

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Einfluss der Gefäßmaturierung auf die therapeutische Neovaskularisierung mittels MRTF-A-Überexpression

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

vorgelegt von

Markus Daniel Kraus
aus München
2020

*Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München*

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Gerd Juchem
Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Schotta

*Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin:* Prof. Dr. med. vet. Rabea Hinkel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Klinische Grundlage: Die periphere arterielle Verschlusskrankheit.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Prozesse des Gefäßneubildung.....</i>	<i>3</i>
1.2.1	Angiogenese und Vaskulogenese.....	3
1.2.2	Gefäßmaturierung.....	5
1.2.3	Arteriogenese	6
1.3	<i>Neue Therapieansätze.....</i>	<i>7</i>
1.3.1	Gentherapie	7
1.3.2	Adeno-assoziierte Viren.....	9
1.3.3	Wachstumsfaktoren.....	11
1.4	<i>Angiopoietine und ihre Funktion.....</i>	<i>12</i>
1.4.1	Der Angiopoietin/Tie Signalweg	12
1.4.2	Angiopoietine in der Gefäßphysiologie	13
1.5	<i>Die MRTF/SRF Achse</i>	<i>14</i>
1.5.1	„Myocardin Related Transcription Factors“ (MRTFs).....	15
1.5.2	Thymosin-beta-4 (Tβ4) und MRTF	16
1.5.3	Der „Serum Response Factor“ (SRF) und dessen Zielgene.....	17
1.6	<i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	<i>18</i>
2	Material und Methoden.....	20
2.1	<i>Materialien</i>	<i>20</i>
2.1.1	Chemikalien	20
2.1.2	Geräte	20
2.1.3	Histologie	21
2.1.4	Zellkultur und Laborbedarf.....	22
2.1.5	Operationszubehör	22
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 und Lektine	24

2.2	<i>Produktion rekombinanter adeno-assoziiertes Viren</i>	25
2.2.1	Kultivierung der verwendeten Zelllinie	25
2.2.2	Tripeltransfektion von HEK293-Zellen	25
2.2.3	Ernte und Aufreinigung der Vektoren.....	27
2.2.4	Konzentrationsbestimmung.....	28
2.3	<i>Genexpression mittels Tet-off System</i>	29
2.4	<i>Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie</i>	30
2.4.1	Versuchstiere.....	30
2.4.2	Versuchsaufbau	31
2.4.3	Präoperative Maßnahmen und Narkose	32
2.4.4	Induktion der Ischämie.....	33
2.4.5	Behandlung.....	35
2.4.6	Angiographie.....	36
2.4.7	Versuchsende und Organentnahme.....	38
2.4.8	Kollateralwachstum.....	39
2.4.9	Messung der Flussgeschwindigkeit (Cinedensitometrie).....	40
2.5	<i>Quantitative Echtzeit-PCR</i>	41
2.5.1	Probenaufbereitung	41
2.5.2	cDNA-Herstellung	42
2.5.3	rt-PCR.....	42
2.6	<i>Histologische Färbungen</i>	43
2.6.1	PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung	43
2.6.2	WGA Färbung.....	45
2.6.3	Pikro-Siriusrot Färbung.....	45
2.7	<i>Statistische Analyse</i>	46
3	Ergebnisse	47
3.1	<i>Effekte der rAAV.MRTF-A Transduktion auf die Genexpression in vivo</i>	47
3.1.1	rt-PCR-Nachweis von MRTF-A	47
3.1.2	rt-PCR-Nachweis von CCN-1	48
3.1.3	rt-PCR-Nachweis von CCN-2.....	49
3.2	<i>Effekte des Tet-off Systems auf die Genexpression in vivo</i>	50
3.3	<i>Funktionelle Effekte von MRTF-A in vivo</i>	51

3.3.1	Analyse des Kapillarwachstums mittels Immunofluoreszenzhistochemie	51
3.3.2	Analyse der Kapillarreifung mittels Doppelimmunofluoreszenzhistochemie	53
3.3.3	Analyse des Kollateralwachstums mittels Angiographie.....	55
3.3.4	Analyse der Blutflussgeschwindigkeit mittels Cinedensitometrie.....	57
3.4	<i>Funktionelle Effekte der frühen Destabilisierung der Kapillaren in vivo</i>	58
3.4.1	Analyse des Kapillarwachstums mittels Immunofluoreszenzhistochemie	59
3.4.2	Analyse der Kapillarreifung mittels Doppelimmunofluoreszenzhistochemie	60
3.4.3	Analyse des Kollateralwachstums mittels Angiographie.....	62
3.4.4	Analyse der Blutflussgeschwindigkeit mittels Cinedensitometrie.....	64
3.5	<i>Strukturelle Effekte von MRTF-A in vivo</i>	65
3.5.1	Quantifizierung von Fibrose mittels Picro-Siriusrot Färbung.....	65
3.5.2	Quantifizierung von Hypertrophie mittels WGA-Färbung	67
4	Diskussion	70
4.1	<i>Potential von MRTF-A in der Gefäßneubildung</i>	70
4.2	<i>Potential der frühen Destabilisierung in der Gefäßneubildung</i>	71
4.3	<i>Von der Mikro- zur Makrozirkulation: Rolle der Gefäßmaturierung</i>	73
4.4	<i>Hypertrophie und Fibrose: Probleme von MRTF-A</i>	76
4.5	<i>rAAVs in der Gentherapie</i>	77
4.6	<i>Das Tet-off System in der Gentherapie</i>	79
4.7	<i>Klinischer Ausblick</i>	79
5	Zusammenfassung	81
6	Abkürzungsverzeichnis	82
7	Literaturverzeichnis	84
8	Danksagung	99
9	Curriculum vitae	100

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlage: Die periphere arterielle Verschlusskrankheit

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) definiert sich durch eine eingeschränkte Durchblutung der Extremitäten-versorgenden Arterien oder seltener der Aorta. Die Behinderung des Blutflusses kann durch eine Einengung (Stenose) oder einen Kompletverschluss (Okklusion) bedingt sein [1]. Ungefähr 95 % der Fälle chronischer PAVK sind mit Arteriosklerose assoziiert. Dabei kommt der Atherothrombose als symptomatischer Ausprägung eine besondere Bedeutung zu [2]. Ebenso spielen embolische Ereignisse kardialer und arterieller Genese mit zunehmendem Alter eine wichtige Rolle [3]. In Deutschland wird die PAVK üblicherweise nach Fontaine klassifiziert, während im angloamerikanischen Raum die Einteilung nach Rutherford häufiger angewandt wird (siehe Tabelle 1).

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

Tabelle 1: Klassifikation der PAVK nach Fontaine und Rutherford. Das Stadium II nach Fontaine entspricht der „Claudicatio intermittens“ (im Volksmund „Schaufensterkrankheit“). Stadium III und IV werden auch als „kritische Extremitätenischämie“ (critical limb ischemia, CLI) bezeichnet (gemäß der Leitlinie zur PAVK, 2015 [1]).

Durch objektive Messverfahren (Knöchel-Arm-Index) konnte in epidemiologischen Studien eine Gesamtprävalenz der PAVK von 3-10% festgestellt werden, mit einem Anstieg der

Prävalenz auf über 20% bei über 65-Jährigen [4-6]. Eine Auswertung von DRG-Aufnahmediagnosen konnte außerdem einen Anstieg der Krankheitsstadien mit dem Alter sowie eine gesteigerte Inzidenz der PAVK in Deutschland anhand der Hospitalisierungsraten zeigen (2,67 % aller Hospitalisierungen in 2005 auf 3,0 % in 2009) [7]. Für die Einstufung als Hockrisikopatient scheinen außer dem Alter vor allem Rauchen und Diabetes mellitus eine wichtige Rolle zu spielen [8, 9]. In der PARTNERS-Studie betrug die Prävalenz der PAVK in solch einer Risikopopulation 29 % [10]. PAVK-Patienten weisen zudem eine deutlich erhöhtes Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko hinsichtlich weiterer kardiovaskulärer Ereignisse wie Schlaganfall und Herzinfarkt auf [11, 12]. Diese Komorbiditäten sind maßgeblich mitbestimmend für die Prognose der Patienten. Die 4-Jahres-Sterblichkeit liegt bei Patienten mit Claudicatio intermittens bei 18,9 % und steigt vom Anfangs- bis zum Endstadium der kritischen Extremitätenischämie von 37,7 % auf 63,5 % an. Das Amputationsrisiko auf 4 Jahre gerechnet liegt vom ersten bis zum letzten Stadium nach Rutherford zwischen 4,6 % und 67,3 % [13]. Diabetiker haben eine deutlich schlechtere Prognose mit einer durchschnittlichen 1-Jahres Mortalität von 26 % im Vergleich zu 12 % bei Nichtdiabetikern. Bei der Hälfte aller diabetischen Patienten war außerdem innerhalb eines Jahres eine Majoramputation erforderlich [14]. In der weltweit größten internationalen Register-Studie zur Atherothrombose konnte sogar gezeigt werden, dass die jährliche Sterblichkeitsrate bei PAVK-Patienten höher liegt (2,4 %) als bei KHK-Patienten (1,8 %) [15].

Die aktuelle Therapieempfehlung der PAVK umfasst konservative, medikamentöse, chirurgische und interventionelle Verfahren. Die Basis jeder Behandlung stellen dabei die Kontrolle der kardiovaskulären Risikofaktoren und ihrer Begleiterkrankungen sowie die Verbesserung des peripheren Blutflusses zur Hemmung der Krankheitsprogression dar. Je nach Stadium der Erkrankung stehen unterschiedliche Ziele im Vordergrund. Während im asymptomatischen Stadium der PAVK zunächst auf die Risikoreduktion von vaskulären Ereignissen geachtet wird, spielt im Stadium der Claudicatio intermittens eher die symptomatische Verbesserung mit Verlängerung der schmerzfreien Gehstrecke und Optimierung von Mobilität und Lebensqualität eine übergeordnete Rolle. Im Stadium der kritischen Extremitätenischämie gewinnt zudem die Vermeidung von Ulzerationen und der Gliedmaßenverlust an Bedeutung [16, 17]. Bei allen Patienten ist stadienunabhängig ein Management vorliegender Risikofaktoren, vor allem Rauchen, Diabetes, Hypertonie und Dyslipidämie, essentiell [18-20]. Des Weiteren wird eine Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS oder Clopidogrel in fast allen Fällen (in Stadium I nach Fontaine umstritten) empfohlen [21, 22]. Als wichtigste nichtmedikamentöse

Therapie konnte das strukturierte Gehtraining einen bedeutenden Nutzen für asymptomatische und Patienten mit einer Claudicatio intermittens erzielen [23]. Letztere profitierten auch von einer spezifischen medikamentösen Therapie mit dem Phosphodiesterase-III-Hemmer Cilostazol oder dem Vasodilatator Naftidrofuryl [24, 25]. Für Patienten mit kritischer Extremitätenischämie, aber auch für ausgewählte Patienten mit Claudicatio kommen schließlich invasive Methoden zum Einsatz, wobei der interventionellen Therapie aufgrund des geringeren perioperativen Risikos bei gleichem Nutzen der Vorzug gegeben wird [26, 27]. Längst nicht bei allen Patienten führen diese Maßnahmen jedoch zum Erfolg. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass der Anteil an sogenannten „no-option“ Patienten aufgrund zunehmenden Alters und Komorbidität steigen wird [28, 29]. Um auch diesen Menschen ein amputationsfreies Überleben zu ermöglichen, fanden neben den konventionellen Verfahren in den letzten Jahren immer mehr Ansätze neuer Therapieformen aus der experimentellen Forschung Einzug in klinische Studien. Der wohl vielversprechendste Ansatz der molekularen Medizin zur Bekämpfung chronischer Ischämien ist das Konzept der therapeutischen Neovaskularisierung.

1.2 Prozesse des Gefäßneubildung

Bevor auf die neueren Therapiemöglichkeiten im Detail eingegangen wird, sollen zunächst die Prozesse der Gefäßneubildung erläutert werden. Eine Grundkenntnis von Angiogenese, Gefäßstabilisierung und Arteriogenese ist essentiell, um die Ansatzpunkte molekularer Verfahren zur therapeutischen Neovaskularisierung zu verstehen.

1.2.1 Angiogenese und Vaskulogenese

Angiogenese definiert das Wachstum von Blutgefäßen als Prozess der Aussprossung endothelialer Zellen aus bereits existierenden Gefäßstrukturen und deren röhrenförmige Anordnung zu neuen Kapillaren [30, 31]. Dem gegenübergestellt steht der Begriff der Vaskulogenese, der die „de novo“ Entstehung von Gefäßen aus mesodermalen Vorläuferzellen, sogenannten Angioblasten, meint [32]. Da letzterer Vorgang vor allem für die Entwicklung des embryonalen Gefäßsystems Relevanz hat und dessen postnatale Genese durch frei zirkulierende, endotheliale Progenitorzellen (EPCs) eher umstritten ist, wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen. Es sei jedoch erwähnt, dass die Anwesenheit

dieser Zellen durch parakrine Stimulation durchaus einen Einfluss auf das Gefäßwachstum zu haben scheint [33].

Im adulten, gesunden Organismus befinden sich Endothelzellen in einem Ruhezustand, der durch wandbildende Zellen, sogenannte Perizyten, und deren gemeinsame Basalmembran mit Endothelzellen aufrechterhalten wird [34]. Damit Angiogenese geschehen kann, ist ein Auflösen dieses stabilen Komplexes erforderlich. Bestimmte Pathologien, z.B. Entzündung, Tumoren oder Ischämie, sind durch Milieuveränderungen dazu in der Lage, diesen Prozess einzuleiten. Einer der wohl stärksten Trigger ist die Hypoxie. Sie führt zur Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 (HIF-1) und infolgedessen zur Freisetzung pro-angiogener Substanzen, wie z.B. VEGF [35]. Dieser Faktor ist zusammen mit Notch maßgeblich an der Ausbildung zweier für die Angiogenese essentieller endothelialer Zelltypen verantwortlich: Stiel- und Endzellen.

