48h nach Transfektion mit folgenden Plasmiden untersucht:

Kontrolle (pcDNA), Tb4, Tb4 + CCN1-shRNA und Tb4 + CCN2-shRNA.

Zur Reduzierung einer seruminduzierten SRF-Aktivierung wurden die Zellen für 24h in serumfreiem Medium kultiviert.

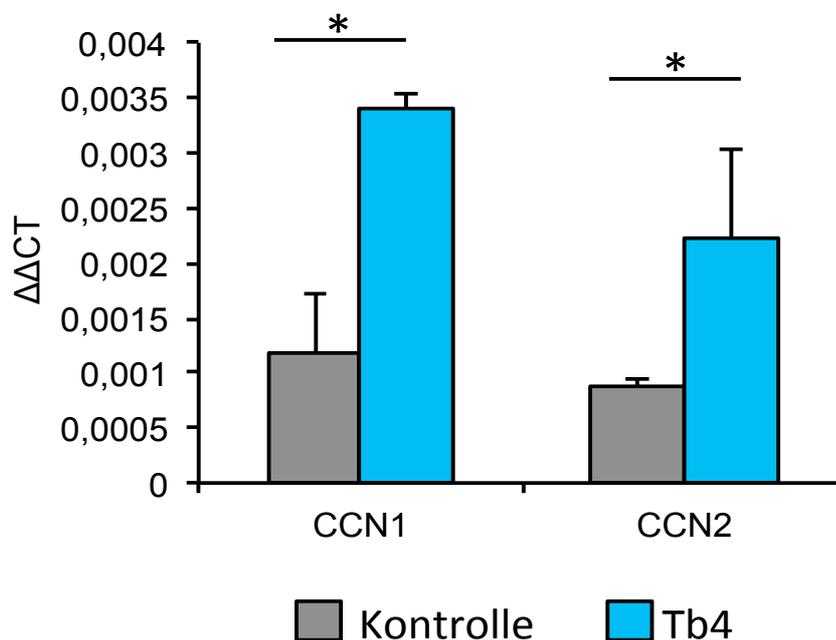
Auf RNA-Ebene zeigte sich eine signifikante Hochregulierung von CCN1 (Tb4:  $191 \pm 16$  % vs. Kontrolle = 100%, Tb4 + CCN1-shRNA:  $27 \pm 2$ %) und CCN2 (Tb4:  $380 \pm 116$  % vs. Kontrolle = 100%, Tb4 + CCN2-shRNA:  $82 \pm 18$ %) (s. Abb. 47)



**Abb. 47:** HL-1 Zellen wurden 48h nach Transfektion mit pcDNA, Tb4 oder Tb4 + CCN1/CCN2-shRNA in quantitativen Echtzeit-PCR-Analysen für die Expression der MRTF/SRF-Zielgene CCN1 und CCN2 untersucht. Die Ergebnisse sind normalisiert zur GAPDH dargestellt.

### 3.6.4.2 CCN1 / CCN2 Expression in vivo

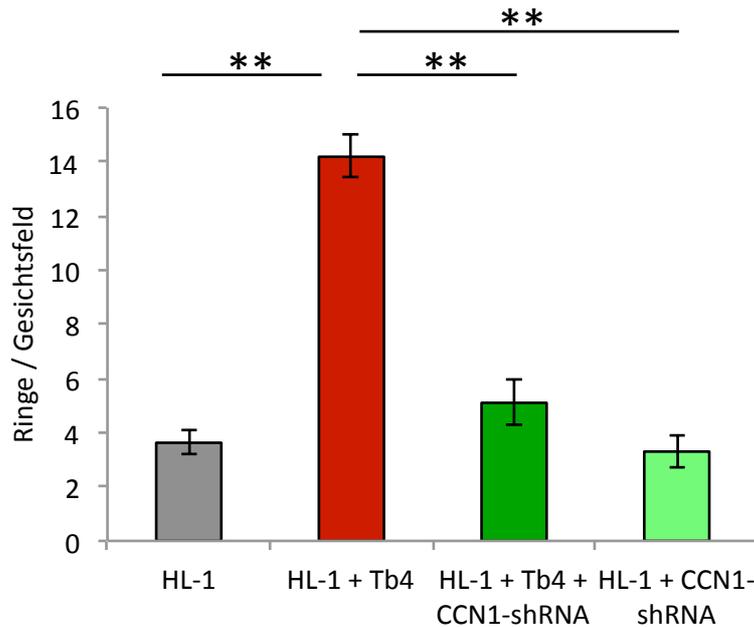
Zur näheren Untersuchung der Induktion eines MRTF-abhängigen Signalweges in vivo wurden quantitative Echtzeit-PCR-Analysen der SRF-Zielgene CCN1 und CCN2 durchgeführt. Hierfür wurde Muskelgewebe von AAV2.9-Tb4 transduzierte Mäusen 3 Tage nach Ischämieinduktion entnommen und mit Kontrollvirus transduzierten Tieren verglichen. Es zeigte sich, dass die intramuskuläre Applikation des AAV2.9-Tb4 zu einer Hochregulierung der SRF-Zielgene CCN1 (Tb4: 0,0034 vs. Kontrolle: 0,0012) und CCN2 (Tb4: 0,0023 vs. Kontrolle: 0,0009) führte. (s. Abb. 48)



**Abb. 48:** Quantitative Echtzeit-PCR-Analyse der MRTF-Zielgene CCN1 und CCN2 nach 3 Tagen Ligatur der *A. femoralis* im *M. Gastrocnemius* rechts; Dargestellt als Ratio Tb4 / GAPDH.

### 3.6.5 Die Hochregulierung von CCN1 ist relevant für die angiogene Tb4-Wirkung

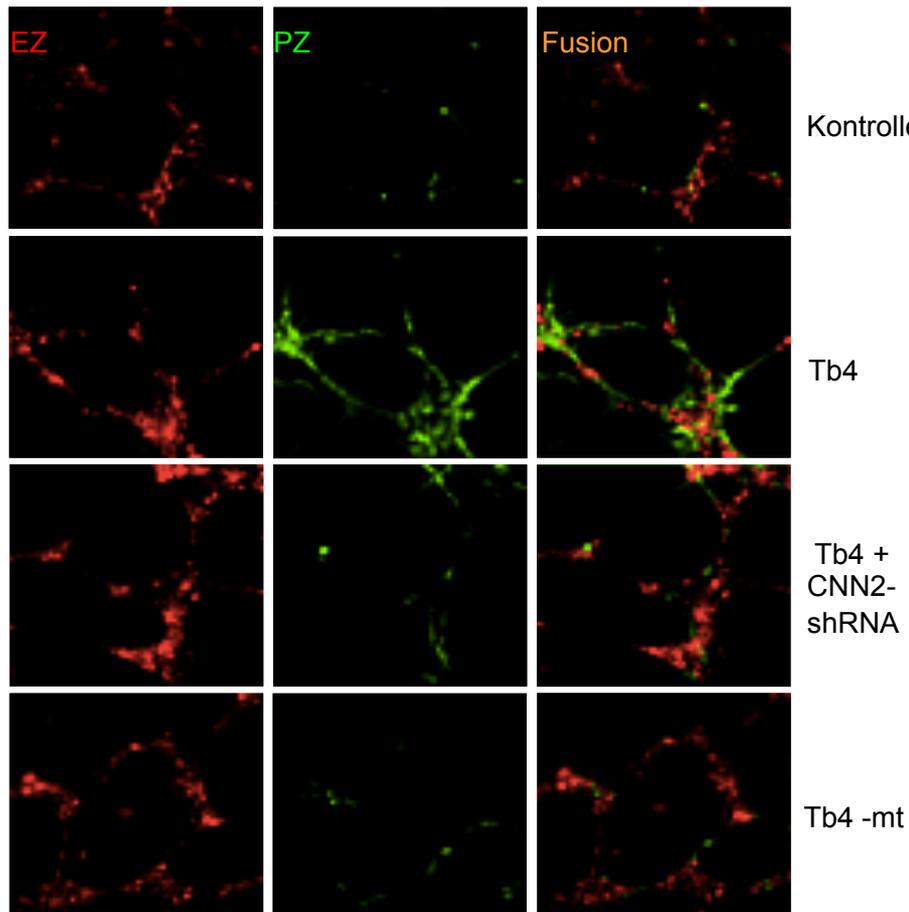
Der Tb4-vermittelte Effekt auf Endothelzellen konnte zudem durch das parallele Vorhandensein einer CCN1 spezifischen shRNA aufgehoben werden ( $5,1 \pm 0,8$  R/G). Die Überexpression einer CCN1-shRNA ohne Tb4-Transfektion zeigte hingegen keine signifikante Verschlechterung der Formation an endothelialen Ringstrukturen ( $3,3 \pm 0,6$  R/G). (s. Abb. 49)



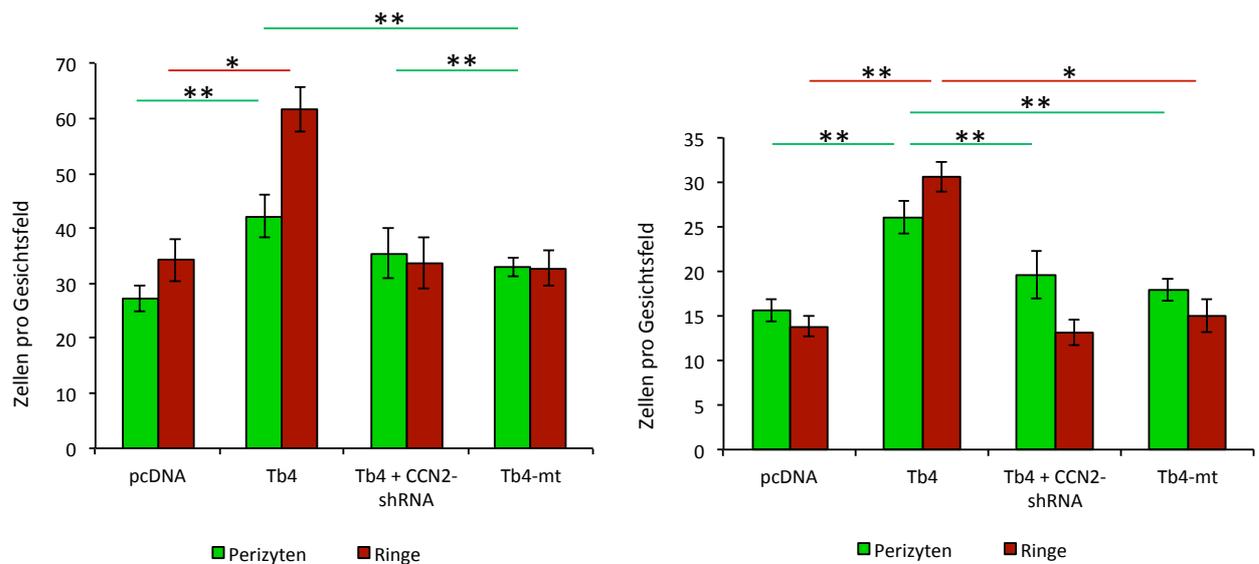
**Abb. 49:** Quantifizierung der endothelialen Ringstrukturen in Co-Kulturen mit HL-1-Zellen nach 18h Inkubation auf Matrigel. Die parallele Überexpression einer CCN1-shRNA inhibiert den Tb4-vermittelten proangiogenetischen Effekt.

### 3.6.6 Tb4 induziert die Rekrutierung von Perizyten in Abhängigkeit von CCN2

In Co-Kultur Versuchen von HMEC Zellen mit ATCC-CCL-26-Zellen führte die endotheliale Überexpression von Tb4 neben der Ausbildung von Ringformationen (Tb4: 2h=  $61,5 \pm 4,1$  R/G; 24h=  $30,6 \pm 1,7$  R/G vs. Kontrolle: 2h=  $34,2 \pm 3,8$  R/G; 24h=  $13,8 \pm 1,2$  R/G) auch zu einer vermehrten Rekrutierung von Perizyten an die Ringe (P/R) im Vergleich zu Kontrollen (Tb4: 2h=  $42,2 \pm 3,9$  P/R; 24h=  $26,0 \pm 1,8$  P/R; Kontrolle: 2h=  $27,2 \pm 2,3$  P/R; 24h=  $15,6 \pm 1,2$  P/R). Dieser Effekt zeigte sich sensitiv zum Vorhandensein einer CCN2-shRNA (Tb4 + CCN2-shRNA: 2h=  $35,4 \pm 4,5$  P/R; 24h=  $19,6 \pm 2,7$  P/R). Die Überexpression der Tb4-Mutante in Endothelzellen führte hingegen zu keiner Zunahme an Ringformationen (Tb4-mt: 2h=  $32,7 \pm 3,2$  R/G; 24h=  $15,0 \pm 1,8$  R/G) oder einer vermehrten Anlagerung von Perizyten (Tb4-mt: 2h=  $32,9 \pm 1,8$  P/R; 24h=  $17,9 \pm 1,2$  P/R) (s. Abb. 50a; 50b).