Endzellen (tip cells) bilden die Spitze der Aussprossung. Sie sind reich an Matrix-Metalloproteasen, z.B. MMP-1, die in der Lage sind die Basalmembran aufzuspalten und pro-angiogene Stoffe daraus freizusetzen [36]. Ebenso werden anti-angiogene Faktoren freigesetzt, um ein kontrolliertes Wachstum des neu entstehenden Gefäßbaums zu ermöglichen [37]. Endzellen haben einen dichten Besatz an VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) und werden daher durch VEGF aktiviert und zur Migration und Ausbildung von sogenannten Filopodien angeregt, die quasi als Sensor für das VEGF-Signal fungieren. Gleichzeitig sorgen Endzellen durch laterale Inhibition dafür, dass es nicht zu einer übermäßigen Entwicklung ihrer Sorte kommt, sondern dass ihre benachbarten Zellen sich zu Stielzellen formieren. Dies geschieht, da alle Endothelzellen auf das VEGF-Signal hin den Notch Liganden DLL4 exprimieren, jedoch in unterschiedlichem Maße. Nur die Zellen mit den höchsten Spiegeln an DLL4 entwickeln sich zu Endzellen, da sie das Notch-Signal in Nachbarzellen besser aktivieren und diese damit zur Umwandlung in Stielzellen zwingen [38]. Stielzellen (stalk cells) sind gekennzeichnet durch hohe Notch-Aktivität und verantwortlich für die Proliferation des wachsenden Gefäßastes und die Lumenbildung. Dieser Prozess wird maßgeblich durch die Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Notch gesteuert. Stielzellen sind vor allem mit VEGFR-1 besetzt und tragen damit ihrerseits zur lateralen Inhibition durch Limitierung übermäßigen Wachstums von Endzellen bei [39]. Die Umwandlung in einen der beiden Zelltypen ist kein finaler Zustand, sondern ein dynamischer Prozess, um veränderten Anforderungen, z.B. dem Bedarf erneuter Aufzweigungen, gerecht zu werden [40].

Um eine geschlossene Blutzirkulation zu ermöglichen, müssen Endzellen mit den Filopodien andere Endzellen interagieren, sodass es zu einer Anastomose der Kapillarstümpfe kommt.

Dieser Prozess kann durch Makrophagen unterstützt werden [41]. Die Anastomose wird dann durch VE-Cadherin-haltige Zellverbindungen aufrechterhalten. Im Anschluss ist eine Perfusion des neuen Gefäßes möglich, wodurch wiederum eine Remodellierung durch Scherspannung-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie z.B. KLF-2, induziert wird [42]. Schließlich kommt es zu einem Versiegen des VEGF-Signals durch Reoxygenierung des hypoxischen Areals. Die Endothelzellen kehren wieder in ihren Ruhezustand, aufgrund ihrer Morphologie als sogenannte Phalanxzellen bezeichnet, zurück [43].

1.2.2 Gefäßmaturierung

Damit neu entstandene Kapillaren ihre Funktion erfüllen können, müssen sie ausreifen und stabilisiert werden. Dieser Prozess wird Maturierung genannt und meint vor allem die Anlagerung von Perizyten an Endothelzellen und die Bildung einer gemeinsamen Basalmembran. Diese beiden Vorgänge können z.B. sehr gut mit dem Faktor TGF- β induziert werden, der auch für den Wachstumsarrest proliferierender Endothelzellen von Bedeutung ist [44]. Die Bindung an TGF- β -Rezeptor-2 (TGF β R-2) führt entweder über ALK-1 zur Migration und Proliferation von Perizyten oder über ALK-5 zur Ausdifferenzierung mit konsekutiver Gefäßstabilisierung [45].

Perizyten haben eine starke Ähnlichkeit mit mesenchymalen Stammzellen [46, 47]. Oft werden sie auch zu den myofibroblastischen Zellen gezählt [48]. Tatsächlich ist die Herkunft von Perizyten unklar, es wird davon ausgegangen, dass sie in der Lage sind eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zu durchlaufen. Manche Autoren sind sogar der Auffassung, dass alle mesenchymale Stammzellen Perizyten seien [49]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen ist, dass Perizyten direkte Zellverbindungen mit Endothelzellen aufweisen und nicht durch extrazelluläre Matrix von diesen getrennt werden [50, 51]. Für die Vermittlung dieser Endothelzell-Perizyten Kontakte scheint endotheliales Sphingosin-1-Phosphat (S1P) eine bedeutende Rolle zu spielen, das an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1PR1-5) bindet [52]. Die Interaktion über diese Zell-Zell-Kontakte ist wichtig, da Perizyten dazu in der Lage sind geringe Mengen an VEGF zu produzieren, was die ruhenden Endothelzellen vor der Apoptose bewahrt [53].

Ein weiterer wichtiger Faktor der Gefäßmaturierung mit einem starken Einfluss auf murale Zellen ist PDGF-B. Er wird von Endothelzellen sezerniert und stimuliert Perizyten durch Bindung an PDGF-Rezeptor- β (PDGFR- β). Dadurch können Perizyten entweder von einer lokalen Quelle oder aus dem Knochenmark rekrutiert werden [54]. Da PDGF-B vor allem von

Endzellen sezerniert wird, finden sich Perizyten vertärkt im Bereich des wachsenden Gefäßsprosses.

Das für die Perizytenrekrutierung ebenfalls wichtige Angiopoietin/Tie2 System wird gesondert in Kapitel 1.4 behandelt, da es aufgrund der Anwendung in den Versuchen dieser Arbeit einer ausführlicheren Auseinandersetzung bedarf.

1.2.3 Arteriogenese

Für eine funktionale Durchblutung sind maturierte Mikrogefäße nicht ausreichend. Es bedarf arterieller Konduktanzgefäße, die größere Volumina an Blut zum Kapillarbett transportieren können und außerdem durch glatte Gefäßmuskelzellen tonusregulierende Eigenschaften besitzen. Bei stenosierten oder okkludierten Arterien kommt dem Bluttransport über Umgehungskreisläufe eine besondere Bedeutung zu. Im adulten Organismus meint Arteriogenese das Wachstum solcher Kollateralgefäße aus prä-existenten, arteriolären Anastomosen [55].

Es herrscht Uneinigkeit darüber, ob Kollateralen lediglich aus bereits vorhandenen, arteriolären Netzwerken entstehen oder sich selbst beim Erwachsenen noch „de novo“ bilden können [56]. Genauere Messverfahren konnten jedoch zeigen, dass neu-entstanden geglaubte arterielle Kreisläufe bereits in Form (mit konventionellen Methoden) nicht detektierbarer Arteriolen vorhanden waren [57, 58]. Als relativ gesichert gilt hingegen, dass es sich beim maßgeblichen Stimulus der Arteriogenese nicht um einen chemischen (Hypoxie) wie bei der Angiogenese handelt, sondern um eine physikalische Größe, genannt Scherspannung [59]. Im Falle einer progredienten Stenosierung oder Okklusion entsteht in den Mikrokollateralen durch Druckabfall im post-stenotischen Gebiet ein Blutstrom entlang des Druckgradienten mit konsekutivem Anstieg der Scherspannung auf Endothelzellen [60]. Diese übersetzen den physikalischen Reiz in veränderte Genexpressionsmuster, wodurch die Arteriogenese eingeleitet wird.

Eine essentielle Rolle dabei spielen mononukleäre Zellen, da sie mit Wachstumsfaktoren, wie z.B. FGF, beladen sind [61]. Für die Rekrutierung von mononukleären Zellen ist das chemotaktisch wirksame MCP-1 wichtig, das den monozytären Rezeptor CCR2 bindet [62]. Durch die Scherspannung kann das Endothel außerdem zur Produktion der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 über den NF κ B-Signalweg angeregt werden, was ebenso zur Akkumulation von Monozyten am Ort der Arteriogenese führt [63]. Diese infiltrieren die Gefäßwand, differenzieren zu Makrophagen und bereiten das Kollateralgefäß

durch Zersetzung der extrazellulären Matrix mit Matrix-Metalloproteasen auf den Umbauprozess vor. Der inflammatorische Vorgang wird durch T-Lymphozyten, die über die Adventitia einwandern, unterstützt und ist essentiell für die Arteriogenese [64, 65].

Im Anschluss kann im aufgelockerten Bindegewebe eine Proliferation von Endothelzellen und glatter Gefäßmuskulatur stattfinden. Im Endothel kommt es zur Aktivierung zahlreicher Signalkaskaden, wie z.B. PI3K/Akt und ERK-1/2, die für die Regulation der Arteriogenese essentiell sind [66, 67]. Für die Rekrutierung von glatten Gefäßmuskelzellen konnte die Bedeutung der Scherspannungs-abhängigen Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) identifiziert werden [68, 69]. Die NO-vermittelte Vasodilatation führt zu einer vergrößerten zirkulären Wandspannung mit konsekutiver Mediaproliferation und – hypertrophie [70]. Nachdem eine bis zu 20-fache Vergrößerung des Gefäßes eingetreten ist [71] kommt es zur Maturierung durch Wiederanlagerung der glatten Gefäßmuskelzellen und erneuten Stabilisierung der Wandschichten mit Elastin und Kollagen [72]. Da das Kollateralwachstum unterschiedlich schnell abläuft, kommt es in kleineren Arteriolen durch Abfall der Scherspannung im Verlauf zu einer überschießenden Intimaproliferation mit konsekutivem Verschluss. Die Folge ist ein effizienterer Bluttransport über wenige große Kollateralen [73].

1.3 Neue Therapieansätze

Zahlreiche Verfahren der Gen- und Stammzell-vermittelten Therapie wurden bereits entwickelt und erforscht mit dem Ziel eine funktionelle Revaskularisation ischämischen Muskelgewebes zu erreichen. Im Folgenden wird aufgrund des thematischen Schwerpunktes dieser Arbeit lediglich auf die gentherapeutischen Aspekte näher eingegangen.

1.3.1 Gentherapie

Gentherapie meint das Einbringen von RNA oder DNA in körpereigene Zellen zu therapeutischen Zwecken. Dies kann zum einen *ex vivo* erfolgen, indem zunächst Zellen dem Körper entnommen und dann gentherapeutisch aufbereitet werden, bevor sie wieder in den Körper verpflanzt werden. Zum anderen kann die Einbringung von Genen auch *in vivo* durchgeführt werden, vorausgesetzt man kann Zielareal und Zielzellen erfolgreich genug erreichen. Dabei kann das gewünschte Gen entweder in die Wirts-DNA eingebaut werden

oder als Episom extrachromosomal verbleiben. Es lassen sich also integrierende von nicht-integrierenden Genen unterscheiden. Es gibt zwei Formen der Gentherapie: In der Keimbahntherapie werden Keimzellen oder frühe Embryonalzellen genetisch verändert, sodass die genetische Modifikation vererbbar wird. Da diese Form der Gentherapie aktuell verboten ist, befasst sich die vorliegende Arbeit mit der somatischen Gentherapie, bei der in differenzierteren Zellen, die nicht in die Keimbahn einfließen, ein Gentransfer durchgeführt wird. Damit bleibt die Veränderung auf das behandelte Individuum beschränkt [74, 75]. Die wohl größte Hürde der Gentherapie bleibt bis heute die Genübertragung. Zahlreiche Vektoren wurden bereits ausgetestet, wobei sich diese vereinfacht in non-virale (Transfektion) und virale (Transduktion) unterscheiden lassen [76].

Die einfachste nicht-virale Methode ist die Transfektion von nackter DNA, z.B. in Form eines Plasmids [77]. Dafür wurden mehrere chemische (z.B. Polyethylenimin) und physikalische (z.B. Elektroporation) Verfahren entwickelt, die jedoch eher für die Übertragung auf Zellen *ex vivo* zugänglich sind [78]. Vielversprechender sind Transporter, die die DNA verpackt zur Zielzelle *in vivo* befördern, wie z.B. Liposomen oder Mikrobubbles [79, 80]. Allen gemeinsam ist jedoch die im Vergleich zu viralen Verfahren relativ geringe Transfektionseffizienz und Expressionsdauer, dafür aber eine praktisch fehlende Immunreaktion [81]. Ein sehr interessanter Ansatz verfolgt die Einführung eines 47. künstlichen Chromosoms in Zielzellen als Vektor für große oder mehrere Gene [82].

Eine größere Hoffnung für die Genübertragung stellen aktuell virale Vektoren dar. Sie sind effizienter in der Transduktion von Genen und haben prinzipiell die Fähigkeit eine Langzeitexpression zu induzieren. Diese kann jedoch abhängig vom jeweiligen Virustyp durch eine mehr oder weniger starke Immunogenität eingeschränkt werden.

Adenovirale (Ad) Vektoren können eine breite Palette an Zellen transduzieren, darunter auch Skelett- und glatte Muskelzellen [83]. Sie zeigen eine solide aber nur ein bis zwei Wochen andauernde Expression des Transgens, was sie für pro-angiogene Kurzzeittherapien in ischämischem Muskelgewebe interessant macht [84, 85]. Der größte Nachteil von Ad Vektoren, vor allem älterer Generation, ist die Immunogenität [86]. Mit der neusten Generation konnte die Gefahr einer Immunantwort zwar reduziert werden, jedoch bleibt eine gewisse Toxizität, die zudem die Wirkung weiterer Dosen herabsenkt [87]. Da diese unerwünschte Wirkung auf den breiten Tropismus mit ungewollter Transduktion zahlreicher unbeteiligter Zellen durch den Ad Vektor zurückzuführen ist, versucht man nun das Risiko durch lokale Applikationen zu senken [88]. Dennoch ist bei der Anwendung dieser Vektoren in klinischen Studien Vorsicht geboten. Ein weiterer denkbarer Vektor für die therapeutische

Neovaskularisierung ist das Lentivirus (LV), das vor allem durch seinen Tropismus für Endothelzellen [89] und die Erfolge in der Behandlung hämatopoietischer Erkrankungen an Aufmerksamkeit gewann [90, 91]. Aufgrund der Fähigkeit zufällig aber nachhaltig ins Genom zu integrieren, eignet sich der LV Vektor gut für eine Langzeitexpression des Zielgens [92]. Jedoch sind auch die hiermit verbundenen Risiken einer potentiellen malignen Entartung zu beachten [93]. In der LV-gestützten Behandlung des SCID-Syndroms bei vier Kindern kam es bei einem Kind zur Ausbildung einer Leukämie, die möglicherweise Vektor-induziert sein könnte [94]. Durch Modifikation der LV-Vektoren wird versucht solche Nebenwirkungen in Zukunft zu vermeiden. Lentiviren wurden bisher noch nicht in klinischen Studien des kardiovaskulären Systems getestet.

1.3.2 Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV) werden sehr häufig angewandt in aktuellen gentherapeutischen Bestrebungen. Im Jahre 2012 wurde das erste Gentherapeutikum der westlichen Welt, Glybera[®], zugelassen, welches eben diese Viren als Vektoren nutzt [95]. AAVs gehören zu den Parvoviren und können sich nur in Anwesenheit eines Helfervirus, vor allem Adenovirus (daher der Name) aber auch Herpes- und Papillomavirus, reproduzieren [96]. Deshalb bezeichnet man sie auch als Dependoviren. Sie gelten als relativ sicher in der Anwendung, da sie mit keinerlei Pathogenität in Verbindung gebracht werden konnten und viel seltener inflammatorische Ereignisse induzieren als Ad Vektoren [97]. In vielen Zielgeweben, inklusive dem Skelettmuskel, konnten bereits lange Expressionszeiten erzielt werden, vor allem durch rekombinante AAVs (rAAV), die nicht in das Genom integrieren, sondern ihre genetische Information als Episom haltbar machen [98]. Daher werden rAAVs in der modernen Gentherapie den Wildtyp-AAVs, die dazu neigen ortsspezifisch in das humane Chromosom 19 zu integrieren, vorgezogen [99]. Ein Nachteil aller AAVs bleibt jedoch, dass es sich um sehr kleine Viren (ca. 25 nm) handelt, in denen eine genetische Information von maximal 4,7 kb verpackt werden kann. Verschiedene molekulare Methoden, wie z.B. *trans-splicing*, erlauben allerdings die Transduktion einer doppelt so großen genetischen Information mittels Zwei-Vektoren-Technologie [100].

Zur Zeit kennt man 13 AAV-Serotypen und mehr als 100 Kapsid-Varianten, die sich in Immunogenität und ihrem Tropismus für verschiedene Gewebe unterscheiden [101]. Darunter zeigten in klinischen und präklinischen Studien u.a. die Serotypen AAV2 und 9 eine erfolgreiche Transduktion von Skelettmuskelgewebe, sodass sie für die therapeutische

Neovaskularisierung in der PAVK interessant erscheinen [102]. Versuche einer effektiven Transduktion von Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen waren bisher jedoch eher ernüchternd [103].

AAV2 ist der am besten untersuchte Serotyp, dessen Erforschung neben vielen positiven Eigenschaften auch einige Kritikpunkte von AAVs als Vektoren aufzeigte. AAV2 ist nicht sehr gewebspezifisch und zeigt nach systemischer Applikation eine nennenswerte Transduktion zahlreicher Zellarten [104]. Hinzu kommt die hohe Prävalenz neutralisierender Antikörper gegen AAV2 im Menschen, wodurch der Einsatz dieses Serotyps limitiert ist [105]. Moderne Methoden erlauben jedoch die Herstellung sogenannter Hybrid-Viren durch Kombination verschiedener Serotypen, um einen viralen Vektor mit den gewünschten Eigenschaften zu kreieren [106]. So ist es z.B. möglich, AAV2-ITR-flankierte Transgene, die extrem lange Expressionszeiten erzielten [107], in das Kapsid eines AAV9 zu verpacken, das Muskelgewebe effektiver transduziert und weniger Probleme aufgrund von Immunogenität und neutralisierenden Antikörpern zeigt [108]. Durch regionale Applikationsverfahren konnte das Risiko systemischer Nebeneffekte einer rAAV-vermittelten Therapie noch weiter gesenkt werden [109]. Aus den genannten Gründen entschieden wir uns, rAAV2/9 als Vektor in unserem Modell der chronischen Ischämie des Kaninchenhinterlaufs zu nutzen [110].

	Adenovirus (Generation)				Adeno-assoziiertes Virus	Lentivirus
	Nackte DNA	1	2	3		
Genom	cDNA	dsDNA	dsDNA	dsDNA	ssDNA	ssRNA
Größe (max.)	~ 10 kb	~ 7,5 kb	~ 10 kb	~ 35 kb	~ 4,5 kb	~ 8 kb
Integration	Nein	Nein	Nein	Nein	Wildtyp: Ja Rekombinant: Nein	Zufällig
Transduktions-effizienz	Gering	Hoch	Hoch	Hoch	Hoch	Hoch
Immunantwort	Gering	Hoch	Mittelhoch	Mittel	Gering	Gering
Expressionsdauer	Kurz	Kurz	Kurz	Kurz	Lang	Lang

Tabelle 2: gentherapeutisches Profil ausgewählter Vektoren (modifiziert nach Hinkel et al. [81]).

ds: Doppelstrang, ss: Einzelstrang, kb: Kilobasen

1.3.3 Wachstumsfaktoren

Die Suche nach dem geeigneten Vektor zur Induktion einer therapeutischen Neovaskularisierung in ischämischem Muskelgewebe ist nur eine Herausforderung, die einem bei gentherapeutischen Überlegungen begegnet. Mindestens genauso schwierig ist es, den optimalen Faktor dafür zu finden. Zurzeit sind vor allem die Wachstumsfaktoren VEGF, FGF, HGF im Fokus klinischer Studien [111].

VEGF-A (oft nur VEGF) ist der bekannteste Vertreter der VEGF-Familie, die aus VEGF-A, B, C, D und PlGF besteht. Es existieren verschiedene Isoformen von VEGF-A, die nach Anzahl der Aminosäuren benannt sind, mit den wichtigsten Subtypen VEGF-121, 165, 189 und 206 [112]. Da zahlreiche präklinische Studien einen starken pro-angiogenen Effekt von VEGF zeigten, wurden die ersten klinischen Untersuchungen für „no-option“-PAVK Patienten begonnen. Bislang konnte mit den Isoformen VEGF-165 und 121 zumindest in einigen Studien eine Verbesserung in Aspekten wie Ulzerationen, Schmerz und Hämodynamik festgestellt werden [113]. Allerdings wurden wichtige primäre Endpunkte (reduzierte Amputationsrate, verlängerte Gehzeit, verbessertes Überleben) nicht erreicht [114]. Auch kam es bei manchen behandelten Patienten zur Ausbildung von Beinödemen. Während keine vektorbedingten (Adenovirus vs. Plasmid/Liposomen) oder von der Applikationsform (i.m. vs. i.a. via Katheter) abhängigen Beeinträchtigungen festgestellt werden konnten, führte man die ernüchternden Ergebnisse u.a. auf VEGF-induzierte Permeabilitätssteigerung und ungenügende Gefäßmaturierung zurück [85].

Ein weiterer pro-angiogener Faktor, der zudem proliferative Effekte auf glatte Gefäßmuskelzellen zeigte, ist FGF. Es existieren mindestens 23 Subtypen, wovon aFGF und bFGF am besten untersucht sind und in klinischen Studien getestet wurden [115]. Ähnlich wie bei VEGF zeigten frühe Phase I und II Studien sehr positive Ergebnisse wie weniger Ulzerationen, Schmerz und einen verbesserten ABI und sogar signifikant weniger Amputationen mit einer Tendenz zum verbesserten Überleben [116, 117]. Aber in großen Phase III Studien waren diese Befunde alle nicht reproduzierbar [118].

Ein vielversprechender Wachstumsfaktor, dessen pro-angiogenes Potential erst später entdeckt wurde und aktuell in klinischen Studien untersucht wird, ist HGF. Im Gegensatz zu FGF wirkt HGF nicht pro-inflammatorisch und induziert auch keine Permeabilitätserhöhung wie VEGF [119]. Eine repräsentative Phase II Studie konnte ihren primären Endpunkt (verbessertes Ruheschmerz/geringere Ulzerationen) erreichen und zeigte keine zur Kontrollgruppe signifikant unterschiedlichen Nebenwirkungen [120]. Jedoch war die

Amputationsrate in der Therapiegruppe nicht geringer. Auf Basis dieser Ergebnisse ist eine groß angelegte Phase III Studie geplant.

Die Ergebnisse der klinischen Studien zeigen das Potential aber auch die Enttäuschungen der Gen-basierten therapeutischen Neovaskularisierung. Weitere Forschung von der „Bench“ bis zum Patientenbett wird nötig sein, um dem Traum des amputationsfreien Überlebens näher zu kommen [121].

1.4 Angiopoietine und ihre Funktion

Wachstumsfaktoren, die die Zukunft der therapeutischen Neovaskularisierung maßgeblich mitbestimmen könnten und es zum Teil bereits tun, sind die Angiopoietine. Im Folgenden wird detailliert auf die Angiopoietine und ihre Signalkaskade über die Tie-Rezeptoren eingegangen sowie deren wichtigste Funktionen für die Homöostase des Gefäßsystems besprochen.

1.4.1 Der Angiopoietin/Tie Signalweg

Bei der Familie der Angiopoietine (Ang) handelt es sich um ca. 70 kDa große Glykoproteine. Die vier Mitglieder, Ang-1 bis 4, sind Liganden des Tie-2 Rezeptors [122]. Tie-2 gehört mit Tie-1 zu den Rezeptortyrosinkinasen, wobei Tie-1 keine direkten Bindungen mit Ang eingeht, sondern durch Heterodimerisierung mit Tie-2 dessen Aktivität regulieren kann. Tie ist ein Akronym für **T**yrosinkinase-mit-**I**mmunglobulin-und-**E**GF-homologer-Domäne und beschreibt damit die wichtigsten Strukturmerkmale des Rezeptors [123]. Unter den Angiopoietinen sind Ang-1 und Ang-2 die bedeutenderen. Um eine Wirkung am Rezeptor auszuüben, muss Ang-2 als Dimer, Trimer oder Tetramer vorliegen, Ang-1 mindestens als Tetramer [124].

Ang-1 führt durch seine Bindung zur Autophosphorylierung von Tie-2 und damit zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Dabei muss Tie-2 sich mindestens zu Tetrameren formieren, um das Signal weiterzuleiten [125]. Von Bedeutung ist vor allem die durch die Phosphoinositid-3-Kinase-vermittelte (PI3K) Stimulation der Proteinkinase B (Akt) und mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK). Auch die Inhibition der NFκB-Aktivität durch A20-bindenden Inhibitor von NFκB 2 (ABIN-2) wird durch Ang-1 gesteuert. Ang-1 ist damit ein starker Agonist der Tie-2 Aktivität [126].

Die Wirkung der Ang-2-Bindung ist etwas komplexer. Unter bestimmten Bedingungen (verlängerte Stimulation, hohe Konzentration) *in vitro* konnte ein schwacher Agonismus am Tie-2 Rezeptor gezeigt werden [127]. Die Tatsache, dass Ang-1- oder Tie-2-defiziente Mäuse nahezu denselben Phänotyp zeigten wie Ang-2-überexprimierende Mäuse, stützen jedoch die Hypothese von Ang-2 als Antagonist des Tie-2 Signals [128]. Ang-2 ist also maximal als Partialagonist von Tie-2 zu bewerten. Tatsächlich scheint die antagonistische Funktion im lebenden Organismus durch Verdrängung des starken Aktivators Ang-1 vom Rezeptor wesentlich relevanter zu sein. Das richtige Zusammenspiel von Ang-1 und Ang-2 ist sehr komplex, aber essentiell für die Funktion dieses Signalwegs in der Gefäßphysiologie [129].

1.4.2 Angiopoietine in der Gefäßphysiologie

Ang-1 wird vor allem von perivaskulären Zellen (Perizyten, glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten) exprimiert und sezerniert. Es liegt dann zumeist gebunden an Extrazellulärmatrix vor, von wo aus es jederzeit an seinen Rezeptor dissoziieren kann [130]. Im adulten Organismus findet man die Ang-Rezeptoren hauptsächlich auf Endothelzellen, so dass von diesen Zellen auch die Hauptwirkung der Ang-vermittelten Signale ausgeht. In ruhenden Endothelzellen, also dem Normalzustand in gesundem adultem Gewebe, scheint Tie-2 konstitutiv aktiv zu sein und damit eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung eines stabilen Gefäßzustandes zu spielen [131]. Ob Ang-1 für diesen Prozess relevant ist, ist jedoch seit kurzem umstritten [132]. Unter hypoxischen Bedingungen und daraus resultierenden Konzentrationsanstiegen von VEGF-A und PDGF-B konnte eine vermehrte Expression von Ang-1 nachgewiesen werden [133]. Die tatsächliche Bedeutung der Ang-1/Tie-2 Interaktion für die VEGF-induzierte Angiogenese konnte in Doppel-transgenen Mäusen gezeigt werden. Nur in Kombination mit Ang-1 konnte VEGF ein hoch differenziertes Kapillarnetz ausbilden, das keine Undichtigkeit aufgrund gesteigerter Permeabilität zeigte wie mit VEGF allein. Ang-1 führte nicht nur zu einer verbesserten Maturierung der neu gebildeten Gefäße durch Induktion eines dichten Perizytenbesatzes. Durch die gesteigerte Stabilität konnten auch wesentlich mehr, durch VEGF zum Sprießen gebrachte Kapillaren aufrechterhalten werden [134]. Wichtig dabei ist, dass Tie-2 während der Angiogenese vor allem auf Stielzellen exprimiert wird und daher die Maturierung vom Ursprung des wachsenden Gefäßes aus stattfindet, um nicht den Spross einzumauern [135]. Ang-1 ist außerdem anti-inflammatorisch wirksam und beugt damit die Entstehung eines dysfunktionalen Gefäßnetzes vor [136]. Im Gegensatz zu Ang-1 wird Ang-2 in Endothelzellen selbst produziert und in speziellen

Zellorganellen, den Weibel-Palade-Körperchen, gespeichert. Während es in ruhenden Endothelzellen keine nennenswerte Rolle spielt, kommt es zur schlagartigen Überexpression durch pro-angiogene Stimuli wie VEGF und Hypoxie. Unter diesen Umständen kann mithilfe von Thrombin, Histamin oder Harnsäure eine rapide Freisetzung von Ang-2 aus den Speicherorganellen erfolgen [137]. Danach konkurriert es mit Ang-1 um die Bindung am Tie-2 Rezeptor. Endothelzellen können dadurch über einen autokrinen Mechanismus, eine Art negative Rückkopplungsschleife, das Ang-1 Signal regulieren [138]. In inflammatorischen Störungen wie der Sepsis fand man hohe Konzentrationen an Ang-2, die zur Dissoziation der Perizyten vom Endothel und damit zu einer gesteigerten Permeabilität führten. Ang-2 kann somit, wenn es als kompetitiver Inhibitor von Ang-1 wirkt, Gefäßdestabilisierung fördern [139]. Diese pro-inflammatorische Eigenschaft kann sich jedoch in der Anwesenheit von VEGF als nützlich erweisen, da durch die vermehrte Infiltration von Leukozyten und erhöhte Konzentration an Zytokinen und Proteasen die Induktion der Angiogenese unterstützt wird. Solange das Ang-2 Signal überwiegt kann ein ungestörtes Wachstum des destabilisierten Gefäßsprosses stattfinden. In Abwesenheit eines pro-angiogenen Stimulus kommt es jedoch unter Ang-2 zur Gefäßregression [140]. Allerdings kann Ang-2 Tie-2-unabhängig über Integrine eine direkt pro-angiogene Wirkung entfalten [141].