**Abb. 50a:** Beispielbilder der HMEC-Perizyten-Co-Kulturen. Rot = EZ (Endothelzellen), Grün = PZ (Perizyten). Die Überexpression von Tb4 führte zu einer vermehrten Rekrutierung von Perizyten an die Ringformationen, wodurch diese gefestigt wurden. Dieser Effekt wurde durch eine CCN2-shRNA inhibiert. Die Tb4-Mutante (mt) zeigte keinen Effekt auf die Rekrutierung von Perizyten. (Vergrößerung 10x)



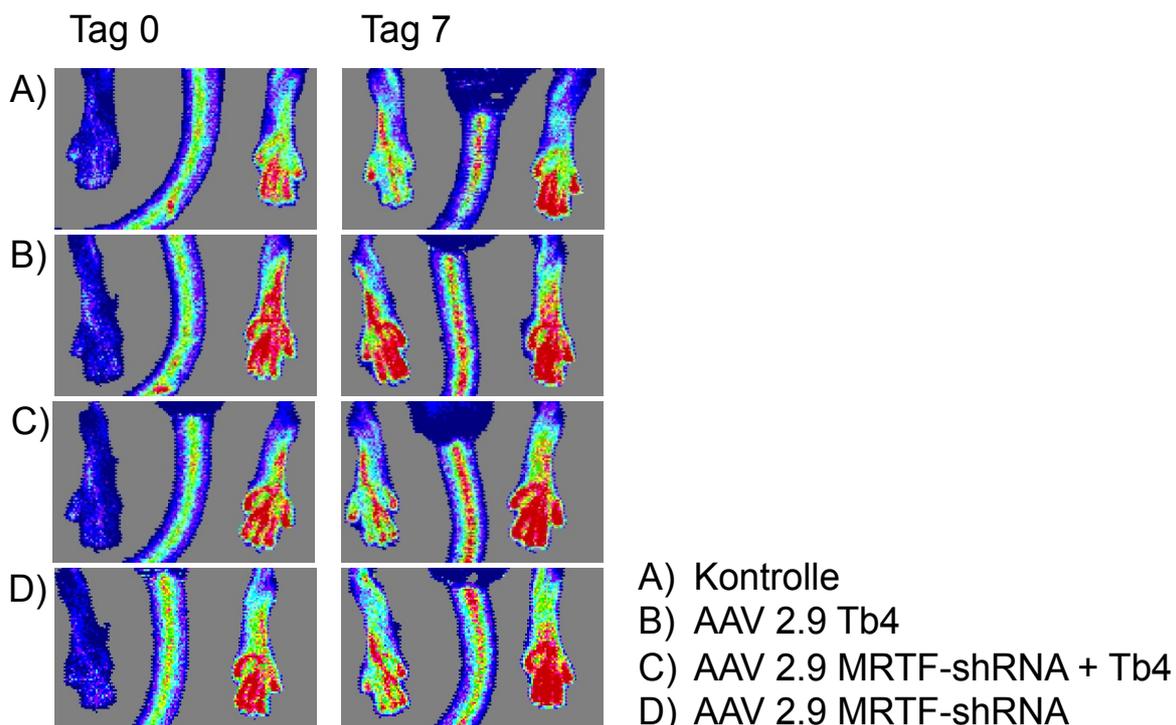
**Abb. 50b:** Quantifizierung der endothelialen Ringformationen sowie Anlagerung von Perizyten. Links nach 2h, rechts 24h nach Inkubation der Co-Kultur;

### 3.6.7 Funktionelle Effekte von Tb4 in vivo sind abhängig von der MRTF-Expression

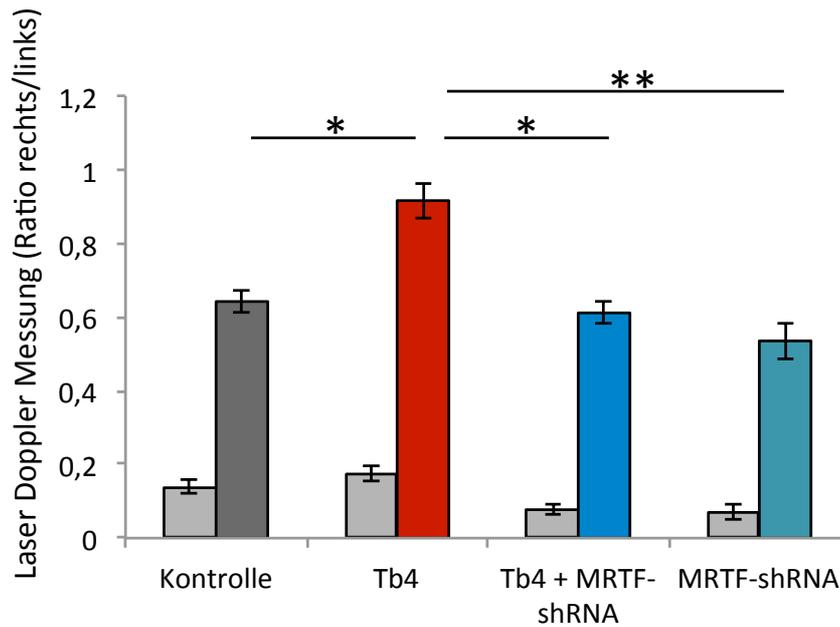
Für die Untersuchung der Interaktion von Tb4 und MRTF in vivo wurde eine MRTF-shRNA (short hairpin RNA) verwendet, welche freundlicherweise von Guido Posern (Universität Halle/Saale) zur Verfügung gestellt wurde. Diese besteht aus einer RNA-Sequenz, welche in der Lage ist einen stabilen *hairpin turn* zu bilden. Dieser wird intrazellulär durch das Enzym Dicer gespalten, wodurch die shRNA in eine siRNA umgewandelt wird, welche dann eine Expressionshemmung durch RNA-Interferenz induziert.

Die verwendete shRNA ist hierbei gegen das murine MRTF-A und MRTF-B gerichtet. Für die in vivo Versuche wurde die shRNA in einen AAV2.9 kloniert und 14 Tage vor Ligatur der A. femoralis injiziert. Um eine möglichst effiziente Suppression der MRTF-Expression zu erzielen wurde die Konzentration auf  $5 \times 10^{12}$  Viruspartikel erhöht.

Laser-Doppler-Perfusionsmessungen zeigten eine Hemmung der Tb4-induzierten Perfusionssteigerung 7 Tage postoperativ bei parallelem Vorhandensein einer MRTF-shRNA (Tb4 + MRTF-shRNA:  $0,6 \pm 0,03$  L/S). Die alleinige Gabe der MRTF-shRNA ergab keine signifikante Änderung der Perfusion (MRTF-shRNA:  $0,5 \pm 0,05$  L/S). (s. Abb. 51a; 51b)

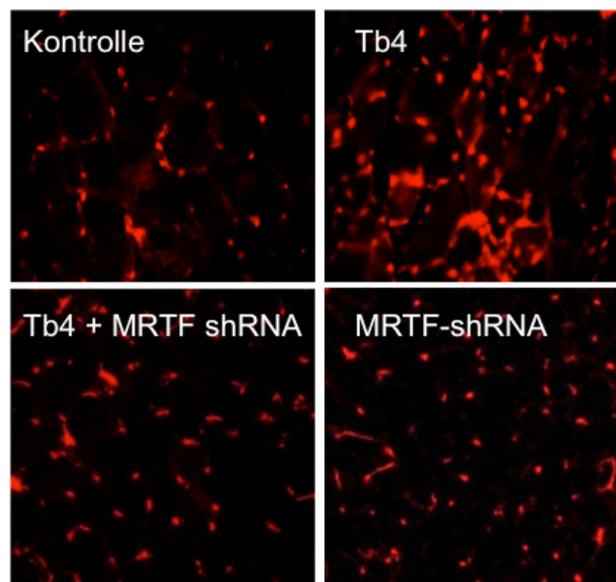


**Abb. 51a:** Beispielbilder der Laser-Doppler Perfusionmessungen an Tag 0 direkt nach Ligatur der A. femoralis rechts und 7 Tage nach Ischämieinduktion.

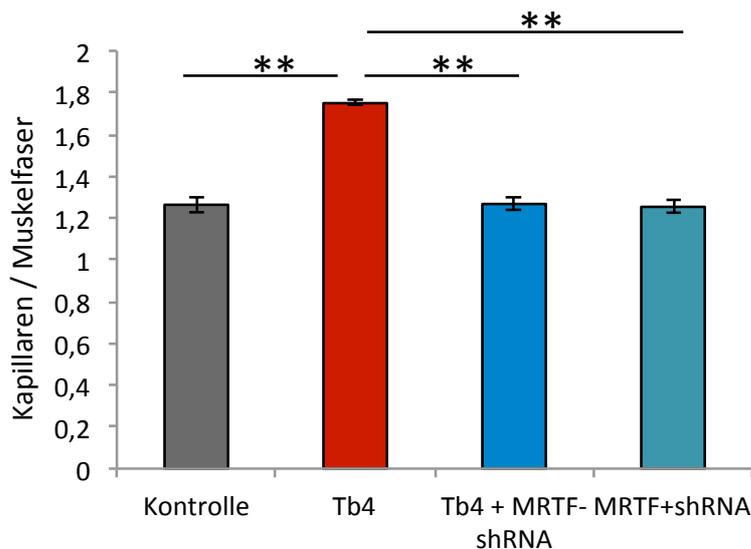


**Abb. 51b:** Laser-Doppler-Messungen an Tag 0 unmittelbar nach Ligatur der *A. femoralis* rechts, im Verhältnis zum linken sham-operierten Bein. Farblich kodiert sind die Werte von Tag 7, grau die Werte von Tag 0 postoperativ.

Des Weiteren wurde auch die Tb4-vermittelte Kapillarisation durch die MRTF-shRNA signifikant reduziert (Tb4 + MRTF-shRNA:  $1,27 \pm 0,03$  K/MF), wohingegen die alleinige Gabe der MRTF-shRNA keine statistisch relevante Erniedrigung der Kapillardichte ergab (MRTF-shRNA:  $1,25 \pm 0,03$  K/MF). (s. Abb. 52a; 52b)



**Abb. 52a:** Beispielbilder der Kapillaren in einer PECAM-1 Färbung nach 7-tägiger Ischämie des *M. Gastrocnemius* rechts. Vergrößerung 20x

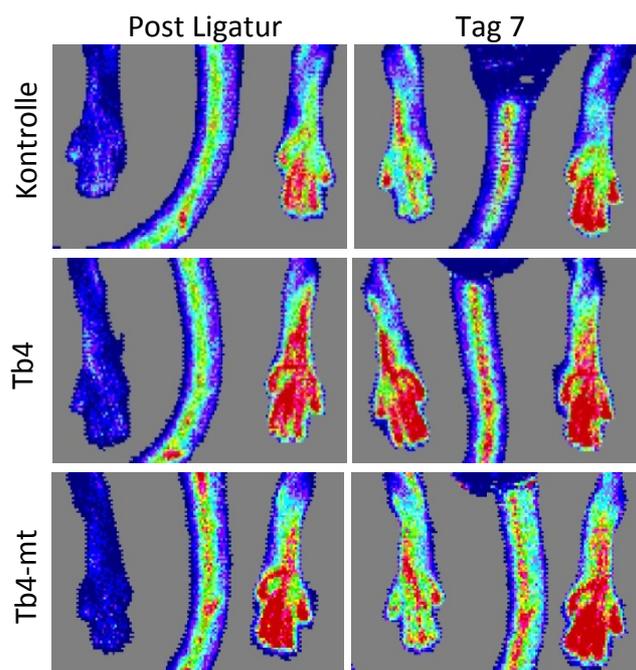


*Abb. 52b:* Kapillaren pro Muskelfasern des rechten M. Gastrocnemius 7 Tage nach Ligatur der A. femoralis.

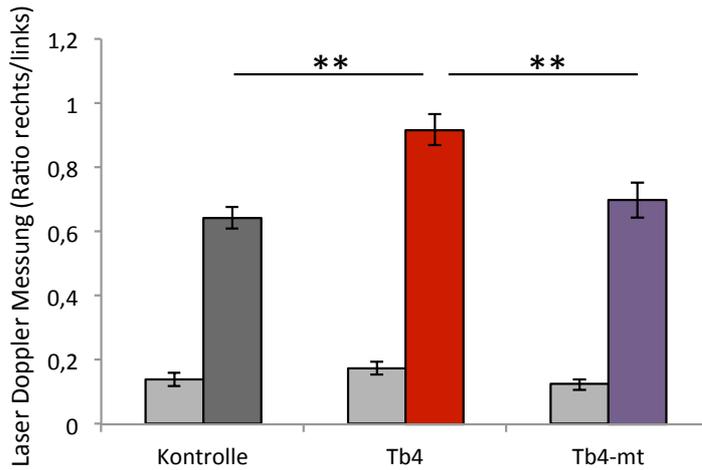
### 3.6.8 Tb4-vermittelte Neovaskularisierung: Relevanz der Aktinbindedomäne

Zur näheren Untersuchung der aktinabhängigen Thymosinwirkung wurde das mutierte Tb4-Konstrukt, welches eine veränderte Aktinbindedomäne aufweist, auch in vivo untersucht. Hierfür wurde das Tb4-mt-Konstrukt ebenfalls mittels AAV2.9 Transduktion im Hinterlauf der Maus überexprimiert.