Für den Prozess der Neovaskularisierung lässt sich also schlussfolgern, dass zunächst Ang-2 für die Induktion und Proliferationsphase relevant zu sein scheint während Ang-1 erst später den neuen Gefäßen durch Perizytenanlagerung und Maturierung Stabilität verleiht und ein dysfunktionales Wachstum eindämmt.

1.5 Die MRTF/SRF Achse

Bislang dominieren vor allem Wachstumsfaktoren das Feld der therapeutischen Neovaskularisierung. Ihre Anwendung stellt sich jedoch als schwierig heraus, da sie zum einen in aller Regel mehrere Signalwege regulieren, zum anderen diese Signale von vielen anderen Einflüssen gestört werden können. Der Effekt ist daher nicht sehr gezielt, situationsabhängig und schwer absehbar. Es erscheint also sinnvoll, möglichst generelle Signalkaskaden nach potentiellen therapeutischen Faktoren zu überprüfen, idealerweise auf Ebene der Transkriptionsfaktoren. In unseren Untersuchungen stießen wir so auf die MRTF/SRF Achse.

1.5.1 „Myocardin Related Transcription Factors“ (MRTFs)

MRTFs (MRTF-A und MRTF-B) und Myocardin gehören zu einer Familie aktivierender Ko-Transkriptionsfaktoren von „Serum Response Factor“ (SRF). Während Myocardin ausschließlich in Herz- und glatten Muskelzellen exprimiert wird, kommen MRTF-A und B ubiquitär vor. MRTF-A (auch MKL-1 oder MAL) ist dabei in den meisten Zellen der prädominierende Typ und aktiviert SRF stärker als MRTF-B [142]. Die folgenden Ausführungen sprechen vereinfacht von „MRTF“, leiten sich aber aus den fundierteren Erkenntnissen über „MRTF-A“ ab und sind nicht ohne weiteres auf „MRTF-B“ übertragbar.

MRTFs haben die Eigenschaft, über drei N-terminal gelegene RPEL-Motive an monomeres Aktin (G-Aktin) zu binden. Weitere Domänen sind wichtig für die SRF-Interaktion (B1 und Q), Zielgenspezifität (SAP), Homo- und Heterodimerisierung (LZ) und Aktivierung der Transkription (TAD) [143]. Liegt eine maximale Beladung von MRTF mit fünf G-Aktinen vor, ist MRTF im Zytosol inaktiviert und kann nicht über eine Bindung an Importin α/β in den Zellkern translozieren. Kommt es jedoch zu einer Polymerisierung von G-Aktin zu filamentösem Aktin (F-Aktin) durch mechanische oder humorale Stimulation einer Zelle, wird MRTF freigegeben und dessen Translokation in den Zellkern ermöglicht. Nur bei geringen G-Aktin Konzentrationen kann also eine MRTF-vermittelte SRF-Aktivierung erfolgen [144]. Da Aktinmonomere aber auch nukleär vorliegen, kann es auch dort zu einer Bindung an MRTF kommen und damit die Inaktivierung und sogar der nukleäre Export von MRTF induziert werden [145]. In ruhenden Zellen, in denen hohe G-Aktin Konzentrationen (nukleär und im Zytoplasma) üblich sind, liegt MRTF daher hauptsächlich inaktiviert im Zytosol vor.

Verschiedene Signale bewirken eine Zellaktivierung über Aktinpolymerisierung und regulieren damit indirekt auch die intrazelluläre Lokalisation und Funktion von MRTF [146]. Am besten erforscht in der Regulierung der MRTF-Aktivität ist die Familie der Rho-GTPasen (RhoA, Rac1, Cdc42). RhoA führt über die Stimulation der Rho-assoziierten Kinase (ROCK) zur Aktivierung von Profilin und mDia, die die Polymerisierung von Aktin fördern. Dadurch wird die Dissoziation von G-Aktin und MRTF induziert und MRTF für den nukleären Import freigegeben. Der Effekt wird aufrechterhalten mithilfe der ebenfalls Rho-abhängigen LIM Kinase. Diese inhibiert eine sofortige Depolymerisierung des gebildeten F-Aktin durch Cofilin [144].

Es gibt zahlreiche extra- und intrazelluläre Stimuli, die die Aktivität von MRTF entweder Rho-abhängig oder -unabhängig regulieren, sei es über Zellrezeptoren, biomechanische Kräfte oder Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte [147, 148]. Ein etwas neuerer, Rho-

assoziierter Faktor, der vor allem in Muskelzellen zur Bildung von F-Aktin beiträgt und damit einen Einfluss auf MRTF ausübt, ist STARS [149]. Auch bekannte Wachstumsfaktoren wie TGF- β oder PDGF-B, Integrine und kontraktile Substanzen wie Angiotensin II, Endothelin-1 und Spingosin-1-Phosphat konnten mit Aktindynamik und der MRTF/SRF Achse in Verbindung gebracht werden [150, 151]. Zu den Rho-unabhängigen Mechanismen sei gesagt, dass MRTF direkt über MAP Kinasen (ERK-1/2) im Zellkern phosphoryliert werden kann, wodurch der nukleäre Export und damit die Inaktivierung von MRTF gefördert werden [152].

1.5.2 Thymosin-beta-4 (T β 4) und MRTF

Ein für unsere Gruppe sehr wichtiges Aktin-regulierendes Peptid, das die MRTF/SRF-Achse aufgrund eines möglichen therapeutischen Potentials in der Neovaskularisierung interessant erscheinen ließ, ist Thymosin-beta-4. T β 4 besteht aus 43 Aminosäuren, kommt wie MRTF ubiquitär vor und ist das häufigste β -Thymosin in den meisten Geweben von Säugetieren [153]. Es bindet G-Aktin, verhindert dessen Polymerisierung und kann sogar die Depolymerisierung von F-Aktin fördern [154]. Damit übt T β 4 unmittelbar Einfluss auf die MRTF-Kaskade aus, indem es mit MRTF um die Bindung an freies G-Aktin konkurriert. Hohe T β 4-Konzentrationen resultieren also in vermehrt ungebundenem MRTF und folglich dessen nukleärem Import und Aktivierung von SRF [155]. Diese Entdeckung lässt vermuten, dass T β 4 seine physiologische Wirkung via MRTF entfaltet.

T β 4 zeigt bedeutende Eigenschaften *in vitro* und *in vivo*, die die Erforschung des nachgeschalteten Signalweges empfehlenswert machen. Zunächst konnten zahlreiche Untersuchungen eine anti-inflammatorische Komponente aufdecken. Sowohl in der Zellkultur [156] als auch im LPS-induzierten Sepsismodell beobachtete man eine Inhibition und Reduktion von Entzündungsmediatoren mit verbessertem Überleben im Tierversuch [157]. Im Ischämie-Reperfusion-Modell des Schweineherzens konnte unsere Gruppe zudem einen kardioprotektiven Effekt von T β 4 herausarbeiten [158]. Des Weiteren scheint T β 4 eine wichtige Rolle in der Neovaskularisierung zu spielen [159]. Neben ersten positiven Ergebnissen in Angiogenese-Assays [160] erreichte T β 4 u.a. durch die Stabilisierung von HIF-1 α eine gesteigerte Expression von VEGF und zeigte damit einen starken pro-angiogenen Effekt [161]. Weitere Untersuchungen konnten ebenso einen positiven Effekt von T β 4 auf die Gefäßmaturierung über die Modulation der TGF- β Kaskade offen legen [162]. Schließlich konnten Vorarbeiten unserer Gruppe zeigen, dass T β 4 das Potential hat, eine therapeutische Neovaskularisierung im lebenden Organismus zu induzieren und dass die PI3K/Akt Achse

hierfür von Bedeutung ist [163].

Die Interaktion mit G-Aktin legt nahe, dass MRTF ähnliche Effekte in der Gefäßneubildung erzielen könnte wie T β 4, jedoch gibt es bislang kaum Daten in diesem Zusammenhang. Erste Experimente weisen allerdings auf die Bedeutung von MRTF für die Gefäßhomöostase hin [164].

1.5.3 Der „Serum Response Factor“ (SRF) und dessen Zielgene

Wie bereits mehrfach erwähnt, geht die Aktivierung von MRTF mit einer Bindung an SRF und konsekutiver transkriptioneller Aktivität einher. SRF gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die die stark konservierte MADS-Box enthalten. Diese Domäne vermittelt alle wichtigen molekularen Funktionen, nämlich Homodimerisierung, DNA-Bindung und Bindung von Ko-Faktoren [165]. SRF kommt ubiquitär vor und bindet als Homodimer mit hoher Affinität an eine palindromische DNA-Sequenz, genannt CArG-Box, die Teil des „Serum Response Element“ (SRE) ist. Abhängig vom jeweiligen Ko-Faktor interagiert SRF mit unterschiedlichen Promotoren und reguliert dadurch die spezifische Transkription von insgesamt über 200 Zielgenen [166].

Ko-Faktoren können gewebespezifisch oder über verschiedene Signalkaskaden bestimmte Transkriptionsmuster induzieren, wobei zwei besonders relevant sind. Zum einen wird die Expression von „Immediate Early Genes“ (IEG), z.B. c-fos und egr-1, vor allem durch „ternary complex factors“ (TCF) stimuliert. TCFs werden über den MAPK-Signalweg phosphoryliert und binden dann kompetitiv an SRF. Daraufhin werden IEGs rasch und kurz als Antwort auf eine zelluläre Stimulation, die keiner Proteinsynthese bedarf, transkribiert und führen damit eine ruhende Zelle aus der G₀-Phase zurück in den Zellzyklus [167]. Zum anderen kompetitieren MRTFs, die bereits detailliert besprochen wurden, um die SRF-Bindestelle. Sie sind hauptsächlich für die Transkription von kontraktile und zytoskelettalen Genen verantwortlich und spielen damit eine unverzichtbare Rolle für Prozesse wie Zellzyklus, Adhäsion und intrazellulärer Transport sowie Migration, Teilung, Wachstum und Differenzierung von Zellen. Da MRTFs auch die Expression von G-Aktin fördern, wird in einer auto-regulatorischen Schleife eine übermäßige Aktivierung von SRF verhindert. Ganz allgemein fördern MRTFs also einen motilen und kontraktile Zelltypus, nicht nur in Muskelzellen [144]. In glatten Gefäßmuskelzellen wurde die Bedeutung der MRTF/SRF-Kaskade bereits eingängig veranschaulicht [151]. Die beschriebenen Effekte legen die Vermutung nahe, dass möglicherweise MRTF über SRF auch andere Zellen des Gefäßsystems

reguliert und damit potentiellen Einfluss auf Prozesse der Gefäßneubildung haben könnte [168].

CCN-1 (CYR61) und CCN-2 (CTGF), die bekanntesten Mitglieder der CCN-Familie matrizellulärer Proteine, stehen unter dem Zielgenprofil des MRTF/SRF-Signals [169] und erwecken besonderes Interesse, da sie bereits im Zusammenhang mit Mechanismen der Gefäßmodulation beschrieben wurden. CCN-1 konnte bereits starke pro-angiogene Effekte *in vitro* und *in vivo* zeigen, die sogar das Potential von VEGF überstiegen [170]. Die Hauptwirkung scheint über das Integrin $\alpha\beta 3$ vermittelt zu werden, welches vor allem für die Prozesse Adhäsion, Migration und Proliferation von Endothelzellen essentiell ist. Jedoch kann CCN-1 seine Wirkung auch indirekt über eine Expressionssteigerung von VEGF entfalten [171]. CCN-2 hingegen scheint essentiell für Prozesse der Gefäßmaturierung zu sein [172]. Während bei Genablation von CCN-2 glatte Gefäßmuskelzellen lediglich eine abnorme Morphologie zeigten, war der Perizytenbesatz kleiner Gefäße deutlich vermindert. CCN-2 hemmt die Perizytenrekrutierung vermutlich über eine Herabregulierung von Ang-1 und PDGF-B und die Basalmembranproduktion durch Verminderung von Fibronectin [173].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der Gefäßdestabilisierung im Prozess der Gefäßneubildung zu analysieren. Die Untersuchungen erfolgten am Modell der chronischen Hinterlaufischämie des Kaninchens. Die Induktion der Neovaskularisierung sollte mit dem Ko-Transkriptionsfaktor MRTF-A versucht werden, der für diesen Zweck noch nicht evaluiert wurde.

Zunächst sollte überprüft werden, ob MRTF-A dazu in der Lage ist, eine Verbesserung der Perfusion ischämischen Muskelgewebes hervorzurufen. Anschließend sollte durch Ko-Applikation von Ang-2 ein potentieller Effekt von MRTF-A auf die Perizyten inhibiert werden, um zu untersuchen inwieweit die übrigen Aspekte der Gefäßneubildung dadurch beeinträchtigt werden.

Des Weiteren sollte eine therapeutische Neovaskularisierung vor allem durch Modulation der Perizytenrekrutierung nach dem Prinzip frühe Destabilisierung durch Ang-2 und konsekutive Stabilisierung durch Ang-1 erfolgen. Dieses Konzept sollte dann in Kombination mit MRTF-A der Augmentation eines möglichen therapeutischen Effektes dienen.

Parallel zu den beschriebenen Versuchen sollten AAVs als Vektoren in der Gentherapie

validiert werden. Ebenso wurde das tet-off System als Werkzeug einer gezielten Genexpression evaluiert.

Schließlich sollten auch potentielle unerwünschte Nebenwirkungen einer MRTF-A-vermittelten Therapie, wie Fibrose oder Hypertrophie, bei den Untersuchungen nicht zu kurz kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Benzonase [®] Nuclease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Cäsiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Direct Red 80 (Sirius Red)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
EDTA	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Eisessig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Ethanol \geq 99,9 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Formaldehydlösung 37%	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Isopropanol 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (3M)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
RNALater [™]	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Stickstoff (flüssig)	Linde AG, Pullach, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Triton [®] X-100	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trockeneis	Linde AG, Pullach, DE
Trypsin/EDTA 0,05% / 0,02%	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Xylol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE

2.1.2 Geräte

C-Bogen, Exposcop 8000	Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg, DE
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isernhagen, DE
Flow MSC 12	Jouan GmbH, Unterhaching, DE
Gefrierschrank (-80° C) Colora UF80-450S	Colora Messtechnik GmbH, Lorch, DE
Inkubator CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen, DE
Inkubator EB 55	Jouan GmbH, Unterhaching, DE
Kontrastmittel-Injektionspumpe	Harvard Apparatus GmbH, March, DE
LABOPORT® Vakuumpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg, DE
Leica CM3050 S Kryotom	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss, Jena, DE
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, DE
Mikroskop-Kamera AxioCam HRC	Carl Zeiss, Jena, DE
Milli-Q® Reinstwassersystem	Merck KGaA, Darmstadt, DE
MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
PCR Thermocycler	Perkin Elmer Germany GmbH, Hamburg, DE
Perfusor® segura	B. Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Refraktometer	PCEDeutschland GmbH, Meschede, DE
Rotor: SW 28 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Rotor: Type 70 Ti	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Schermaschine Favorita II	Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Schüttler	Bibby Scientific Ltd., Stone, UK
Sonikator	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Thermostat Typ K2 MGW	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, DE
Ultraschallbad (Sonorex TK52H)	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, 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
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage: Sartorius CP64-OCE	Sartorius AG, Göttingen, DE
Zentrifuge: Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co, Tuttlingen, DE

2.1.3 Histologie

Antibody Diluent	Dako GmbH, Hamburg, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DE
Einbettkassetten	Simport Scientific Inc., Beloeil, QC, CA
Färbekasten (durchsichtig)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
Entellan® Eindeckmedium	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Färbekästen (lichtundurchlässig)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

Hydrophober Stift (Dako® Pen)	Dako GmbH, Hamburg, DE
Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DE
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, DE
PIPETMAN® Pipetten	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tissue Tek® O.C.T. Tm Compound	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, DE
VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.1.4 Zellkultur und Laborbedarf

70 Ti Quick-Seal® Ultracentrifuge Tube	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit	Merck KGaA, Darmstadt, DE
DMEM	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Eppendorfgefäße	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Falcon Blue Max 15 ml	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Falcon Blue Max 50 ml	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Fötales Bovines Serum (FBS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
PCR-Tubes & Strips	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Penicillin/Streptomycin, 100-fach	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Präzisionsküvetten	Hellma GmbH & Co KG, Mühlheim, DE
SW-28 Tubes	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
ULTRA-TURRAX® Tubes	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
Zellkulturflaschen 25cm ²	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Zellkulturschalen, 147,8 cm ²	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Zellschaber, 25cm, Klinge 17cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE

2.1.5 Operationszubehör

Adrekar® (Adenosin 6mg/2ml)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, DE
Atropinsulfat 0,5mg/ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Bepanthen® Augen und Nasensalbe	Bayer Vital, Bayer Leverkusen, DE
Desinfektionsmittel Cutasept®	Bode Chemie, Hamburg, DE
Doxycyclin 100	1 A Pharma GmbH, Oberhaching, DE
Führungsdraht (Größe 0,014)	Cordis Corp., Miami, FL, USA
Futter Spezialdiät Kaninchen	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Gentamicin 80mg/2ml SF	ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Heparin-Natrium (25000 I.E. / 5ml)	ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Iomeprol-Kontrastmittel (Imeron® 300)	Bracco Imaging Deutschland GmbH, Konstanz, DE
Katheter (4 French)	Cordis Corp., Miami, FL, USA
Ketaminhydrochlorid	Inresa, Freiburg, DE

Kompressen, Verband	NOBAMED Paul Danz AG, Wetter/Ruhr, DE
Leukoplast® Hospital 1,25/5cm x 9,2 m	BSN medical GmbH, Hamburg, DE
Ligaturen: Perma-Hand Seide 4-0 (12x0,45m)	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DE
NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Nahtmaterial: Supolene® DS40, 3.5 metric	Resorba, Nürnberg, DE
Operationsinstrumente	Aesculap AG, Tuttlingen, DE
Perfusorleitung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Povidon-Jod (Braunol®)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
PVK 24 G (BD Neoflon™ 24G*0,75)	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Röntgenplakette	Helmholtz Zentrum München, DE
Röntgenschutzbekleidung	MAVIG GmbH, München DE
Schleuse (Radifocus® Introducer II, 4F)	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, DE
Skalpelle: Feather® Disposable Scalpel No. 20/22	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
Sterican® Einmalkanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Sterile Handschuhe Flex Plus	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
Stethoskop	euromed GmbH, Passau, DE
Tramadolhydrochlorid (Tramal®)	Grünenthal Ges. m. b. H., Brunn am Gebirge, AT
Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE

2.1.6 Kits

DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DE
Green Supermix iQ™ SYBR®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Reverse Transcription System	Promega GmbH, Mannheim, DE
RNeasy® Mini Kit 50	Qiagen GmbH, Hilden, DE
FastStart TaqMan® Probe Master	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, DE
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

2.1.7 Software

Axiovision, Version 4.8	Carl Zeiss, Jena, DE
ImageJ, Version 1.50i	National Institute of Health, Bethesda, MD, USA
MyIQ™ Optical, Version 1.0.410	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Office Professional Plus 2013	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, DE
Photoshop CS6	Adobe Systems, San José, CA, USA
SPSS, Version 22.0.0.0	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, DE

2.1.8 Lösungen und Puffer

Bouin´sche Lösung:

Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung (1,22 %)	15 ml
Formollösung (37 %)	5 ml
Eisessig	1 ml
<u>pH-Wert von 1,5 bis 2</u>	

PBS-Puffer:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
NaH ₂ PO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua dest.	1000 ml
<u>pH-Wert von 7,4</u>	

TMN-Puffer:

Tris	50 mM
MgCl ₂	1 mM
<u>pH-Wert von 7,4</u>	

2.1.9 Primer

<u>Zielgen:</u>	<u>Oligonukleotid forward:</u>	<u>Oligonukleotid backward:</u>
GAPDH	AATCAACGGCACAGTCAAG	ATGGTGGTGAAGACACCAGT
MRTF-A	AATCCATGGGTCGACGGTATCGAT	ATACCATGGTCAGGCACCGGGCTT
Ang-2	TCGAATACGATGACTCGGTG	GTTTGTCCCTATTTCTATC
CCN1 (CYR61)	GCTAAACAACACTCAACGAGGA	TCTGACTGAGCTCTGCAG
CCN2 (CTGF)	CCCTAGCTGCCTACCGACT	CATTCCACAGGTCTTAGAACAGG
BGH	TCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT	TGGGAGTGGCACCTTCCA

2.1.10 Antikörper und Lektine

		Verdünnung:
Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor® 594 conjugate	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DE	1:200
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor® 488 conjugate	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DE	1:200
Mouse Anti-CD31 (JC/70a)	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Rabbit Anti-NG2	Merck KGaA, Darmstadt, DE	1:200
Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 488 conjugate	Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, DE	1:50

2.2 Produktion rekombinanter adeno-assoziiertes Viren

2.2.1 Kultivierung der verwendeten Zelllinie

Zur Herstellung rekombinanter adeno-assoziiertes Viren wurden HEK (Human Embryonic Kidney)-293 Zellen verwendet. Diese hatten sich aufgrund der Zusammensetzung ihres Genoms mit adenoviralen Anteilen als besonders geeignet herausgestellt.

Die Zellen wurden auf Zellkulturplatten in einem Gemisch aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium abgesaugt und die Zellen gesplittet. Nach Waschen mit 1 ml PBS folgte die zwei-minütige Inkubation in 1 ml Trypsin bei 37 °C, um ein Loslösen der Zellen von der Kulturflasche zu ermöglichen. Anschließend wurde die Trypsin-Zell-Suspension auf Falcons aufgeteilt, mit 8 ml Kulturmedium vermischt und für fünf Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpräzipitat in Kulturmedium wieder aufgelöst und erneut in einer Zellkulturflasche bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Tripeltransfektion von HEK293-Zellen

Um die Zellen zur Produktion des gewünschten AAV-Vektors zu nutzen wurde die Tripeltransfektionsmethode angewandt. Hierfür ist es nötig drei Plasmide in einer Zelle zusammenzuführen.

Damit es zu einer intrazellulären Vermehrung des viralen Vektors *in vitro* kommen kann ist zunächst ein sogenanntes Adenovirus-Helferplasmid erforderlich, da adeno-assoziiertes Viren allein nicht in der Lage sind sich zu replizieren. Dieses Plasmid codiert die relevanten

Informationen für adenovirale Gene und ist damit für die Herstellung der Replikationsfähigkeit des produzierten AAVs essentiell [174, 175].

Des Weiteren wird ein Transplasmid genutzt, um typische AAV-Sequenzen in die Zelle einzuschleusen. Es codiert ebenfalls für die Rep- und Cap-Gene, die für Replikation und Verkapselung wichtig sind. Für die Versuche wurden eine AAV2 Rep und eine AAV9 Cap Sequenz verwendet. So gelang es ein Hybridvirus vom Typ rAAV 2/9 herzustellen, welches sich als besonders geeignet für die Transduktion von Muskelzellen herausstellte [176, 177].

Als letztes wird ein Plasmid benötigt, das Cisplasmid, das das Transgen enthält (in dieser Arbeit LacZ, MRTF-A, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2 und Tet-off Angiopoietin-2), sowie die Inverted Terminal Repeats (ITRs) und einen CMV-Promotor für die Transkription.

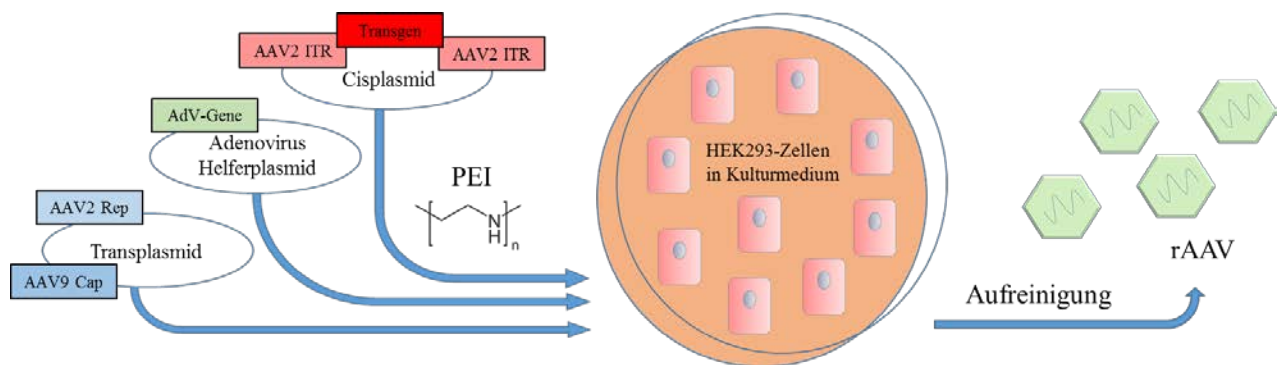


Abbildung 1: grafische Übersicht der Tripeltransfektion von HEK293-Zellen mit Polyethylenimin (PEI) zur Herstellung rekombinanter adeno-assoziiierter Viren (rAAV).

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die HEK293-Zellen zunächst auf Zellkulturschalen ($147,8 \text{ cm}^2$) verteilt und solange kultiviert und gesplittet bis auf 50 Schalen eine Konfluenz von 70-80% entstand. Zwei Stunden vor Hinzugabe der Transfektionslösung wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches, serumfreies Medium ausgetauscht.

Zur Herstellung des Transfektionsgemisches mussten zuerst 40 ml serumfreies Medium in einem 50 ml Falcon vorgelegt werden. Folgende Plasmide wurden anschließend hinzugefügt: 1300 μg Adenovirus Helferplasmid (pA Δ F6) und jeweils 650 μg Transplasmid (p600) und Cisplasmid.