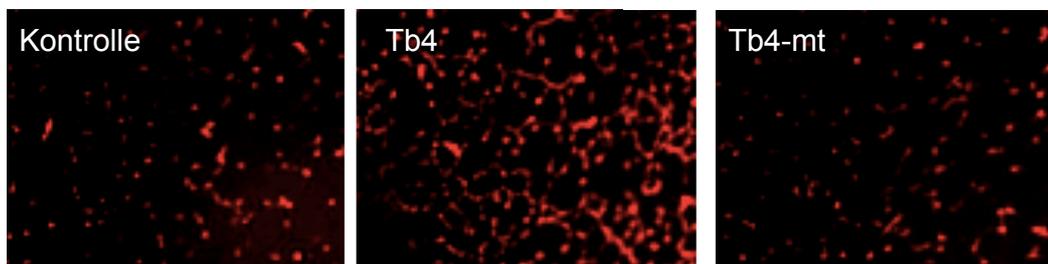
Die Laser-Doppler-Messungen zeigten nach Femoralisligatur, dass im Vergleich zu Tb4 die Tb4-Mutante (mt) nicht zu einer signifikanten Steigerung der Perfusion an Tag 7 führte ( $0,7 \pm 0,05$  L/S). Ebenso konnte keine Zunahme der Kapillarisation im M. Gastrocnemius an Tag 7 detektiert werden ( $1,2 \pm 0,03$  L/S). (s. Abb. 53a; 53b; 53c; 53d)



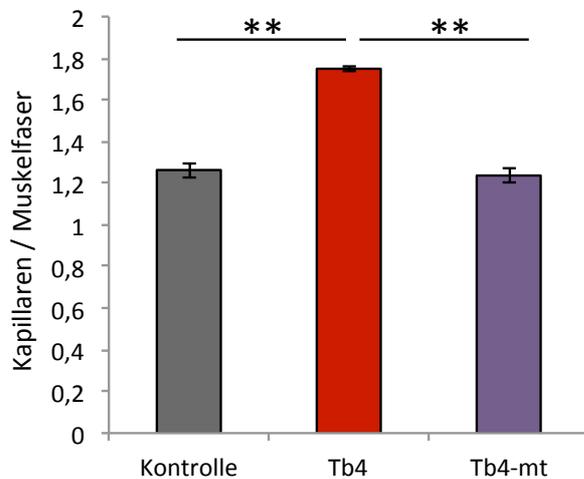
*Abb. 53a:* Laser-Doppler-Perfusionsbilder an Tag 0 direkt nach Ligatur der A. femoralis und 7 Tage postoperativ. Während Tb4 eine deutliche Zunahme der Perfusion im Vergleich zu Kontrolltieren induzierte führte die Behandlung mit einer Tb4-mt zu keiner relevanten Perfusionssteigerung.



**Abb. 53b:** Quantifizierung der Perfusion als Verhältnis des ischämischen Beins zum shamoperierten Bein direkt postoperativ (grau), sowie 7 Tage nach Ligatur der A. femoralis (farbig).



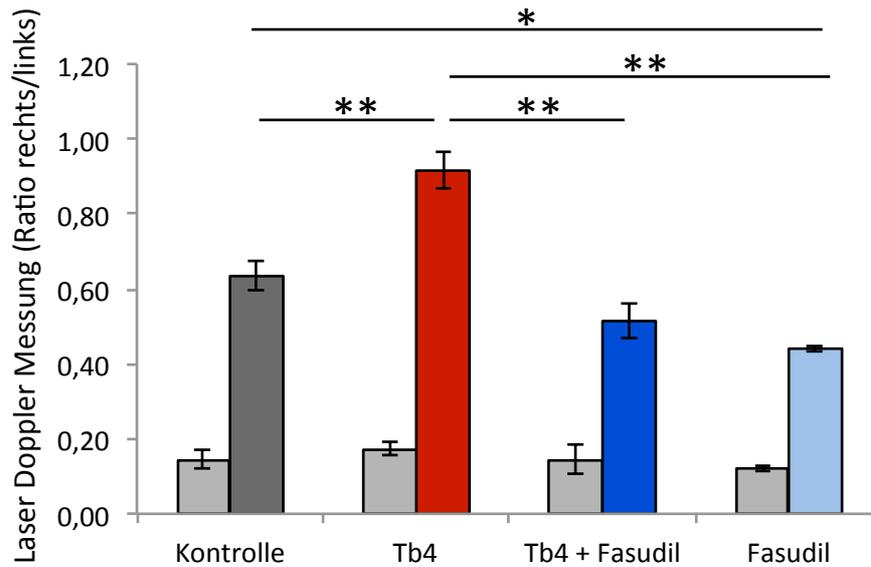
**Abb. 53c:** Repräsentative PECAM-1 Färbungen des M. Gastrocnemius 7 Tage nach Femoralisligatur. (Vergrößerung 20x)



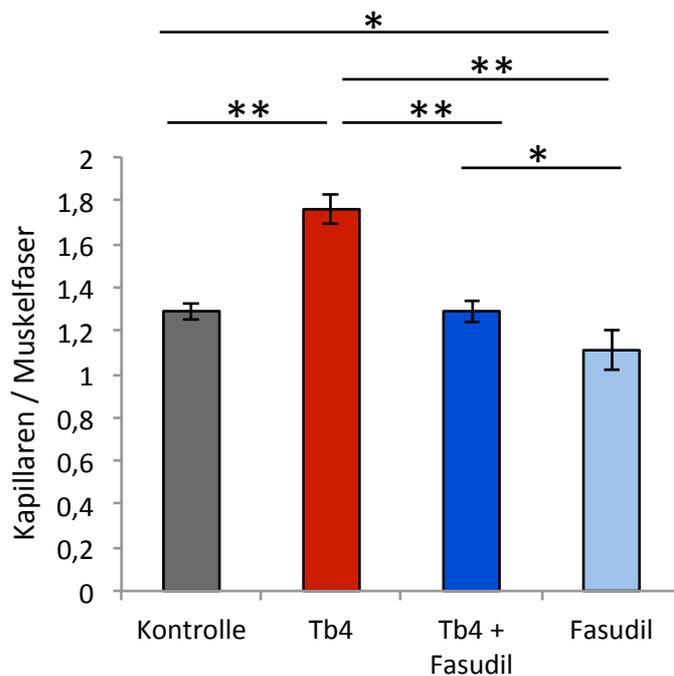
**Abb. 53d:** Quantifizierung der Kapillardichte als Verhältnis von Kapillaren / Muskelfaser an Tag 7.

### 3.6.9 Fasudil inhibiert die Tb4 induzierte Revaskularisierung in vivo

Der Rho-GTPase Inhibitor Fasudil senkte nach 7-tägiger intraperitonealer Injektion die Tb4 vermittelte Angiogenese und Arteriogenese im Modell der Femoralisligatur (Tb4:  $0,92 \pm 0,05$  L/S vs. Tb4 + Fasudil:  $0,51 \pm 0,05$  L/S). Zudem zeigte sich auch eine Reduzierung der physiologischen Revaskularisierung nach alleiniger Behandlung mit Fasudil unterhalb des Kontrollniveaus (Fasudil:  $0,44 \pm 0,01$  L/S vs. Kontrolle:  $0,63 \pm 0,04$  L/S). (s. Abb. 54a)



**Abb. 54a:** Die Gabe von Fasudil führte zu einer Inhibierung der Tb4-vermittelten Perfusionssteigerung in Laser-Doppler-Messungen an Tag 7. Des Weiteren hemmte Fasudil auch die physiologische Revaskularisierung im Vergleich zu Kontrolltieren.



**Abb. 54b:** Die Analyse der Kapillaren im *M. Gastrocnemius* nach 7-tägiger Fasudil-Injektion zeigte eine Abnahme der Kapillardichte im Vergleich zur Kontrolle. Zudem reduzierte Fasudil die protektive Wirkung von Tb4 auf Kontrollniveau.

In der Untersuchung der Kapillarisation hemmte die Gabe von Fasudil die Tb4 induzierte Erhöhung der Kapillardichte im *M. Gastrocnemius* (Tb4:  $1,76 \pm 0,07$  K/MF vs. Tb4 + Fasudil:  $1,29 \pm 0,03$  K/MF). Zudem führte die alleinige Therapie mit Fasudil zu einer Hemmung der physiologischen Angiogenese unterhalb des Kontrollniveaus (Fasudil:  $1,11 \pm 0,05$  K/MF vs. Kontrolle:  $1,29 \pm 0,04$  K/MF). (s. Abb. 54b)

## 4 Diskussion

In den letzten Jahren konnten eine Vielzahl an experimentellen Studien multiple biologische Funktionen von Tb4 in Prozessen der kardiovaskulären Entwicklung und Regeneration aufzeigen. Zudem zeigten zwei klinische Studien, dass bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung erhöhte Serumlevel von Tb4 mit dem Vorhandensein gut ausgebildeter Kollateralen korrelierten<sup>123,124</sup>. Ein therapeutischer Nutzen von Tb4 im Rahmen einer chronischen Ischämie im Tiermodell wurde bis dato jedoch nicht untersucht.

Erstmals konnten wir zeigen, dass Tb4 in einem chronisch-ischämischen Modell sowohl die Angiogenese als auch die Arteriogenese induziert. Beide Mechanismen stellen für die Therapie ischämisch-kardiovaskulärer Erkrankungen ein Spektrum jenseits chirurgischer oder interventioneller Verfahren dar und können somit vor allem austerapierten Patienten neue Optionen eröffnen.

Zudem konnten wir den bekannten Signalweg von Tb4 über die PI3/AKT-Kaskade näher differenzieren und die Isoform alpha der PI3-Kinase als dominierende Komponente dieser Signalvermittlung herausarbeiten.

Des Weiteren konnten wir einen neuen Mechanismus identifizieren, in welchem Tb4 über seine Aktinbindedomäne die Transkription MRTF/SRF-abhängiger Gene reguliert und somit erstmals einen Weg der Tb4-induzierten Genexpression aufzeigen.

### 4.1 Angiogenese-Potential von Tb4 in vitro und in vivo

In den 60er Jahren konnten Mitarbeiter des Abraham White Labors am Albert Einstein College of Medicine in New York eine Gruppe sogenannter Thymosine aus Kälberthymus isolieren<sup>125</sup>. Seither wurden den einzelnen Thymosinen vielfältige Eigenschaften und essentielle Funktionen zugeordnet, wobei sich ein Protein, Tb4, als besonders attraktiv für regenerative Prozesse herausstellte. Entwicklungsbioologisch zeigt Tb4 eine frühe Expression in Regionen des vaskulären Plexus<sup>126</sup> sowie im myokardialen Gewebe<sup>49</sup>.

Das proangiogene Potential von Tb4 wurde bereits mehrfach gezeigt, sowohl in vitro<sup>67, 69</sup> als auch in verschiedenen Modellen in vivo<sup>127, 128</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass in vitro die Überexpression von Tb4 die Migrationsfähigkeit endothelialer Zellen erhöht, ein Prozess, welcher für die Angiogenese von großer Relevanz ist. Die Expression einer Tb4-shRNA reduzierte hingegen das migratorische Potential von Endothelzellen, wodurch die Notwendigkeit von Tb4 für

migratorische Prozesse ersichtlich wird (s. Abb. 21). Zudem erhöhte sowohl die endotheliale als auch die myozytäre Überexpression von Tb4 die Ausbildung endothelialer Ringformationen in einem in vitro Assay der Angiogenese (s. Abb. 18; 19).

In vivo konnten wir diese Befunde in zwei Tiermodellen bestätigen. Sowohl in einem Mausmodell als auch in einem Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie konnten wir nach Langzeitexpression von Tb4 über einen rekombinanten AAV eine Revaskularisierung sowohl mikrozirkulatorisch als auch makrozirkulatorisch nachweisen, welche in einer gesteigerten Gewebespersion resultierte (s. Abb. 29; 30; 34-37).

Entscheidend für die Reifung, Stabilität und Lebensdauer neuer Kapillarnetze ist die Anlagerung von Perizyten<sup>129</sup>, da diese der Regression von Kapillaren entgegenwirken<sup>130</sup>. Rein angiogene Proteine, wie beispielsweise VEGF resultieren vorerst in einer massiven Stimulation von Kapillarnetzen, diese zeigen sich jedoch als langfristig nicht stabil durch eine fehlende Gefäßmaturierung<sup>131,132</sup>. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nur die Kombination von VEGF mit dem Wachstumsfaktor PDGF zu einer funktionellen Neovaskularisierung führte, welche neben einer reifen Mikrozirkulation auch die Perfusion förderte. Dem gegenüber zeigte eine alleinige Überexpression von VEGF zwar eine verstärkte Kapillarisation, neu gebildete Kapillaren waren jedoch kaum mit Perizyten besetzt und eine effiziente Ausbildung von Kollateralen sowie eine Erhöhung des Blutflusses blieben aus<sup>133</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir im Kaninchenmodell der Hinterlaufischämie zeigen, dass die Applikation von Tb4 mittels eines AAV-Vektors nicht nur zur Ausbildung neuer Kapillarnetze führte sondern zudem die Anlagerung von Perizyten an diesen Gefäßen förderte (s. Abb. 38). Diese sogenannten reifen Kapillaren oder Mikroarteriolen erscheinen ausreichend stabil um eine langfristige Mikrozirkulation zu ermöglichen. Die vermehrte Rekrutierung von Perizyten konnte auch in einem in vitro Co-Kultur Assay bestätigt werden, in welchem die endotheliale Überexpression von Tb4 zu einer verstärkten Anlagerung von Perizyten führte (s. Abb. 50). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer kürzlich erschienen Arbeit von Rossdeutsch et al., welche zeigte, dass Tb4 essentiell für die Anlagerung von glatten Muskelzellen während der Entwicklung eines stabilen Gefäßsystems ist<sup>134</sup>.

## **4.2 Von der Mikrozirkulation zur Makrozirkulation: Rolle der Gefäßreifung**

### **4.2.1 Warum wurden zwei verschiedene Tiermodelle untersucht?**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Modelle der Hinterlaufischämie untersucht. Diese differieren primär in der Ischämieinduktion, wobei im Mausmodell ein geringerer Schaden durch alleinige Ligatur der A. femoralis gesetzt wurde, als durch die vollständige Exzision der Femoralarterie im Kaninchenmodell. Zudem unterscheidet sich auch die physiologische Anpassungsreaktion. Während das Mausmodell ein dynamisches Modell darstellt, in welchem vor allem die Zeitspanne der Regeneration interpretiert wird, ist das Kaninchenmodell ein statisches Modell der chronischen Ischämie. 7 Tage nach Ischämieinduktion ist die physiologische Revaskularisierung im Kaninchen abgeschlossen und Gefäßveränderungen werden ohne therapeutische Intervention nicht weiter beobachtet.

Zuletzt ist auch die Tiergröße nicht unbedeutend, da diese im Kaninchenmodell die differenzierte Betrachtung von Angiogenese im Unterschenkel und Arteriogenese im Oberschenkel erlaubt.

### **4.2.2 Interaktion von Mikrozirkulation und Makrozirkulation**

Obwohl viele Autoren Angio- und Arteriogenese getrennt betrachten, erscheint es zunehmend sinnvoll, die Interaktion beider Prozesse näher zu untersuchen. Neben der Induktion stabiler Mikroarteriolen ist vor allem die Ausreifung großer, zuführender Gefäße der Makrozirkulation (Arteriogenese) essentiell für eine effektive therapeutische Neovaskularisierung, da nur diese in der Lage sind größere Blutmengen zu transportieren.

Arteriogenese benötigt als adäquaten Reiz eine Erhöhung der Schubspannung. Diese entsteht durch Verschluss oder Stenosierung eines proximalen Gefäßes, wodurch es zur Flusszunahme in den prä-existenten Kollateralen kommt. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass eine Erhöhung des distalen Abstromgebiets zu einer Zunahme des Flusses in den proximalen Kollateralen führt. Ein Modell, welches diese Theorie veranschaulicht, basiert auf der Kopplung des Gefäßsystems distal der Kollateralen an das venöse System mittels eines künstlich erzeugten Shunts. Der hohe Druckgradient zwischen den zuführenden Gefäßen und dem Abstromgebiet induziert eine massive Flusserhöhung mit folgender Schubspannungssteigerung, wodurch es zur Ausbildung multipler, kräftiger Kollateralen kommt<sup>135</sup>.

Die Überexpression von Tb4 führt zu einer gesteigerten Ausbildung des mikrozirkulatorischen Systems. Dies resultiert in einer vergrößerten Oberfläche des Endstromgefäßsystems, wodurch der arterielle Widerstand sinkt. Entscheidend für diesen Prozess ist jedoch auf mikrozirkulatorischer Ebene die Ausbildung von stabilen, langlebigen Kapillaren und Mikroarteriolen, vornehmlich durch die Stabilisierung über murale Zellen. Der vermehrte Abstrom führt retrograd zu einer erhöhten Schubspannung in den vorangeschalteten Makrogefäßen, welche den adäquaten Reiz für die Arteriogenese bietet.

Um diesen Rückkopplungsprozess von der Mikro- zur Makrozirkulation näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit einzelne Kaninchengruppen selektiv nur im Unterschenkel oder Oberschenkel mit Tb4 behandelt. Eine weitestgehend lokale Wirkung von Tb4 wurde mittels HPLC-Analysen bestätigt. Der Unterschenkel spiegelt hierbei das ischämische Endstromgebiet wieder<sup>136</sup>, einen Bereich, in welchem die Angiogenese überwiegt, wohingegen der Oberschenkel durch eine geringe Ischämie und viele präexistente Kollateralen eher den Bereich der Arteriogenese repräsentiert. Es zeigte sich, dass die Überexpression von Tb4 im Unterschenkel die Kollateralisierung im Oberschenkel induzierte als die direkte Injektion von Tb4 in den Oberschenkel (s. Abb. 40). Für diese ausgeprägte indirekte Wirkung von Tb4 auf die Kollateralisierung könnte die durch Vermehrung der mikrozirkulatorischen Gefäße erhöhte Schubspannung eine wichtige Rolle spielen.

Die über Schubspannung aktivierte Arteriogenese im Oberschenkel ist hierbei abhängig von der Aktivität der NO-Synthasen, iNOS und eNOS, wobei nur die Blockade beider Synthasen zu einer Inhibierung des Kollateralwachstums führt<sup>137</sup>. Die Hypothese, dass Tb4 über eine Erhöhung der Schubspannung zu einer vermehrten NO-Produktion führt, konnte durch Ergebnisse untermauert werden welche zeigten, dass die Gabe des unselektiven NO-Inhibitors L-NAME das Tb4-induzierte Kollateralwachstum inhibierte (F. Gesenhues, unpublizierte Daten). Interessanterweise zeigte sich das durch Tb4 stimulierte Kapillarwachstum durch die Gabe von L-NAME unbeeinträchtigt. Hieraus ließe sich schließen, dass die relevante Interaktion von der Mikro-zur Makrozirkulation über einen NO-abhängigen Mechanismus gesteuert wird.

### **4.3 Das Wechselspiel zwischen Muskel und Gefäßen**

Sowohl im Myokard als auch in der Peripherie bilden Muskulatur und Gefäßsystem eine funktionelle Einheit, wobei nicht nur die Myozyten auf eine Versorgung durch Blutgefäße

angewiesen sind, sondern auch das Gefäßsystem auf Änderungen des myozytären Stoffwechsels reagieren muss. So entwickeln Patienten mit trainierter Muskulatur seltener kardiovaskuläre Erkrankungen als untrainierte Personen<sup>138</sup>.

Für diese Plastizität gibt es mehrere molekulare Ursachen, wobei ein Teil der Adaptation durch die Bereitstellung proangiogener Faktoren wie VEGF<sup>139</sup> und eine bewegungsinduzierte NO-Produktion<sup>140</sup> erklärt werden kann.

Eine zusätzliche Hypothese beschreibt das Vorhandensein sogenannter Myokine und Adipokine. Hierbei werden Myokine von Myozyten und Adipokine von Adipozyten gebildet und sezerniert, welche unter normalen Bedingungen in einem physiologischen Gleichgewicht stehen. Unter den Bedingungen von Bewegungsarmut und Übergewicht führt dieses Modell zu einer Inbalance mit Überwiegen der Adipokine und daraus folgender Begünstigung kardiovaskulärer und metabolischer Erkrankungen<sup>141</sup>. Die Stimulation der Skelettmuskulatur durch Bewegung führt hingegen zur vermehrten Freisetzung von Myokinen, welche der schädlichen adipokinen Wirkung entgegenwirken<sup>142</sup>.

Tb4 könnte hierbei als eine Art Myokin zwischen Myozyten und vaskulären Zellen fungieren. Seine Rolle als Mediator zwischen Muskulatur und Gefäßsystem wurde bereits 2007 von der Gruppe um Paul Riley beschrieben, wobei das myokardiale Vorhandensein von Tb4 sich als essentiell für die koronare Gefäßentstehung erwies<sup>72</sup>. Dies impliziert ein Wechselspiel in welchem die Myozyten entweder durch direkte Sekretion von Tb4 oder durch eine Tb4-induzierte Änderung des myozytären Stoffwechsels mit sekundärer Sekretion von parakrinen Wachstumsfaktoren auf umgebende Gefäße wirken.

Um dies näher zu untersuchen etablierten wir ein in vitro Co-Kultur Assay bestehend aus Tb4-überexprimierenden HL-1-Zellen und Endothelzellen, wobei beide Zelltypen nur über das sie umgebende Medium in Kontakt standen. Hierbei zeigte sich eine indirekte Stimulation an Ringbildungen der endothelialen Zellen, welche durch Zugabe eines Tb4-Antikörpers zwar herab reguliert, jedoch nicht vollständig aufgehoben wurde (s. Abb. 20). Es scheint also, dass sezerniertes Tb4 einen Effekt auf Endothelzellen ausübt, welcher durch einen inhibitorischen Tb4-selektiven Antikörper blockiert werden kann. Zudem ist jedoch anzunehmen, dass es eine weitere, indirekte Komponente gibt, die sich beispielweise durch Änderung des myozytären Stoffwechsels oder des Expressionsmusters zeigt, wodurch es sekundär zur Stimulation der Endothelzellen kommt.

In den in vivo Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde ein pseudotypisierter AAV2.9 verwendet, für welchen ein myozytärer Tropismus bereits beschrieben wurde<sup>143</sup>. Zur genaueren Analyse der Transduktionseffizienz und Verteilung wurden Reportergenkonstrukte

verwendet sowie Cre-induzible Tomato-Mäuse untersucht. In den Tomato-Mäusen konnte durch Farbumschlag in erfolgreich virustransduzierten Zellen eine Analyse der Virusverteilung angefertigt werden. Die intramuskuläre Injektion des AAV führte hierbei zu einer homogenen Transduktion der Myozyten, wohingegen Endothelzellen nicht durch den AAV2.9 transduziert wurden (s. Abb. 24).

In beiden Tiermodellen der peripheren Ischämie führte die myozytäre Überexpression von Tb4 zu einer Stimulation der Kapillardichte und des Kollateralwachstums mit konsekutiver Zunahme der Perfusion (s. Abb. 29; 30; 34-37). Folgend scheint die AAV-vermittelte Transduktion der Muskulatur mit folgender Überexpression von Tb4 ausreichend zu sein, um eine Förderung der Neovaskularisierung zu induzieren. In Zusammenschau mit den *in vitro* Co-Kultur-Versuchen ist hierbei auch *in vivo* von einem Wechselspiel zwischen Muskulatur und vaskulären Zellen auszugehen, wobei Tb4 einerseits als eigenständiges Protein sezerniert wird, parallel jedoch auch eine Aktivierung der Myozyten möglich ist, welche sekundär über Wachstumsfaktoren die Stimulation vaskulärer Zellen fördert.

## **4.4 Tb4 und seine molekularen Grundlagen**

### **4.4.1 Die Lokalisation von Tb4**

Hauptziel aktueller Thymosinforschung ist es, neben den multiplen Funktionen von Tb4 dessen zugrundeliegende Mechanismen zu identifizieren und näher zu entschlüsseln. Bekannt ist, dass Tb4 als intrazelluläres Aktin-sequestrierendes Protein mit Ausnahme von Erythrozyten ubiquitär im Zytosol vorhanden ist. Neben der intrazellulären Lokalisation von Tb4 gibt es auch Hinweise auf extrazelluläre Wirkungen. So wurde Tb4 in verschiedenen Sekreten wie beispielsweise, Speichel<sup>144</sup>, Tränenflüssigkeit<sup>145</sup> und Wundsekret<sup>146</sup> nachgewiesen. Bis dato ist jedoch weder ein Mechanismus der Sekretion noch ein Rezeptor zur Aufnahme des Proteins identifiziert worden.