Die Lösung wurde gevortext und gleichmäßig auf 4 Falcons verteilt. Zusätzlich wurden pro Tube 15 ml des serumfreien Mediums beigemischt sowie 1300 μg Polyethylenimin (PEI) hinzu pipettiert. PEI ist ein Polymer, das die Endozytose durch die negativ geladene

Zellmembran fördert, indem es positiv geladene DNA-Partikel umschließt [178] Erneutes Vortexen und 15- minütige Inkubation bei Raumtemperatur schlossen die Produktion der Lösung ab, die sodann in 2,1 ml-Portionen auf den Platten verteilt werden konnte. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank wurde dem Medium 5 ml DMEM mit 50% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin beigefügt (siehe Abbildung 1).

2.2.3 Ernte und Aufreinigung der Vektoren

Nach Beginn der Transfektion war ein Abwarten von 24 Stunden bis zur erneuten Substitution des Zellmediums erforderlich. 48 Stunden nach dem Austausch war dann ein Ernten der Viren möglich. Dazu musste das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem Schaber von der Platte gelöst werden, um sie dann in ein Falcon zu überführen. Bei der 15-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C entstand ein Zellpellet, welches über Nacht bei -80 °C konserviert wurde.

Für die ersten Arbeitsschritte der Aufreinigung musste das Zellaggregat bei 37 °C für zehn Minuten wieder aufgetaut und anschließend in 27 ml TMN-Puffer resuspendiert werden. Die Zellsuspension wurde dann auf 35 ml aufgefüllt, auf Eis gelegt und im Eiswasserbad zur Lösung der Zellen 3 x 30 Sekunden lang bei „output“ 5 und 30% sonifiziert. Um freie DNA- und RNA-Stücke abzubauen wurden 3µl Benzonase[®] bis zu einer Endkonzentration von 25 U/ml der Suspension beigemischt und diese anschließend bei 37 °C für 20 Minuten lang inkubiert. Dabei wurde der Tube alle fünf Minuten gewendet. Als nächstes erfolgte der Zellaufschluss durch Zugabe von 1,25 ml Desoxycholsäure 10 % mit anschließender 10-minütiger Inkubation bei 37 °C und weiteren 15 Minuten auf Eis. Um das nun entstandene Zelllysate zu reinigen folgte die Zentrifugation mit 4000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten sowie die Überführung des Überstands in ein neues steriles Falcon.

Für die Aufreinigung der Viruspartikel kamen die Ultrazentrifugation und Dichtebestimmung über einen Caesiumchloridgradienten zum Einsatz. Hierzu wurden zuerst 0,454 g Caesiumchlorid (CsCl) pro Milliliter abpipettiertem Überstand bis zu einem Endvolumen von 32-34 ml beigemischt. Um einen 2-Phasen-Caesiumchloridgradienten herzustellen wurden anschließend 9 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,41 ρ) in 2 SW-28 Tubes vorgelegt und weitere 9 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,61 ρ) mit Vorsicht unter die erste Schicht pipettiert. Danach wurde das Zelllysate gleichmäßig (je 16-17 ml Lysat) auf beide Tubes verteilt, ohne die 2 Phasen zu durchmischen. Wichtig bei diesem Ansatz ist, dass die durchschnittliche Dichte des CsCl-Gradienten ungefähr der Dichte der Viruspartikel entspricht. Für die nächsten 18-20 h wurde

eine Ultrazentrifugation bei 25.000 rpm und 15 °C durchgeführt, was ein Herabsinken der Viruspartikel zur Folge hatte. Am Ende der Zentrifugation musste jeder Ansatz in 1 ml Portionen auf Eppendorf-Gefäße verteilt werden.

Zur Identifikation AAV-Partikel haltiger Tubes wurden 5 µl pro Tube abpipettiert und der Refraktionsindex mithilfe eines Refraktometers gemessen. Bei AAV-haltigen Fraktionen betrug dieser 1,362 – 1,373. Nur diese Proben wurden weiter verwendet, der Rest wurde verworfen. Die Fraktionen im gewünschten Refraktionsbereich wurden zusammen geführt und in zwei 70 Ti-quick-seal Röhrchen verteilt. Bei Bedarf wurde mit CsCl (Dichte 1,41 ρ) aufgefüllt. Nach Verschluss der Röhrchen wurde erneut ultrazentrifugiert, diesmal für 20-24 Stunden bei 15 °C und 60.000 rpm.

Im Anschluss wurde 1 ml aus jedem verschlossenen Röhrchen mit einer 20G Nadel aspiriert und auf zwei Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Nach dem Eröffnen der Tubes mit einem Skalpell wurden dann jeweils 500 µl des Zentrifugats in Eppendorf-Gefäße abpipettiert. Es wurde erneut der Refraktionsindex der einzelnen Fraktionen bestimmt und wieder führten gemessene Werte außerhalb des oben genannten Zielbereichs zum Aussortieren der Probe. Eine finale Ultrazentrifugation unter zuletzt genannten Bedingungen wurde durchgeführt und der Inhalt der Röhrchen erneut in 500 µl Schritten portioniert. Für die letzte Refraktionsmessung wurden nur noch 1,364 – 1,371 als Zielbereich toleriert. Nur solche Proben wurden beibehalten und schließlich in einem Falcon vereinigt.

Um die Aufreinigung der Viren abzuschließen war letztlich die Elimination des Caesiumchlorids erforderlich. Es wurden Amicon Ultra-15 Zentrifugationsfilter verwendet, die zuerst mit PBS benetzt und anschließend mit der virushaltigen Lösung sowie 4-5 ml PBS aufgefüllt wurden. Das Endvolumen von ca. 12 ml kam bei 3000 rpm für 15 Minuten in die Zentrifuge. Es entstand ein Konzentrat aus etwa 2 ml, das mit 12 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich auf 2 ml konzentriert wurde [96, 179].

2.2.4 Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der Viren in der Lösung zu messen wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (rt-PCR) angewandt. Hierfür war es nötig den gesuchten Titer des AAV mit einer standardisierten seriellen Verdünnungsreihe zu vergleichen.

Zur Vorbereitung der PCR wurde zunächst ein Verdau der DNA mithilfe des DNase Amplification Grade Kit vorgenommen. Hierfür wurden 10 µl der virushaltigen Lösung, 10 µl DNase-Puffer, 4 µl DNase und 76 µl H₂O miteinander vermischt und 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. 2 µl 25 mM EDTA wurden daraufhin beigefügt und dienen der Inaktivierung der DNase. Nach 10-minütiger Inkubation bei 65 °C wurde die Probe auf Eis gelegt.

Als nächstes diente ein CMV-Vektor Plasmid der Erstellung einer Standardserie für die qPCR. Diese setzte sich aus 4 seriellen Verdünnungen von 0,001 ng bis 1 ng auf einer logarithmischen Skala zusammen. Die Standardproben wurden jeweils mit einer AAV-Probe mit unbekanntem Titer und einer Verdünnung von entweder 1:100 oder 1:1000 in einem PCR-Reaktionsgefäß kombiniert. Zusätzlich wurde in jedes Reaktionsgefäß der TaqMan-Mix und ein Primer für das virusspezifische BGH-Gen hinzugefügt. Sodann wurde die quantitative Echtzeit-PCR ausgeführt und eine Standardkurve mithilfe der PCR-Kurven des Standards erstellt. Diese konnte nun zum Ablesen des gesuchten AAV-Titers genutzt werden.

2.3 Genexpression mittels Tet-off System

Bei einem Vektor wurde das Transgen mit einem Tet-off System kombiniert (Tet-off Angiopoietin-2). Dadurch wurde die gezielte Steuerung der Expression dieses Gens durch die Gabe eines tetrazyklinhaltigen Antibiotikums möglich. Die Produktion des Vektors erfolgte gemäß Kapitel 2.2.

Das Tetrazyklin (Tet) System nutzt das ursprünglich in Bakterien befindliche Tetrazyklin-Resistenz Operon, um Gene an- und auszuschalten. Dieser Prozess ist reversibel, was das System interessant für gezielte und zeitlich limitierte Gentherapie macht. Kernstück des sogenannten Tet-off Systems ist das Fusionsprotein tTA, bestehend aus der DNA-bindenden Domäne TetR und dem Herpes-simplex-Virus (HSV) Transaktivator Protein VP16. Die Expression von tTa kann durch einen Promotor gesteuert werden, sodass ein Zell-spezifischer Einsatz möglich wird. tTa selbst bindet an einen Promotor mit sieben Tet-Operator Sequenzen (TetO7) und aktiviert diesen. TetO7 ist seinerseits an einen Zytomegalievirus (CMV) Promotor gekoppelt, welcher im beschriebenen Fall ein Ablesen des Zielgens induziert. In Anwesenheit von Tetrazyklinen, vor allem dem stabilen Doxyzyklin, wird tTA jedoch abgefangen und kann nicht mehr an die sieben TetO-Domänen binden, sodass das gewünschte Gen inaktiviert bleibt [180].

Im Tet-on System hingegen wird analog eine rekombinante Variante des tTA-Proteins (rtTA) verwendet, sodass die Bindung an ein Tetrazyklin obligat für die Genexpression wird [181].

Das Tet System wurde seit der Erstbeschreibung auch in Kombination mit adeno-assoziierten

Viren *in vitro* mehrfach bestätigt und u.a. im ZNS und Skelettmuskel von Ratten mit Erfolg angewandt [182, 183].

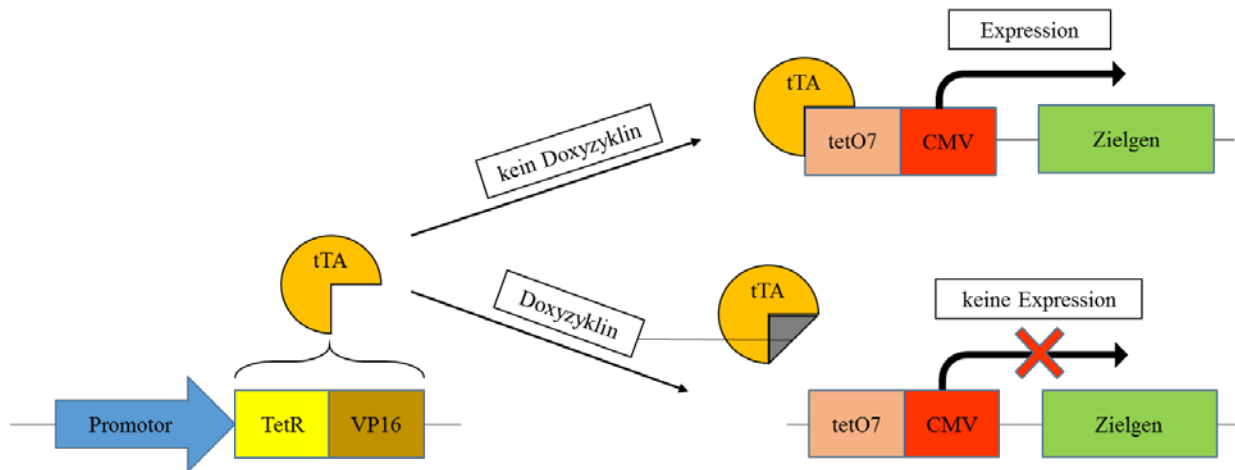


Abbildung 2: schematische Darstellung des Tet-off Systems in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin (modifiziert nach Kohan [184]).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tet-off System in Kombination mit dem Transgen Angiopoietin-2 (Ang-2) in zwei Versuchsgruppen verwendet. In der einen Gruppe wurden an Tag 0 jedem Tier 5×10^{12} Viruspartikel vom Typ rAAV.Tet-off Ang-2 und 5×10^{12} vom Typ rAAV.MRTF-A injiziert. In der anderen Gruppe waren es an Tag 0 ebenso 5×10^{12} Partikel rAAV.Tet-off Ang-2 pro Tier, kombiniert mit 5×10^{12} vom Typ rAAV.Ang-1 an Tag 7. Die Inaktivierung der Überexpression von Ang-2 erfolgte in beiden Gruppen durch Doxyzyklingabe p.o. über das Trinkwasser durchgehend ab Tag 14.

2.4 Kaninchenmodell der chronischen Hinterlaufischämie

2.4.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich ausschließlich um weibliche, ca. 2,5 kg schwere Kaninchen der Rasse New Zealand White (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, DE). Den Tieren wurde nach Ankunft eine Frist von ca. 4 Tagen bis zum Versuchsbeginn gewährt, um sich an die neue Umgebung zu akklimatisieren. Die Haltung erfolgte in Boxen zu jeweils 4

Tieren desselben Wurfs, um territorialen Streitigkeiten vorzubeugen. Die Tiere hatten stets Zugang zu Futter und Wasser sowie einem mit Tageslicht beleuchteten Außenbereich, um einen natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus zu gewährleisten.

Die Haltung und die Durchführung der Versuche fanden am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin in München statt. Der Umgang mit den Tieren erfolgte gemäß dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Das Versuchsprotokoll wurde vom bayerischen Tierschutz- und gebrauchskomitee genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-106-10).

2.4.2 Versuchsaufbau

Die chronische Ischämie des Kaninchenhinterlaufs ist ein seit Jahren mit Erfolg angewandtes Modell unserer Arbeitsgruppe, das mehrfach publiziert wurde [110, 185-187]. Der allgemeine Versuchsaufbau ist der Übersicht wegen in Abbildung 3 dargestellt.