Huff et al. konnte neben dem zytosolischen Vorkommen auch eine nukleäre Lokalisation von Tb4 nachweisen, wobei die Translokation in den Nukleus über einen aktiven Transport abzulaufen scheint und einen bisher noch unbekanntem Bindungspartner benötigt. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Sequenzmotiv von Thymosin  $\beta$ 4 essentiell ist für die nukleäre Translokation, und dass diese Sequenz sich teilweise mit der Aktinbindedomäne überschneidet<sup>147</sup>.

#### 4.4.2 Tb4 und die Aktivierung des PI3-AKT Signalweges

Ein bereits beschriebener Wirkmechanismus von Tb4 ist die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges, welcher eine zentrale Rolle für Zellwachstum und Zellüberleben spielt.

So konnte gezeigt werden, dass Tb4 durch Komplexbildung mit PINCH und ILK zur Aktivierung der AKT führte<sup>49</sup>. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte Tb4 ebenfalls als ein Faktor identifiziert werden, welcher den PI3/AKT Signalweg aktiviert<sup>73</sup>. Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass die Behandlung endothelialer Progenitorzellen mit Tb4 zu einer dosisabhängigen Phosphorylierung der AKT führte<sup>148</sup>.

In einem murinen myokardialen Infarktmodell führte die Behandlung mit Tb4 zu einem Anstieg der Proteinmenge an phosphorylierter AKT. Parallel zeigte sich ein kleineres Narbenareal und eine geringere Apoptoserate. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Tb4 in der Kultur muriner, embryonaler Herzexplantate die Migration sowie die Schlagfrequenz der Myozyten erhöhte. Dieser Effekt konnte durch Zugabe des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin aufgehoben werden<sup>49</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer Wildtyp-Akt im Mausmodell der Hinterlaufischämie ähnliche Effekte auf die Neovaskularisierung wie die Überexpression von Tb4 aufwies, wohingegen die Behandlung mit einer AKT-DN zu einer Verschlechterung der Perfusion führte (s. Abb. 29; 30). Im Kaninchenmodell führte die Hemmung der AKT im Unterschenkel bei vorhandener Tb4-Überexpression in Ober- und Unterschenkel zu einer signifikanten Reduktion an Kapillaren wodurch auch eine Ausbildung an Kollateralen im Oberschenkel ausblieb (s. Abb. 34; 35). Dies untermauert erneut die Notwendigkeit der AKT für die angiogene Wirkung von Tb4, welche grundlegend für das arteriogene Potential von Tb4 erscheint.

Zur näheren Untersuchung der Tb4 Interaktion mit dem PI3-AKT-Signalweg wurde eine PI3-Kinase-gamma Knockout-Maus analysiert. Phänotypisch wurde für diese Knockout-Mäuse bereits eine Einschränkung im Rahmen der postischämischen Neovaskularisierung beschrieben<sup>32</sup>. Diese Befunde konnten wir bestätigen, wobei die Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Geschwister-Wildtypmäusen gleichermaßen eine Reduktion der Kapillarisierung als auch der Arteriogenese aufwiesen (s. Abb. 31; 32). Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass die AAV-vermittelte Überexpression von Tb4 von einem durch den ubiquitären Knockout der PI3-Kinase-gamma verminderten Ausgangsniveau aus signifikant sowohl die Angio- als auch die Arteriogenese steigerte (s. Abb. 32). Folglich scheint die PI3-Kinase-gamma nicht wesentlich für die Tb4 vermittelte Neovaskularisierung zu sein. In

diesem Zusammenhang zeigten kürzlich Graupera et al., dass gerade für den Prozess der Angiogenese die Isoform-alpha der PI3-Kinase essentiell ist<sup>26</sup>.

Um die Rolle dieser Isoform für die Tb4 Wirkung zu prüfen, setzten wir in vitro den pharmakologischen Inhibitor der PI3-Kinase alpha, PI-103 ein. Dadurch konnte in Tb4-überexprimierenden Endothelzellen jegliche Ausbildung von Ringformationen gehemmt werden. In vivo ergab die Therapie von Tb4-transduzierten Mäusen mit PI-103 eine Reduzierung der Tb4-vermittelten Arteriogenese und Angiogenese (s. Abb. 33). Dies erhärtet die Hypothese, dass die dominante Isoform im Rahmen der Tb4-vermittelten Angio- und Arteriogenese die PI-3-Kinase-alpha zu sein scheint.

Zudem sei erwähnt, dass nach alleiniger Behandlung mit PI-103 auch eine signifikante Rarefizierung an Kapillaren unterhalb des Kontrollniveaus auffiel (s. Abb. 33b), welche beispielsweise durch eine gestörte Gefäßerhaltung nach Hemmung der PI3-Kinase-alpha erklärt werden könnte.

### **4.4.3 Tb4 aktiviert aktinabhängig die MRTF/SRF-Kaskade**

Die vielfältigen Funktionen von Tb4 lassen sich unter anderem durch seine unterschiedlichen funktionellen Domänen erklären. Strukturell wurden vor allem 2 Motive als biologisch aktiv identifiziert, das N-terminale Tetrapeptid Ac-SDKP und das zentrale Aktinbindemotiv (17-LKKTET-22). Philp et al. konnten 2003 bereits zeigen, dass das proangiogene Potential mit der Funktion des Aktinbindemotivs verknüpft ist,<sup>149</sup> zudem wurde bereits 2010 die Notwendigkeit der Aktinbindedomäne im Rahmen der Tb4-induzierten Migration beschrieben<sup>150</sup>. Die direkte Transkriptionsaktivierung eines Signalweges über die Aktinbindedomäne wurde jedoch bis dato nicht untersucht.

Die Hypothese einer Tb4-induzierten Änderung der Genexpression in der vorliegenden Arbeit basiert auf einer aktinabhängigen Aktivierung der MRTF/SRF Signalkaskade, wodurch die SRF-Promoteraktivität verstärkt wird und dessen Zielgene vermehrt abgelesen werden.

Diese Kaskade ermöglicht es, zytoskelettale Änderungen in nukleäre, transkriptionelle Modifikationen umzuwandeln. Die MRTF/SRF Aktivität ist hierbei von der Konzentration an intrazellulär freiem, monomerem G-Aktin abhängig<sup>151,152</sup>. Tb4 ist durch seine Funktion als Aktin-sequestrierendes Protein wiederum direkt am intrazellulären Umsatz von monomerem G-Aktin beteiligt. Eine kurzfristige Überexpression von Tb4 induziert den Abbau von filamentösen Aktinstressbündeln,<sup>153,154</sup> wohingegen eine längerfristige Überexpression neben einem erhöhten G-Aktinlevel auch einen vermehrten Gehalt an F-Aktin induziert. Das Verhältnis von G- zu F-Aktin bleibt also langfristig gleich. Zudem konnte nach längerer Tb4-

Überexpression auch eine Erhöhung anderer zytoskelettaler Proteine nachgewiesen werden wie Myosin IIA, Alpha-actinin, und Tropomyosin<sup>155</sup>. Dies unterstützt die Hypothese, dass Tb4 den MRTF/SRF-Signalweg induziert, da die Aktivierung von SRF auch zu einer Neusynthese von Aktin führt. Die MRTF-Aktivität wird dadurch über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wieder inhibiert. Hierbei spielt sowohl nukleäres als auch zytosolisches, freies Aktin eine Rolle. Wie bereits beschrieben kommt auch Tb4 sowohl im Zytosol als auch im Nukleus vor und könnte somit auch als Aktinbindeprotein im Zellkern dienen<sup>147</sup>.

Zudem induziert SRF neben Aktin auch eine Reihe zytoskelettaler Proteine wie beispielsweise Myosin, Tropomyosin und Vinculin, so dass die oben beschriebene Erhöhung zytoskelettaler Proteine nach Tb4-Überexpression auch über die SRF-Promoteraktivierung induziert sein könnte.

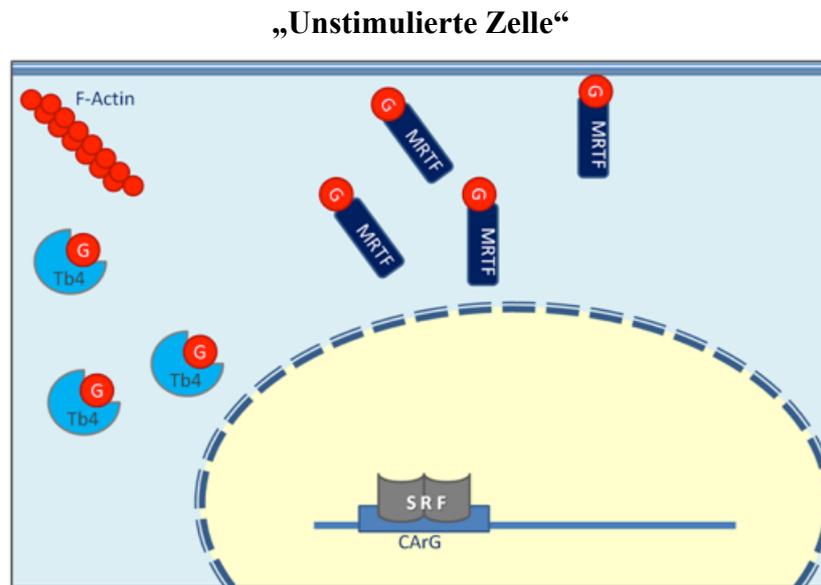
In vitro zeigte sich, dass nur Tb4, nicht aber dessen Mutante, welche eine inaktive Aktinbindedomäne aufweist, die Ausbildung von Ringformationen endothelialer Zellen fördert. Zudem war dieser Effekt abhängig von MRTF, da das Vorhandensein einer MRTF-shRNA das angiogene Potential von Tb4 blockierte (s. Abb. 44). Eine vermehrte Ausbildung von Ringstrukturen durch Migration wäre jedoch auch durch eine Verhältnisänderung von G-Aktin zu F-Aktin erklärbar, da durch eine Tb4-Überexpression vermehrt monomeres G-Aktin bereitgestellt wird. Die Inhibierung dieses Effektes durch eine MRTF-shRNA deutet jedoch eher darauf hin, dass es sich um ein transkriptionelles Ereignis handelt.

In vivo zeigte sich ebenfalls eine Notwendigkeit der Aktinbindedomäne für die Entwicklung einer signifikanten Neovaskularisierung, da die Tb4-Mutante keinen Effekt im murinen Modell der Hinterlaufischämie aufzeigte (s. Abb. 53). Zudem konnte auch in vivo die Wirkung von Tb4 durch Hemmung der MRTF-Expression mittels shRNA blockiert werden (s. Abb. 51; 52). Die hierbei vermutete Interaktion von Tb4 und MRTF scheint also zumindest teilweise indirekt über eine Veränderung der Aktinkonzentration abzulaufen.

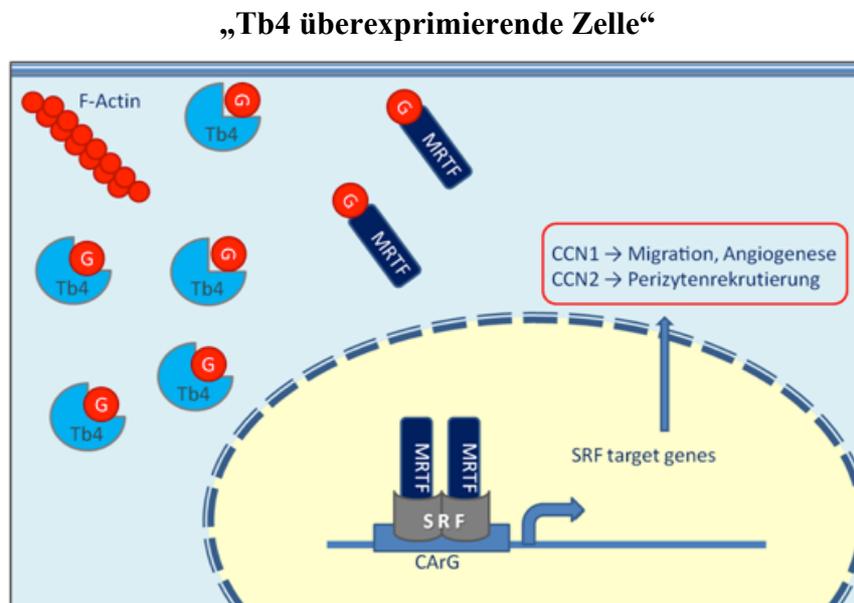
Unterstützt wird diese Hypothese durch unsere in vitro Versuche, in welchen Myozyten einen Anstieg des nukleären MRTF-Gehalts nach Tb4-Stimulation aufzeigten, ein Effekt welcher durch die Tb4-Mutante nicht hervorgerufen werden konnte (s. Abb. 45).