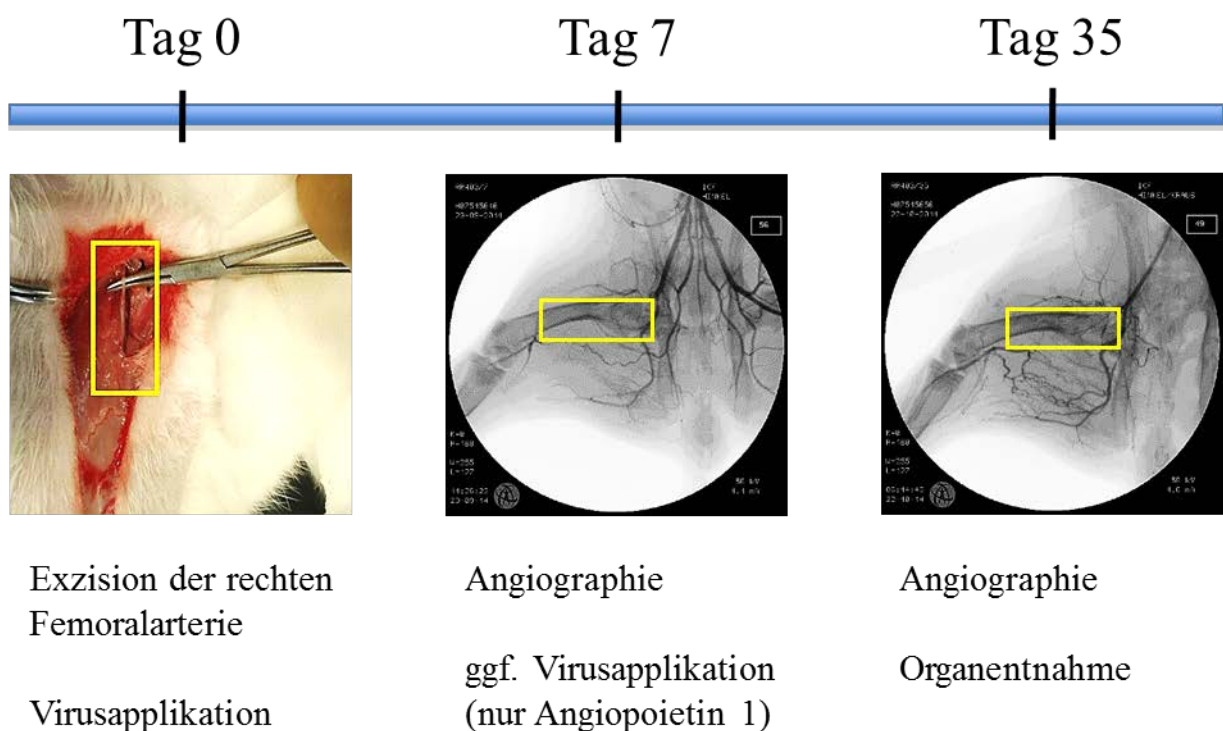


Abbildung 3: Übersicht des Versuchsaufbaus zur chronischen Hinterlaufischämie beim Kaninchen. Die gelbe Markierung bei Tag 0 zeigt die zu exzidierende rechte A. femoralis *in situ*. Die Markierungen bei Tag 7 und 35 weisen auf das fehlende Gefäß in späteren angiographischen

Aufnahmen hin. Die Aufnahmen zeigen außerdem die beginnende Ausbildung kollateraler Kreisläufe an Tag 7 und die vollständig ausgeprägte Kollateralisierung an Tag 35.

Allen Tieren wurde zu Beginn die rechte Femoralarterie entfernt. Dabei wurde nach einem standardisierten Schema vorgegangen, das in Kapitel 2.4.4 näher beschrieben wird. Sodann wurden die Virusvektoren unmittelbar nach der Exzision - außer rAAV.Ang-1 - gemäß dem Versuchsprotokoll (siehe Tabelle 3 und Kapitel 2.4.5) intramuskulär in den ischämischen Lauf injiziert. Zur Evaluation der organismuseigenen Reperaturleistung wurde an Tag 7 eine Baseline-Angiographie angefertigt, die nach der Beschreibung in Kapitel 2.4.6 durchgeführt wurde. Diese diente später als Grundlage für die Auswertung von Kollateralenwachstum und Blutflussgeschwindigkeit (Kapitel 2.4.8 und 2.4.9). Ebenso wurde das Virus mit dem Transgen Angiopoietin-1 an diesem Tag in der jeweiligen Versuchsgruppe appliziert. Zum Ende des Versuchs wurde erneut eine Angiographie auf dieselbe Weise wie an Tag 7 angefertigt, diesmal zur Bewertung der verschiedenen Behandlungsschemata. Im Anschluss wurde das Tier getötet und dessen Organe für weitere histologische und molekularbiologische Analysen entnommen (Kapitel 2.4.7).

Versuchsgruppe	Behandlung	Anzahl
Kontrolle (LacZ)	Intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.LacZ an Tag 0	n = 6
MRTF-A	Intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.MRTF-A an Tag 0	n = 6
MRTF-A + Ang-2	Intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.MRTF-A an Tag 0 + intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.Ang-2 an Tag 0	n = 4
MRTF-A + Tet-off Ang-2	Intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.MRTF-A an Tag 0 + intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.Tet-off Ang-2 an Tag 0 + Doxzyklin 25 mg/d per os ab Tag 14	n = 4
Tet-off Ang-2 + Ang-1	Intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.Tet-off Ang-2 an Tag 0 + intramuskuläre Injektion von 5×10^{12} rAAV2/9.Ang-1 an Tag 7 + Doxzyklin 25 mg/d per os ab Tag 14	n = 4

Tabelle 3: Versuchsgruppenübersicht mit Behandlungsregimen und Gruppengröße

2.4.3 Präoperative Maßnahmen und Narkose

Die Einleitung der Tiere erfolgte im Stall mit einem Gemisch aus 1 ml Rompun® 2% (Xylazinhydrochlorid), 2 ml Ketamin Inresa® (Ketaminhydrochlorid) und 0,3 ml Atropinsulfat

intramuskulär in den linken Hinterlauf. Sobald das Tier schlief wurde es in den Operationsaal gebracht. Dort wurden zunächst die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen® Augensalbe bedeckt und mit einer in NaCl 0,9% durchtränkten Kompresse verbunden. Danach wurde ein Zugang in die rechte Ohrvene mit einem 24G-PVK gelegt. Über diesen erhielt das Tier die intraoperative Narkose aus 5 ml Rompun® 2%, 8 ml Ketamin Inresa® und 37 ml NaCl 0,9% mittels Perfusor mit einer Geschwindigkeit von ca. 13 ml/h. Während der Intervention wurden Atmung und Herzaktivität regelmäßig auskultatorisch kontrolliert.

2.4.4 Induktion der Ischämie

Für die Exzision der Femoralarterie wurde das Tier auf dem Rücken gelagert und der rechte Schenkel auf der Innenseite gründlich rasiert und desinfiziert. Der Hautschnitt erfolgte nach Testung auf Schmerzreiz bogenförmig vom Ligamentum inguinale über die Adduktorenloge hinweg bis zum Kniespalt. Zur besseren Orientierung konnten hierfür Leistenband und Femoralarterienpuls palpirt werden. Anschließend wurden Muskelfaszie und weiteres Bindegewebe stumpf mittels Overholt präpariert, um das femorale Hauptgefäß und dessen Abgänge aufzusuchen. Für die nachfolgenden Ligaturen der arteriellen Gefäße galt allgemein, diese mit Handseide Stärke 4,0 durchzuführen und möglichst nah beieinander zu setzen (siehe Abbildung 4).

Zunächst wurde die leicht freizulegende oberflächliche A. epigastrica superficialis an Punkt 1 zusammen mit der parallel verlaufenden Vene unterminiert und ligiert. Sodann folgte die Freipräparation der Hauptarterie von Vene und Nerv im Bereich des Ligamentum inguinale. Hierbei waren die teils auffächernden und kreuzenden Fasern des N. femoralis und die dünnwandige V. femoralis zu beachten und zu schonen. Nach erfolgreicher Freilegung folgten die Ligaturen an den Punkten 2-5 der arteriellen Gefäße gemäß Abbildung 4. Hierbei stellte sich als sinnvoll heraus, das Gefäß an den bereits platzierten Fäden zu führen, um die weitere Präparation zu erleichtern, und die Fäden anschließend mit einer Mosquitoklemme aus dem Operationsfeld zu halten. Als nächstes war es nötig, im Bereich des distalen Drittelpunktes des Femurs die Muskulatur längs zu spalten, um in der Tiefe zur Aufzweigung der A. femoralis zu gelangen. Nach gelungener Präparation wurde zunächst das Hauptgefäß an Punkt 6 ligiert, gefolgt von den beiden Ästen A. poplitea an Punkt 7 in der Tiefe und A. saphena - entspricht der A. tibialis anterior beim Menschen - im Verlauf an Punkt 8. Da zusätzliche Abgänge in diesem Bereich keine Seltenheit sind, wurde nach solchen Ausschau gehalten und im Falle eine Ligatur dieser Varianten durchgeführt. Die 9. und letzte Ligatur erfolgte im

Bereich des Kniespalts ebenfalls an der A. saphena, die an dieser Stelle aufgrund des straffen Bindegewebes oftmals schwer von der Vene zu trennen war. Für die anstehende Exzision wurde zunächst die A. saphena, die als natürliche Verlängerung der A. femoralis zu betrachten ist, distal der Ligatur 8 und proximal der Ligatur 9 geklemmt und dargestellt. Sodann erfolgte die Durchtrennung des Gefäßes zwischen Ligaturen und Klemmen. Eine Klemme wurde entfernt und das Exzidat unter vorsichtigen Zug- und Drehbewegungen aus dem Bindegewebe gelöst. Kam es im seltenen ungünstigen Fall zum Abreißen des Gefäßes, musste der Arterienrest im Exzisionskanal aufgesucht und gezogen werden. Die Exzision der Femoralarterienstücks wurde analog gemäß Abbildung 4 durchgeführt [188, 189].

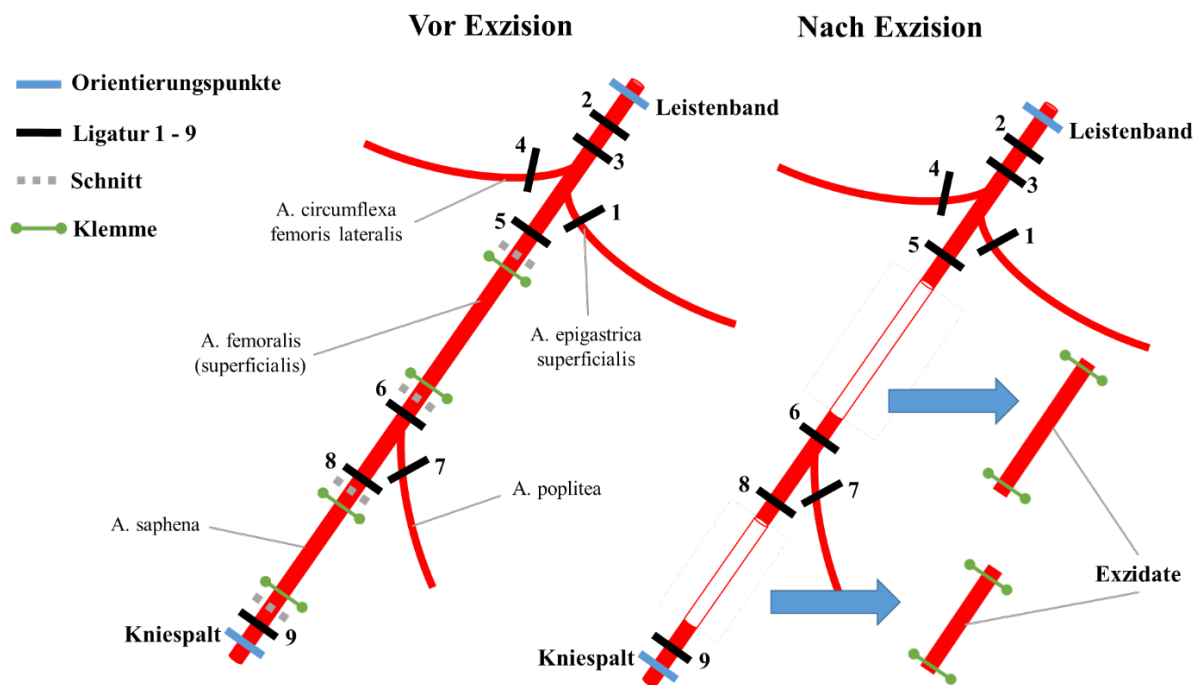


Abbildung 4: schematische Darstellung der Exzision der A. femoralis (und saphena). Das Operationsfeld befand sich zwischen Leistenband und Kniegelenk. Die schwarzen Linien bezeichnen die Lokalisationen der 9 zu setzenden Ligaturen. Nach der Ligatur wurden die späteren Exzidate nahe den Ligaturen geklemmt (grüne Balken), vom restlichen Gefäß abgesetzt (grau gestrichelte Linie) und mit den Klemmen aus dem Situs entfernt.

Um sicher zu gehen, dass kein arterieller Abgang übersehen und während des Ziehvorgangs abgerissen worden war, musste eine Blutung ausgeschlossen werden. Danach folgte eine gründliche Spülung der Wunde mit NaCl 0,9% und die Vernähung der Haut mit Supolene 3.5

als Einzelknopfnah. Zur postoperativen Entzündungsprophylaxe wurden dem Tier 16 mg Gentamicin (Gentamicinsulfat) als Single-Shot-Antibiose intramuskulär in den linken Hinterlauf injiziert. Es folgte die Desinfektion der Narbe mit Braunol® (Povidon-Iod) und die Anlage eines sogenannten Ein-Bein-Hosenverbandes mit Mullbinden um den operierten Lauf und den unteren Rumpf. Dieser wurde noch zusätzlich mit Heftpflastern unter Aussparung des Schamdreiecks fixiert und verstärkt, um Bissfestigkeit bis zum nächsten Operationstag zu gewährleisten. Hierbei ist auf eine ausreichende Beweglichkeit des Beins und Luft im Rumpfbereich zu achten, um die Bauchatmung nicht zu beeinträchtigen. Außerdem wurden die Pflaster in Längsrichtung geklebt, um ein Einschnüren des Laufs mit konsekutivem Kompartmentsyndrom zu verhindern. Zurück im Stall stand das Tier in der Aufwachphase unter Beobachtung und erhielt für die ersten drei Tage postoperativ ca. 15 mg Tramal® (Tramadolhydrochlorid) pro Tag über das Trinkwasser zur Schmerzprophylaxe.