Des Weiteren wurde in unserer Studie eine Erhöhung der MRTF-abhängigen SRF-Promoteraktivität nach Tb4-Überexpression nachgewiesen, wobei auch hier das Vorhandensein einer funktionalen Aktinbindedomäne essentiell war (s. Abb. 46). Dies impliziert, dass Tb4 vermehrt monomeres G-Aktin binden kann, wodurch MRTF frei wird und als Co-Aktivator für SRF dienen kann (s. Abb. 55). Bei Abwesenheit des

Aktinbindemotivs kommt es nicht zu einer Tb4-abhängigen SRF-Aktivierung, wodurch die indirekte MRTF/SRF-Aktivierung von Tb4 über den Aktinegehalt verdeutlicht wird.



**Abb. 55a:** Ruhende Zelle: Im unstimulierten Zustand befindet sich MRTF vor allem im Zytosol und wird dort von monomerem G-Aktin gebunden. Tb4 bindet ebenfalls zytosolisches G-Aktin und verhindert folgend dessen Polymerisation zu F-Aktin.



**Abb. 55b:** Die Überexpression von Tb4 ermöglicht eine vermehrte Bindung von zytosolischem G-Aktin wodurch MRTF frei wird und in den Zellkern translozieren kann. Nukleär bindet MRTF an den SRF-Promoter und verstärkt dessen Aktivität, so dass es zu einer Zunahme der Expression SRF-abhängiger Zielgene wie CCN1 und CCN2 kommt.

Wie gelingt es also Tb4, über MRTF Einfluss auf die vaskuläre Struktur zu nehmen? RNA-Analysen der Mäusemuskulatur zeigten hierbei die Hochregulierung MRTF-aktivierter SRF-Zielgene, wobei besonders CCN1 und CCN2 hervorstachen. CCN1, auch bekannt als CYR-61 (Cystein-rich-61) ist ein matrizelluläres Protein mit proangiogenem Potential. Durch Interaktion mit dem Integrin  $\alpha\beta3$  verstärkt es die Adhäsion endothelialer Zellen. Darüber hinaus induziert CCN1 die Neovaskularisierung in der Kornea von Ratten<sup>156</sup> sowie die Revaskularisierung im ischämischen Kaninchenhinterlauf<sup>157</sup>. Die Blockade von CCN1 mittels shRNA in vitro hemmte die Tb4 vermittelte Ausbildung von endothelialen Ringformationen (s. Abb. 49). Hieraus geht hervor, dass ein Großteil der Tb4 induzierten Angiogenese durch CCN1 vermittelt werden könnte.

Ein weiteres matrizelluläres Protein ist CCN2, bekannt als „Connective tissue growth factor (CTGF)“. Neben seiner Rolle im Rahmen der Fibroseentstehung konnte kürzlich gezeigt werden, dass CCN2 essentiell für die Rekrutierung von Perizyten und die Entstehung einer regulären Basalmembran der Gefäße ist<sup>158</sup>. In vitro konnten wir nachweisen, dass die Anlagerung von Perizyten an präformierte endotheliale Ringstrukturen durch Tb4 verstärkt wird und dass dieser Effekt durch die parallele Überexpression einer CCN2-shRNA blockiert wird (s. Abb. 50). Folglich könnte die durch Tb4 induzierte Perizytenrekrutierung durch eine MRTF/SRF-abhängige Aktivierung von CCN2 erklärt werden.

Eine weitere Zielsequenz des MRTF/SRF-Signalweges ist die MikroRNA miRNA-486, welche im Intron 40 des Ankyrin-1 Gens liegt und nachgeschaltet zu einer Aktivierung des PI3-Kinase/AKT-Signalweges führt<sup>159</sup>. Ob diese Aktivierung mit der Tb4 vermittelten AKT-Phosphorylierung in Zusammenhang steht, ist bis dato nicht geklärt.

Eine weitere Komponente der aktin-abhängigen MRTF/SRF Aktivierung stellt die GTPase Rho-A dar. Rho-A induziert eine Aktinpolymerisation, wodurch MRTF vermehrt freigesetzt wird und folgend die SRF-Promoteraktivität gesteigert wird<sup>80</sup>. Die Gabe des Rho-Inhibitors Fasudil inhibierte in vitro und in vivo die Tb4-induzierte Neovaskularisierung (s. Abb. 19; 54). Hierbei könnte die Inhibierung der Aktinpolymerisation durch Fasudil die Wirkung von Tb4 auf die Freisetzung von MRTF gehemmt haben.

## 4.5 Gentherapie

### 4.5.1 AAVs in der Gentherapie

Gentherapeutische Ansätze in der kardiovaskulären Medizin sind seit Jahren ein dynamischer Bestandteil der Forschung, sowohl im Bereich der Grundlagenforschung, als auch in

klinischen Studien. Die Möglichkeit, eine therapeutische Neovaskularisierung durch Gentransfer zu induzieren, hat hierbei starkes Interesse erweckt, sowohl im Rahmen klinischer Studien der ischämischen Herzerkrankung, als auch in der Entwicklung neuer Therapiekonzepte der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit.

Die Sicherheit und Effizienz eines Vektorsystems hängen hierbei hauptsächlich von drei Faktoren ab, dem Vektor, dem Applikationsweg und der Wahl des Zielgens.

Neben nicht viralen Vektorsystemen stehen auch eine Vielzahl viraler Vektoren für den Gentransfer zur Verfügung, wobei AAVs vor allem in den letzten Jahren deutlich an Popularität gewonnen haben. Sie stellen aktuell die effizienteste Methode dar, um periphere Myozyten oder Kardiomyozyten zu transduzieren. Ihre fehlende Humanpathogenität gepaart mit der Möglichkeit einer Langzeitexpression ergibt ein vielversprechendes Vektorsystem. Umstritten ist jedoch die Immunreaktion nach AAV-Injektion. Einerseits zeigen AAVs eine geringfügige Inflamationsreaktion nach kardialer Injektion<sup>160</sup>, andererseits ist das weitverbreitete Vorhandensein neutralisierender Antikörper ein mögliches Problem ihrer Anwendung in klinischen Studien. Die Prävalenz der Antikörper ist hierbei stark abhängig vom jeweiligen Serotyp des AAV. Analysen zur Prävalenz präformierter Antikörper zeigten, dass diese vor allem gegen den AAV2 (72%) und AAV1 (67%) gerichtet sind aber auch gegen andere Serotypen zeigten sich hohe Antikörperwerte (AAV9 (47%), AAV6 (46%), AAV5(40%) und AAV8 (38%))<sup>161</sup>. Eine weitere Studie ergab zwar niedrigere Werte zur Prävalenz vorhandener Antikörper, zeigte aber ebenso, dass die meisten Antikörper gegen den Serotyp 2 gerichtet sind<sup>162</sup>. Des Weiteren wurde in verschiedenen Tiermodellen gezeigt, dass ab einem Antikörper-Titer von 1:2-1:4 eine erfolgreiche AAV-Transduktion inhibiert wird<sup>163</sup>. Dies führte dazu, dass in einer gentherapeutischen Studie zur Therapie der Herzinsuffizienz (CUPID-Trial) bis zu 50% der Patienten aufgrund präexistenter Antikörper ausgeschlossen werden mussten<sup>164</sup>.

Eine Möglichkeit dies zu vermeiden, ist die Anwendung einer Plasmapherese zur Senkung des Niveaus präexistenter Immunglobuline. Eine Alternative stellt die Verwendung eines anderen Serotyps dar. Eine neuartige Möglichkeit ist das sogenannte „Capsid reshuffling“, hierbei wird das Capsidgenom einzelner Serotypen fragmentiert und zufällig wieder zusammengefügt. Es entstehen dadurch neue Hybridcapside, welche in der Lage sind präexistente Antikörper zu umgehen. Zudem ermöglicht die Oberflächenmodifikation auch eine selektivere Gewebstransduktion<sup>165</sup>.

In der vorliegenden Studie wurde für die in vivo Versuche ein rekombinanter AAV2.9 verwendet, bei dessen Herstellung das etablierte Genom des AAV2 mit der Capsidstruktur des

AAV9 kombiniert wurde. Hierdurch bestand die Möglichkeit mit dem gut untersuchten Genom des AAV2 zu arbeiten, jedoch parallel den starken Tropismus für Kardiomyozyten und Myozyten des AAV9 zu nutzen.

Wir erreichten in unserem Mausmodell durch repetitive intramuskuläre Injektion des AAV2.9 eine effiziente und homogene Transduktion myozytärer Zellen. Aufgrund des Tropismus des AAV2.9 fanden wir jedoch auch nach intramuskulärer Injektion in den Hinterlauf der Maus, Lac-Z positive Zellen im Myokard. Eine Virusexpression in endothelialen Zellen konnten wir hingegen nicht nachweisen. Zudem ergaben unsere histologischen Analysen keine Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion, wodurch auch eine langfristige Expression des AAV über mindestens 35 Tage nachweisbar war.

Eine Limitation des AAV als gentherapeutisches Werkzeug ist das relativ geringe DNS-Packungsvermögen, welches nur in der Lage ist, Gene bis zu einer Größe von etwa 4.7 kb aufzunehmen. Zudem besteht zwischen der Applikation eines AAVs und seiner effektiven Expression ein zeitliches Intervall von etwa 7 Tagen<sup>143</sup>.

Des Weiteren ist bei gentherapeutischen Therapieansätzen vor allem bei Verwendung angiogener und arteriogener Substanzen stets die Möglichkeit einer Neuentwicklung oder Förderung maligner Prozesse zu beachten.

### **4.6 Klinischer Ausblick**

Tb4 wird aktuell in einer Vielzahl von klinischen Studien untersucht. So konnte bereits in zwei Phase-2 Studien gezeigt werden, dass Tb4 die Wundheilung bei Patienten mit Druck- und Staseulzera steigerte<sup>166</sup>. Zudem konnte eine Pilotstudie zeigen, dass die Behandlung mit Tb4-Augentropfen zu einer besseren Heilung chronischer Kornealdefekte führte<sup>167</sup>. Im Bereich der kardiovaskulären Forschung etablierte sich Tb4 als geeignetes Protein aufgrund seiner pleiotropen Fähigkeiten. Es stimuliert sowohl Angio- als auch Arteriogenese und ist gleichzeitig als anti-inflammatorisches Protein wirksam. Dies ist von besonderer Relevanz für die klinische Anwendung, da arteriogene Substanzen wie beispielsweise MCP-1 oder GM-CSF bei arteriosklerotischen Hochrisikopatienten zu einer Steigerung der Gefäßinflammation führen können. Des Weiteren eignet sich Tb4 als regeneratives Protein, da es embryonale Entwicklungsvorgänge reaktivieren kann und somit physiologische Heilungsprozesse induzieren könnte. Zudem sind die kardioprotektiven Eigenschaften von Tb4 mehrfach gezeigt worden.

Aufgrund dieser Daten scheint Tb4 ein vielversprechendes Protein zur Therapie der ischämischen Herzerkrankung beim Menschen zu sein. Die Firma RegeneRX Biopharmaceutical, Inc. arbeitet aktuell an einer potentiellen Behandlung mit Tb4 zur Therapie des akuten Myokardinfarktes beim Menschen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Phase-2 Studie in Planung<sup>168</sup>. Schwerwiegende Nebenwirkungen einer Behandlung mit Tb4 sind bis dato nicht bekannt.

Im Bezug auf eine klinische Anwendung ergeben sich jedoch eine Reihe Limitationen, welche noch näher untersucht werden müssen. So wurden in der vorliegenden Arbeit nur junge, gesunde Tiere verwendet. Es bleibt offen, welches Potential die Anwendung von Tb4 in kardiovaskulär vorgeschädigten Tieren beziehungsweise Patienten im Spätstadium einer vaskulären Systemerkrankung aufweist. Aktuell gibt es jedoch erste Hinweise auf eine effektive Therapie der chronischen, myokardialen Ischämie mit Tb4 im hypercholesterinämischen Großtiermodell (Schwein).

Zudem bleibt umstritten, welche Applikationsweise von Tb4 optimal wäre. Hierbei ist einerseits die Frage zu klären, ob es sinnvoll ist Tb4, direkt als Protein zu verabreichen oder über ein Vektorsystem wie beispielsweise einen AAV. Des Weiteren bleibt auch der richtige Applikationsweg zu klären. Eine systemische Injektion wäre sicherlich leichter durchführbar, birgt aber auch ein erhöhtes Risiko für systemische Nebenwirkungen. Demgegenüber stehen lokale Applikationsverfahren, welche jedoch meist einen invasiveren Eingriff erfordern.

Weiter bleibt auch der zeitliche Rahmen ungeklärt. So ist es bislang nicht bekannt wie lange eine Therapie mit Tb4 nötig ist, um eine effektive Neovaskularisierung zu induzieren, und ob die Stimulation mit Tb4 dauerhaft oder pulsatil erfolgen sollte. Die aktuelle Datenlage zur Pharmakokinetik von Tb4 zeigt jedoch, dass eine einmalige Gabe bei einer dosisabhängigen (42mg- 1260mg) Halbwertszeit von ca. 1-2 Stunden<sup>169</sup> nicht suffizient erscheint, so dass eine längerfristige oder pulsatile Expression sinnvoll wäre.

Diese offenen Fragen liefern Raum für weitere experimentelle und klinische Studien, welche die Integration von Tb4 als vielversprechendes Therapeutikum ischämischer kardiovaskulärer Erkrankungen fördern können.

## 5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen dar. Trotz intensiver medikamentöser, interventioneller und chirurgischer Therapiestrategien verbleibt ein Teil der Patienten ohne adäquate Behandlungsoption. Für dieses Patientenkollektiv ist es nötig neue Möglichkeiten der Neovaskularisierung zu entwickeln.

In der vorliegenden Studie wurde ein gentherapeutischer Ansatz über Adeno-assoziierte Viren untersucht gepaart mit der Überexpression von Thymosin  $\beta 4$  (Tb4). Ziel der durchgeführten Arbeit war es, den Effekt einer Tb4 Überexpression in chronischer, peripherer Ischämie zu untersuchen. Hierbei wurden neben dem funktionellen Effekt von Tb4 auch dessen molekulare Signalwege näher untersucht.

Tb4 ist ein ubiquitäres intra-und extrazellulär vorkommendes Protein, mit proangiogenem und kardioprotektivem Potential. Von besonderer Relevanz für die Funktion von Tb4 erscheint hierbei seine Möglichkeit, die zentrale Kinase AKT zu aktivieren. Zudem ist es als aktin-sequestrierendes Protein in morphologische und funktionelle Veränderungen des Zytoskeletts involviert.

In vitro konnten wir zeigen, dass Tb4 sowohl die Migration als auch die Ringformation von Endothelzellen förderte. Zudem erhöhte es die Rekrutierung von Perizyten. In vivo konnten wir in zwei Tiermodellen der chronischen Ischämie im Hinterlauf von Mäusen und Kaninchen jeweils eine angiogene und arteriogene Wirkung von Tb4 aufzeigen, welche in einer Zunahme der Perfusion resultierte. Auf der molekularen Ebene scheint Tb4 die AKT über den Signalweg der PI3-Kinase-alpha zu aktivieren. Zudem konnten wir erstmals einen neuen molekularen Mechanismus identifizieren, in welchem Tb4 über seine Aktinbindedomäne zu einer MRTF-abhängigen SRF-Aktivierung führt und folgend die Zielgene CCN1 und CCN2 hochreguliert. Diese aktinabhängige Signalkaskade scheint vor allem im Bereich der Tb4-induzierten Neovaskularisierung von besonderer Relevanz zu sein.

Zusammenfassend zeigen die Experimente der vorliegenden Arbeit das therapeutische Potential von Thymosin  $\beta 4$  zur Induktion von Angiogenese und Arteriogenese und die daran beteiligten molekularen Signalwege. Aufgrund dieser Befunde erscheint eine Translation der Thymosin  $\beta 4$ -Gentherapie in Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit vorstellbar.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

AcSDKP	N-Terminales Tetrapeptid von Tb4
Akt	Proteinkinase B
Akt-DN	Proteinkinase B dominant negative Mutante
Akt-wt	Proteinkinase B Wildtyp-Variante
Ang-1/2	Angiopoietin-1/2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	Cytomegaloviruspromotor
CTGF (CCN2)	Connective tissue growth factor
CYR61 (CCN1)	Cysteine-rich angiogenic inducer 61
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
eEPCs	embryonale endotheliale Progenitorzellen
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthase
FCS	Fetal calf serum
FLk1	Fetal liver Kinase 1
FOXO	Forkhead-Box-Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor-1
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule-1
ILK	Integrin linked Kinase
iNOS	induzible Stickstoffsynthase
MAP-Kinase	mitogen-activated protein-Kinase
MCP-1	Monozyten Chemotaktisches Protein 1
mRNA	messenger RNA
MRTF	Myocardin related transcription factor
mTORC2	mammalian target of rapamycin-2
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PDGF	Platelet derived growth factor
PDK1	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
PECAM	Platelet Endothelzell Adhäsionsmolekül
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RNA	Ribonukleinsäure
shRNA	Small hairpin RNA
SM22alpha	Smooth muscle protein 22-alpha
SRF	Serum response factor
TCF	Ternary Complex Family
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsion Protein 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R	Vascular endothelial growth factor-Receptor
αMHC	alpha-myosin heavy chain

## 7 Literaturverzeichnis

1. Caro, J., Migliaccio-Walle, K., Ishak, K.J. & Proskorovsky, I. The morbidity and mortality following a diagnosis of peripheral arterial disease: long-term follow-up of a large database. *BMC Cardiovasc Disord* 5, 14 (2005).
2. Criqui, M.H., *et al.* Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 326, 381-386 (1992).
3. Regensteiner, J.G., *et al.* The impact of peripheral arterial disease on health-related quality of life in the Peripheral Arterial Disease Awareness, Risk, and Treatment: New Resources for Survival (PARTNERS) Program. *Vasc Med* 13, 15-24 (2008).
4. McDermott, M.M., *et al.* Depressive symptoms and lower extremity functioning in men and women with peripheral arterial disease. *J Gen Intern Med* 18, 461-467 (2003).
5. Drake, C.J. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69, 73-82 (2003).
6. Grunewald, M., *et al.* VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell* 124, 175-189 (2006).
7. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674 (1997).
8. Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H. & Kim, K.W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36, 1-12 (2004).
9. Muhlhauser, J., *et al.* VEGF165 expressed by a replication-deficient recombinant adenovirus vector induces angiogenesis in vivo. *Circ Res* 77, 1077-1086 (1995).
10. Murakami, M. Signaling required for blood vessel maintenance: molecular basis and pathological manifestations. *Int J Vasc Med* 2012, 293641 (2012).
11. Williams, J.K. Endothelial FGF receptor signaling: angiogenic versus atherogenic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H27-28 (2011).
12. Murakami, M., *et al.* The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest* 118, 3355-3366 (2008).
13. Maisonpierre, P.C., *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60 (1997).
14. Fiedler, U. & Augustin, H.G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology* 27, 552-558 (2006).
15. Asahara, T., *et al.* Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 83, 233-240 (1998).
16. Herzog, S., Sager, H., Khmelevski, E., Deylig, A. & Ito, W.D. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283, H2012-2020 (2002).
17. Deindl, E., *et al.* Role of ischemia and of hypoxia-inducible genes in arteriogenesis after femoral artery occlusion in the rabbit. *Circ Res* 89, 779-786 (2001).
18. Heil, M. & Schaper, W. Insights into pathways of arteriogenesis. *Curr Pharm Biotechnol* 8, 35-42 (2007).
19. Hofer, I.E., *et al.* Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circ Res* 94, 1179-1185 (2004).
20. Chappell, D.C., Varner, S.E., Nerem, R.M., Medford, R.M. & Alexander, R.W. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res* 82, 532-539 (1998).

21. Kosaki, K., Ando, J., Korenaga, R., Kurokawa, T. & Kamiya, A. Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res* 82, 794-802 (1998).
22. Schaper, J., Konig, R., Franz, D. & Schaper, W. The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes. A combined SEM and TEM study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 370, 193-205 (1976).
23. Schirmer, S.H., van Nooijen, F.C., Piek, J.J. & van Royen, N. Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 95, 191-197 (2009).
24. Kok, K., Geering, B. & Vanhaesebroeck, B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 34, 115-127 (2009).
25. Vanhaesebroeck, B., *et al.* Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70, 535-602 (2001).
26. Graupera, M., *et al.* Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* 453, 662-666 (2008).
27. Yuan, T.L., *et al.* Class 1A PI3K regulates vessel integrity during development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9739-9744 (2008).
28. Shioi, T., *et al.* The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J* 19, 2537-2548 (2000).
29. Patrucco, E., *et al.* PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* 118, 375-387 (2004).
30. Go, Y.M., *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am J Physiol* 275, H1898-1904 (1998).
31. Puri, K.D., *et al.* The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood* 106, 150-157 (2005).
32. Madeddu, P., *et al.* Phosphoinositide 3-kinase gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 68-76 (2008).
33. Shiojima, I. & Walsh, K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90, 1243-1250 (2002).
34. Shiojima, I. & Walsh, K. Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway. *Genes Dev* 20, 3347-3365 (2006).
35. Woodgett, J.R. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 150-157 (2005).
36. Alessi, D.R., *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* 7, 261-269 (1997).
37. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. & Sabatini, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101 (2005).
38. Andjelkovic, M., *et al.* Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5699-5704 (1996).
39. Gao, T., Furnari, F. & Newton, A.C. PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18, 13-24 (2005).
40. Kim, I., *et al.* Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* 86, 24-29 (2000).

41. Gerber, H.P., *et al.* Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273, 30336-30343 (1998).
42. Fujio, Y. & Walsh, K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* 274, 16349-16354 (1999).
43. Fujio, Y., *et al.* Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol* 19, 5073-5082 (1999).
44. Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R.N. & Walsh, K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101, 660-667 (2000).
45. Dimmeler, S., *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605 (1999).
46. Morbidelli, L., Donnini, S. & Ziche, M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 9, 521-530 (2003).
47. Gordan, J.D. & Simon, M.C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev* 17, 71-77 (2007).
48. Manning, B.D. & Cantley, L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274 (2007).
49. Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M.D., Dimaio, J.M. & Srivastava, D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432, 466-472 (2004).
50. Goldstein, A.L., Slater, F.D. & White, A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1010-1017 (1966).
51. Hooper, J.A., *et al.* Purification and properties of bovine thymosin. *Ann N Y Acad Sci* 249, 125-144 (1975).
52. Goldstein, A.L., *et al.* Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 725-729 (1977).
53. Hannappel, E. & van Kampen, M. Determination of thymosin beta 4 in human blood cells and serum. *J Chromatogr* 397, 279-285 (1987).
54. Hannappel, E. & Leibold, W. Biosynthesis rates and content of thymosin beta 4 in cell lines. *Arch Biochem Biophys* 240, 236-241 (1985).
55. Hannappel, E., Xu, G.J., Morgan, J., Hempstead, J. & Horecker, B.L. Thymosin beta 4: a ubiquitous peptide in rat and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2172-2175 (1982).
56. Cassimeris, L., Safer, D., Nachmias, V.T. & Zigmond, S.H. Thymosin beta 4 sequesters the majority of G-actin in resting human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 119, 1261-1270 (1992).
57. Safer, D. The interaction of actin with thymosin beta 4. *J Muscle Res Cell Motil* 13, 269-271 (1992).
58. Vancompernelle, K., Goethals, M., Huet, C., Louvard, D. & Vandekerckhove, J. G- to F-actin modulation by a single amino acid substitution in the actin binding site of actobindin and thymosin beta 4. *EMBO J* 11, 4739-4746 (1992).
59. Mannherz, H.G. & Hannappel, E. The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 839-851 (2009).
60. dos Remedios, C.G., *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83, 433-473 (2003).

61. Pollard, T.D. & Cooper, J.A. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212 (2009).
62. Stossel, T.P., Fenteany, G. & Hartwig, J.H. Cell surface actin remodeling. *J Cell Sci* 119, 3261-3264 (2006).
63. Sosne, G., *et al.* Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo. *Exp Eye Res* 72, 605-608 (2001).
64. Sosne, G., Qiu, P., Christopherson, P.L. & Wheeler, M.K. Thymosin beta 4 suppression of corneal NFkappaB: a potential anti-inflammatory pathway. *Exp Eye Res* 84, 663-669 (2007).
65. Sosne, G., *et al.* Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury. *Exp Eye Res* 74, 293-299 (2002).
66. Badamchian, M., *et al.* Thymosin beta(4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. *Int Immunopharmacol* 3, 1225-1233 (2003).
67. Grant, D.S., *et al.* Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J Cell Sci* 108 ( Pt 12), 3685-3694 (1995).
68. Malinda, K.M., Goldstein, A.L. & Kleinman, H.K. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* 11, 474-481 (1997).
69. Grant, D.S., *et al.* Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3, 125-135 (1999).
70. Malinda, K.M., *et al.* Thymosin beta4 accelerates wound healing. *J Invest Dermatol* 113, 364-368 (1999).
71. Gomez-Marquez, J., Franco del Amo, F., Carpintero, P. & Anadon, R. High levels of mouse thymosin beta4 mRNA in differentiating P19 embryonic cells and during development of cardiovascular tissues. *Biochim Biophys Acta* 1306, 187-193 (1996).
72. Smart, N., *et al.* Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445, 177-182 (2007).
73. Kupatt, C., *et al.* Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB J* 19, 1576-1578 (2005).
74. Hinkel, R., *et al.* Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation* 117, 2232-2240 (2008).
75. Hinkel, R., Bock-Marquette, I., Hatzopoulos, A.K. & Kupatt, C. Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 1194, 105-111 (2010).
76. Olson, E.N. & Nordheim, A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 353-365 (2010).
77. Wang, D., *et al.* Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851-862 (2001).
78. Wang, D.Z., *et al.* Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14855-14860 (2002).
79. Hirano, H. & Matsuura, Y. Sensing actin dynamics: structural basis for G-actin-sensitive nuclear import of MAL. *Biochem Biophys Res Commun* 414, 373-378 (2011).
80. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I. & Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342 (2003).

81. Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B. & Treisman, R. Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749-1752 (2007).
82. Shaw, P.E., Schroter, H. & Nordheim, A. The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter. *Cell* 56, 563-572 (1989).
83. Hinkel, R., Trenkwalder, T. & Kupatt, C. Gene therapy for ischemic heart disease. *Expert Opin Biol Ther* 11, 723-737 (2011).
84. Choi, V.W., McCarty, D.M. & Samulski, R.J. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 5, 299-310 (2005).
85. Gao, G.P., *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11854-11859 (2002).
86. Gao, G., *et al.* Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6081-6086 (2003).
87. Gao, G., Vandenberghe, L.H. & Wilson, J.M. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther* 5, 285-297 (2005).
88. Atchison, R.W., Casto, B.C. & Hammon, W.M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754-756 (1965).
89. Thomson, B.J., Weindler, F.W., Gray, D., Schwaab, V. & Heilbronn, R. Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* 204, 304-311 (1994).
90. Walz, C., *et al.* Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* 78 ( Pt 6), 1441-1452 (1997).
91. Kotin, R.M., *et al.* Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 2211-2215 (1990).
92. Samulski, R.J., *et al.* Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10, 3941-3950 (1991).
93. Kotin, R.M., Linden, R.M. & Berns, K.I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J* 11, 5071-5078 (1992).
94. Kessler, P.D., *et al.* Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14082-14087 (1996).
95. Snyder, R.O. Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med* 1, 166-175 (1999).
96. Zaiss, A.K. & Muruve, D.A. Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* 5, 323-331 (2005).
97. Zaiss, A.K., Son, S. & Chang, L.J. RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol* 76, 7209-7219 (2002).
98. Gruchala, M., Roy, H., Bhardwaj, S. & Yla-Herttuala, S. Gene therapy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 10, 407-423 (2004).
99. Rabinowitz, J.E. & Samulski, R.J. Building a better vector: the manipulation of AAV virions. *Virology* 278, 301-308 (2000).
100. Stilwell, J.L. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus vectors for therapeutic gene transfer. *Biotechniques* 34, 148-150, 152, 154 passim (2003).
101. Bell, C.L., *et al.* The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *J Clin Invest* 121, 2427-2435 (2011).

102. Shen, S., Bryant, K.D., Brown, S.M., Randell, S.H. & Asokan, A. Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J Biol Chem* 286, 13532-13540 (2011).
103. Summerford, C., Bartlett, J.S. & Samulski, R.J. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 5, 78-82 (1999).
104. Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M. & Samulski, R.J. Adeno-associated virus type 2 contains an integrin alpha5beta1 binding domain essential for viral cell entry. *J Virol* 80, 8961-8969 (2006).
105. Qing, K., *et al.* Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5, 71-77 (1999).
106. Douar, A.M., Poulard, K., Stockholm, D. & Danos, O. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75, 1824-1833 (2001).
107. Bartlett, J.S., Wilcher, R. & Samulski, R.J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 74, 2777-2785 (2000).
108. Srivastava, A., Lusby, E.W. & Berns, K.I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J Virol* 45, 555-564 (1983).
109. Deyle, D.R. & Russell, D.W. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther* 11, 442-447 (2009).
110. Nakai, H., *et al.* Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 75, 6969-6976 (2001).
111. Schnepf, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A. & Johnson, P.R. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77, 3495-3504 (2003).
112. Nakai, H., *et al.* AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice. *Nat Genet* 34, 297-302 (2003).
113. Russell, D.W. AAV loves an active genome. *Nat Genet* 34, 241-242 (2003).
114. Claycomb, W.C., *et al.* HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2979-2984 (1998).
115. Darland, D.C. & D'Amore, P.A. TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 11-20 (2001).
116. Grieger, J.C., Choi, V.W. & Samulski, R.J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* 1, 1412-1428 (2006).
117. Limbourg, A., *et al.* Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nat Protoc* 4, 1737-1746 (2009).
118. Leberherz, C., *et al.* Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium* 10, 257-265 (2003).
119. Archie, J.P., Jr., *et al.* Measurement of cardiac output with and organ trapping of radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 35, 148-154 (1973).
120. Raab, S., Thein, E., Harris, A.G. & Messmer, K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am J Physiol* 276, H1801-1806 (1999).
121. Huff, T., Muller, C.S., Otto, A.M., Netzker, R. & Hannappel, E. beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 205-220 (2001).
122. Ziada, A.M., Hudlicka, O., Tyler, K.R. & Wright, A.J. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 18, 724-732 (1984).

123. Bicer, A., *et al.* Thymosin beta 4 is associated with collateral development in coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* (2011).
124. Lv, S., Cheng, G., Xu, Y., Wang, Y. & Xu, G. Relationship between serum thymosin beta4 levels and coronary collateral development. *Coron Artery Dis* 22, 401-404 (2011).
125. Goldstein, A.L. History of the discovery of the thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 1112, 1-13 (2007).
126. Dathe, V. & Brand-Saberi, B. Expression of thymosin beta4 during chick development. *Anat Embryol (Berl)* 208, 27-32 (2004).
127. Koutrafouris, V., *et al.* Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Biochim Biophys Acta* 1568, 60-66 (2001).
128. Smart, N., Rossdeutsch, A. & Riley, P.R. Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis* 10, 229-241 (2007).
129. von Tell, D., Armulik, A. & Betsholtz, C. Pericytes and vascular stability. *Exp Cell Res* 312, 623-629 (2006).
130. Im, E. & Kazlauskas, A. New insights regarding vessel regression. *Cell Cycle* 5, 2057-2059 (2006).
131. Dor, Y., *et al.* Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* 21, 1939-1947 (2002).
132. Dor, Y., Djonov, V. & Keshet, E. Induction of vascular networks in adult organs: implications to proangiogenic therapy. *Ann N Y Acad Sci* 995, 208-216 (2003).
133. Kupatt, C., *et al.* Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *J Am Coll Cardiol* 56, 414-422 (2010).
134. Rossdeutsch, A., Smart, N., Dube, K.N., Turner, M. & Riley, P.R. Essential role for thymosin beta4 in regulating vascular smooth muscle cell development and vessel wall stability. *Circ Res* 111, e89-102 (2012).
135. Eitenmuller, I., *et al.* The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circ Res* 99, 656-662 (2006).
136. Ito, W.D., *et al.* Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* 273, H1255-1265 (1997).
137. Troidl, K., *et al.* Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 55, 153-160 (2010).
138. Kojda, G. & Hambrecht, R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res* 67, 187-197 (2005).
139. Richardson, R.S., *et al.* Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol* 277, H2247-2252 (1999).
140. Sessa, W.C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J. & Hintze, T.H. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res* 74, 349-353 (1994).
141. Pedersen, B.K. & Febbraio, M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8, 457-465 (2012).
142. Walsh, K. Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ J* 73, 13-18 (2009).
143. Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. & Rabinowitz, J.E. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 16, 1073-1080 (2008).
144. Nemolato, S., *et al.* Thymosin beta(4) and beta(10) levels in pre-term newborn oral cavity and foetal salivary glands evidence a switch of secretion during foetal development. *PLoS One* 4, e5109 (2009).

145. Badamchian, M., *et al.* Identification and quantification of thymosin beta4 in human saliva and tears. *Ann N Y Acad Sci* 1112, 458-465 (2007).
146. Bodendorf, S., Born, G. & Hannappel, E. Determination of thymosin beta4 and protein in human wound fluid after abdominal surgery. *Ann N Y Acad Sci* 1112, 418-424 (2007).
147. Huff, T., *et al.* Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4. *J Cell Sci* 117, 5333-5341 (2004).
148. Qiu, F.Y., Song, X.X., Zheng, H., Zhao, Y.B. & Fu, G.S. Thymosin beta4 induces endothelial progenitor cell migration via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 53, 209-214 (2009).
149. Philp, D., Huff, T., Gho, Y.S., Hannappel, E. & Kleinman, H.K. The actin binding site on thymosin beta4 promotes angiogenesis. *FASEB J* 17, 2103-2105 (2003).
150. Sosne, G., Qiu, P., Goldstein, A.L. & Wheater, M. Biological activities of thymosin beta4 defined by active sites in short peptide sequences. *FASEB J* 24, 2144-2151 (2010).
151. Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J. & Treisman, R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98, 159-169 (1999).
152. Posern, G., Miralles, F., Guettler, S. & Treisman, R. Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J* 23, 3973-3983 (2004).
153. Yu, F.X., Lin, S.C., Morrison-Bogorad, M. & Yin, H.L. Effects of thymosin beta 4 and thymosin beta 10 on actin structures in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 27, 13-25 (1994).
154. Sanger, J.M., *et al.* Increasing intracellular concentrations of thymosin beta 4 in PtK2 cells: effects on stress fibers, cytokinesis, and cell spreading. *Cell Motil Cytoskeleton* 31, 307-322 (1995).
155. Golla, R., *et al.* Co-ordinate regulation of the cytoskeleton in 3T3 cells overexpressing thymosin-beta4. *Cell Motil Cytoskeleton* 38, 187-200 (1997).
156. Babic, A.M., Kireeva, M.L., Kolesnikova, T.V. & Lau, L.F. CYR61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6355-6360 (1998).
157. Fataccioli, V., *et al.* Stimulation of angiogenesis by Cyr61 gene: a new therapeutic candidate. *Hum Gene Ther* 13, 1461-1470 (2002).
158. Hall-Glenn, F., *et al.* CCN2/connective tissue growth factor is essential for pericyte adhesion and endothelial basement membrane formation during angiogenesis. *PLoS One* 7, e30562 (2012).
159. Small, E.M., *et al.* Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4218-4223 (2010).
160. Wright, M.J., Wightman, L.M., Latchman, D.S. & Marber, M.S. In vivo myocardial gene transfer: optimization and evaluation of intracoronary gene delivery in vivo. *Gene Ther* 8, 1833-1839 (2001).
161. Boutin, S., *et al.* Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* 21, 704-712 (2010).
162. Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J. & Wilson, J.M. Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* 199, 381-390 (2009).
163. Rapti, K., *et al.* Neutralizing antibodies against AAV serotypes 1, 2, 6, and 9 in sera of commonly used animal models. *Mol Ther* 20, 73-83 (2012).

164. Jessup, M., *et al.* Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124, 304-313 (2011).
165. Li, W., *et al.* Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol Ther* 16, 1252-1260 (2008).
166. Treadwell, T., *et al.* The regenerative peptide thymosin beta4 accelerates the rate of dermal healing in preclinical animal models and in patients. *Ann N Y Acad Sci* 1270, 37-44 (2012).
167. Dunn, S.P., *et al.* Treatment of chronic nonhealing neurotrophic corneal epithelial defects with thymosin beta4. *Ann N Y Acad Sci* 1194, 199-206 (2010).
168. Crockford, D. Development of thymosin beta4 for treatment of patients with ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci* 1112, 385-395 (2007).
169. Ruff, D., Crockford, D., Girardi, G. & Zhang, Y. A randomized, placebo-controlled, single and multiple dose study of intravenous thymosin beta4 in healthy volunteers. *Ann N Y Acad Sci* 1194, 223-229 (2010).

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt. Daher möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. M. Reincke und Herrn Prof. Dr. J. Heesemann für die Aufnahme in den Promotionsstudiengang für „Molekulare und Systembiologische Medizin“ bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Christian Kupatt für die Überlassung des spannenden Themas, seine intensive Betreuung und die stets konstruktive und kreative Diskussion der Ergebnisse. Er forderte und förderte mich, lehrte mich wissenschaftlich zu Arbeiten und unterstützte mich in all meinen eigenen Ideen und Vorhaben.

Nicht weniger dankbar bin ich Frau Dr. Rabea Hinkel, die mir als Betreuerin stets zur Seite stand, immer motivierende Worte fand und mich vor allem bei der Umsetzung neuer Ideen unterstützte.

Bei Frau PD Elisabeth Deindl möchte ich mich besonders bedanken, für die herzliche Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und ihr Engagement, welches weit über das einer wissenschaftlichen Kooperation hinaus reichte.

Besonders dankbar bin ich auch meinen Mitdoktoranden Georg Stachel, Tilman Ziegler und Judith Pagel, die mir mit praktischen Tipps und freundschaftlichem Rat immer helfend zur Seite standen.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Susanne Pfeiler für ihre hervorragende Hilfe bei der Erlernung der konfokalen Lasermikroskopie.

Sehr dankbar bin ich auch Herrn Cuong Kieu, Frau Elisabeth Raatz und Frau Christine Csapo für exzellente technische Assistenz und außerordentliche Hilfestellung bei der Erlernung neuer Methoden.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Großeltern, die mich über die Jahre hinweg unterstützt und motiviert haben, und des Öfteren viel Verständnis aufbringen mussten.