2.4.5 Behandlung

Die Behandlung in den unterschiedlichen Versuchsgruppen erfolgte nach den in Tabelle 3 aufgeführten Regimen. Für die Applikation wurde das Viruskonzentrat, bestehend aus 5×10^{12} Partikeln des jeweiligen adeno-assoziierten Virus, mit NaCl 0,9% auf 1 ml verdünnt und in einer 1 ml Spritze aufgezogen. Die intramuskuläre Injektion an 10 verschiedenen Stellen des ischämischen Unterschenkels zu je 100 µl Portionen wurde an Tag 0 nach Wundverschluss und vor Anlage des Verbandes bei allen Versuchsgruppen mit allen Vektoren - außer rAAV.Ang-1 - gleichsam durchgeführt. Nur das Virus mit dem Transgen Angiopoietin-1 wurde in der jeweiligen Versuchsgruppe an Tag 7 beim Verbandswechsel verabreicht. Für die Tiere mit rAAV.Tet-off Ang-2 im Behandlungsregime war eine konstante Zufuhr von Doxzyklin ab Tag 14 erforderlich. Dafür wurde die ungefähre Tagestrinkmenge von vier Kaninchen (700 ml) täglich erneuert und 100 mg Doxzyklin darin aufgelöst, sodass es ca. zu einer Tagesgesamtdosis von 25 mg pro Tier kam. Das Trinkwasser wurde an einem lichtgeschützten Ort positioniert, um der Degradierung durch UV-Licht entgegenzuwirken.

Für die Vehikel-Kontrollgruppe (rAAV.LacZ) wurden die Viren mit einem LacZ-Reportergen ausgestattet, dass bereits in vorangegangenen Publikationen zum Nachweis einer erfolgreichen Virustransduktion herangezogen wurde [187]. Anschließend wurde in den ersten beiden Interventionsgruppen untersucht, ob rAAV.MRTF-A in der Lage ist eine therapeutische Neovaskularisierung hervorzurufen und von welcher Bedeutung die Perizyten für diesen Effekt sind (Inaktivierung dieser durch zeitgleiche rAAV.Ang-2 Applikation). Die

zwei Interventionsgruppen, in denen die etwas komplexeren Genexpressionsmuster unter Anwendung des Tet-off Systems induziert wurden, sind zum besseren Verständnis in Abbildung 5 dargestellt.

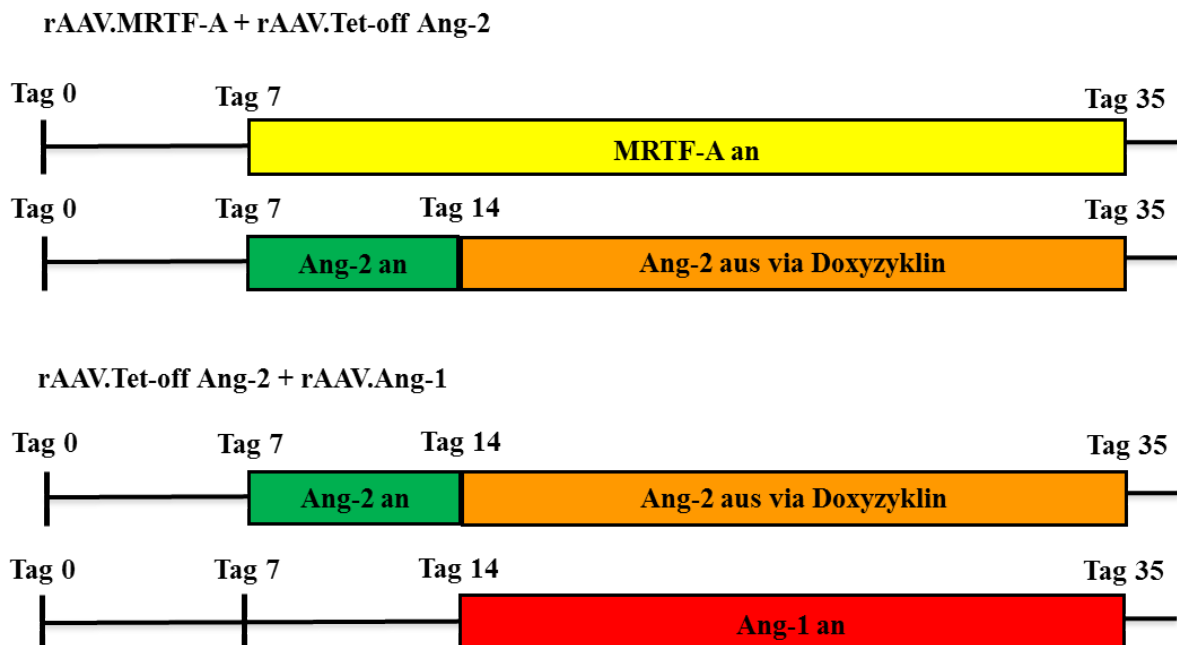


Abbildung 5: Überexpressionsmuster in den Tet-off Interventionsgruppen über die Versuchsdauer von 35 Tagen. Therapeutisch relevante Proteinspiegel werden nach ca. 7 Tagen post injectionem erreicht und bleiben dann bis zum Versuchsende konstant erhalten [190, 191]. In beiden Gruppen sollten Perizyten durch Aktivierung von Angiopoietin-2 in einer frühen Phase der Angiogeneese (Tag 7 – 14) inhibiert werden, um den neu wachsenden Kapillaren ausreichend Raum zu gewähren. Erst ab Tag 14 wurde dieser Prozess durch die Gabe von Doxyzyklin beendet und eine suffiziente Anlagerung der Perizyten an den entstehenden Endothelien möglich. In der einen Gruppe wurde dadurch die anfängliche Blockade eines potentiellen positiven Effektes von MRTF-A auf die Gefäßreifung wieder aufgehoben. In der anderen Gruppe erfolgte stattdessen im Anschluss an die frühe Destabilisierung der Kapillaren eine Unterstützung der Perizytenrekrutierung für die natürliche Gefäßsprossung des Organismus durch Angiopoietin-1 [192].

2.4.6 Angiographie

Eine Woche nach Ischämieinduktion war das Anfertigen einer Baseline-Angiographie der Beinarterien notwendig, um Vergleichswerte für die Angiographien am Versuchsende zu

ermitteln. Die Aufnahmen dienten anschließend als Grundlage zur Auswertung von Kollateralwachstum und Blutflussgeschwindigkeit. Das Kollateralsystem gilt ab dem 7. Tag nach Ischämieinduktion als relativ stabil und weist von da an keine nennenswerten funktionellen Verbesserungen mehr auf [71].

Präoperative Maßnahmen und Anästhesie wurden wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben durchgeführt. Die Lagerung des Tieres erfolgte auf dem Rücken mit einem Nackenpolster aus Kompressen um den Kopf zu überstrecken. Sodann wurde die rechte A. carotis communis palpirt und die Haut darüber gründlich rasiert und desinfiziert. Der ca. 3 cm große Hautschnitt erfolgte per Schere in Richtung des Karotisverlaufs. Die Präparation geschah stumpf durch das Bindegewebe zwischen M. omohyoideus und M. sternocleidomastoideus hindurch in das Karotisdreieck. Dort wurde die Halsschlagader auf einer Strecke von ca. 2 cm von V. jugularis und N. vagus freigelegt und mit zwei Ligaturen unterminiert. Während die kraniale Ligatur unmittelbar geschlossen und mit einer Mosquitoklemme unter Zug gehalten wurde, wurde der kaudale Faden nur locker geknotet und leicht angehoben, sodass der systolische Blutdruck überwunden und die Arterie komprimiert wurde. Anschließend wurde das Gefäß mit einer Mikro-Federschere 1 - 2 mm inzidiert. Die Instrumente, die von nun an endovaskulär eingeführt wurden, mussten vorher mit einer Verdünnung von Heparin-Natrium auf 1000 I.E./ml gespült und benetzt werden.

Zunächst erfolgte die Sondierung der Halsschlagader nach kaudal mit einer 4F Schleuse samt Mandrin und Führungsdraht. Danach wurde die noch lockere Ligatur um Arterie und Schleuse zugezogen und die Schleuse zusätzlich mit den Fäden der Ligatur und einer Tuchklemme an der Augenbinde fixiert. Führungsdraht und Mandrin wurden entfernt und ein 4F Katheter mit eigenem Führungsdraht eingeführt. Zur stetigen Lagekontrolle des Führungsdrahts und des Katheters wurde von nun an die Durchleuchtung mittels C-Bogen angewandt. Hierfür war auf ausreichend Strahlenschutz der Versuchsteilnehmer mit Ganzkörperbleischürzen und Schilddrüsenschutz zu achten. Die Strahlenbelastung wurde monatlich mithilfe von Röntgenplaketten, die unter dem Bleimantel getragen werden mussten, erfasst.

Als nächstes wurde der Katheter unter röntgenologischer Sicht, immer unter vorheriger Sondierung des nächsten Gefäßabschnittes mittels Führungsdraht, zunächst bis zum Aortenbogen vorgeschoben. Anschließend wurde über Aorta descendens und abdominalis bis zur Endposition in eine der beiden Aa. iliacae communes katheterisiert. Sodann erfolgten die Fixierung des sondierten Laufs mittels Pflasterstreifen am Operationstisch und die Einstellung des C-Bogens für die Angiographie. Für die Aufnahmen wurde der CINE-Modus am C-Bogen aktiviert, der Bilder mit 25 frames per second (fps) aufzeichnete. Nun wurde der

Führungsdraht entfernt, und die Gefäße zunächst mit 0,5 - 1 ml Adrekar® (Adenosin) dilatiert. Nach kurzem Durchspülen des Katheters mit NaCl 0,9% wurde das Kontrastmittel Imeron® 300 mg Iod/ml (Iomeprol) über eine Spritzen-Pumpe (Harvard Apparatus) mit der Geschwindigkeit 1 ml/s appliziert. Die Injektion erfolgte solange bis die Gefäße im Bereich des Kniespalts kontrastiert waren (normalerweise 2 - 3 ml). Das im Katheter verbliebene Kontrastmittel wurde nachgespült, der Katheter ein Stück zurückgezogen und die Prozedur am anderen Bein wiederholt.

Nach Abschluss des zweiten Angiogramms wurden alle im Gefäß befindlichen Instrumente gezogen und die kaudale Ligatur zum Verschluss der Halsschlagader fest verknotet. Die abschließende Wundversorgung und Antibiotikaphylaxe wurden kongruent zu Tag 0 durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.4). Das Anlegen eines Verbandes über der frischen Narbe war nicht erforderlich, jedoch wurde die Gelegenheit der Narkose genutzt, um einen Verbandswechsel am operierten Bein mit Inspektion der Narbe durchzuführen. In diesem Moment erfolgte in einer Versuchsgruppe auch die Injektion des rAAV.Ang-1 wie in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Der venöse Zugang wurde entfernt, die Blutung gestoppt und das Tier im Stall bis zum Erwachen beobachtet. Eine Schmerzprophylaxe war nach diesem Eingriff nicht angezeigt.

2.4.7 Versuchsende und Organentnahme

Der abschließende Eingriff an Tag 35 wurde analog zu Tag 7 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass die linke A. carotis communis zur Katheterisierung verwendet wurde.

Zum Beenden des Versuchs wurde das Tier nicht wie gewohnt aus der Narkose erweckt, sondern mit Gabe von 3 ml der TIVA-Mischung im Bolus tief sediert. In einer Spritze wurden 10 ml einer 3 molaren Kaliumchlorid-Lösung bereitgestellt. Sodann erfolgte die Punktion des Herzens mit der Spritze von subxyphoidal nach kranial. Nach erfolgreicher Aspiration von hellrotem Blut wurde das Tier durch intraventrikuläre Injektion der Lösung im Bolus euthanasiert.

Im Anschluss galt es, möglichst rasch die Gewebeproben für PCR und Histologie zu sichern. Dafür wurden zum einen Proben aus fünf verschiedenen Muskeln je Bein entnommen (M. tibialis anterior, M. gastrocnemius, M. fibularis, M. adduktor magnus und M. vastus medialis), zum anderen wurden die Organe Lunge, Herz, Leber und Milz für die Konservierung präpariert. Für spätere PCR-Analysen wurden kleine Gewebestücke der gewonnenen Organe und Muskeln in Eppendorf-Gefäßen zusammen mit RNA-Later® in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Für die Histologie wurden ca. 2 cm große Präparate aus den jeweiligen Muskeln hergestellt und in Histokästchen überführt. Diese wurden dann in ein Behältnis mit vorgekühltem Isopentan gegeben und anschließend in flüssigem Stickstoff für 10 Minuten weiter herabgekühlt. Dieser Schritt verhinderte ein Auskristallisieren des intrazellulären H₂O durch zu schnelles Abkühlen der Proben, sodass es nicht zu einer Zerstörung der Zellstruktur kommt. Nach der Aufbereitung der Proben für die Kryokonservierung wurden diese auf Trockeneis zwischengelagert und anschließend in einem -80° C Gefrierschrank untergebracht.

2.4.8 Kollateralwachstum

Zur Quantifizierung des Kollateralwachstums wurde ein angiographischer Score, angelehnt an früheren Verfahren [193, 194], ermittelt. Dabei wurden die Werte der Angiographien am Versuchsende mit den Ergebnissen der Angiographien an Tag 7 ins Verhältnis zueinander gesetzt, um die anfänglichen, nicht durch die Viren hervorgerufenen Veränderungen herauszurechnen. Für die Auswertung wurde ein qualitativ hochwertiges Bild aus den Aufnahmen des jeweiligen Tieres ausgewählt, worauf die Gefäße zwischen Leistenband und Kniegelenk gut kontrastiert waren. Über dieses Areal wurde dann am Computer ein standardisiertes Gitter gelegt und Schnittstellen des Gitters mit den durch Kontrastmittel dargestellten Gefäßen durch ein Kreuz markiert (siehe Abbildung 6). Auch das linke, nicht ischämische Bein wurde ausgewertet, um systemische Effekte der Gentherapie auszuschließen.

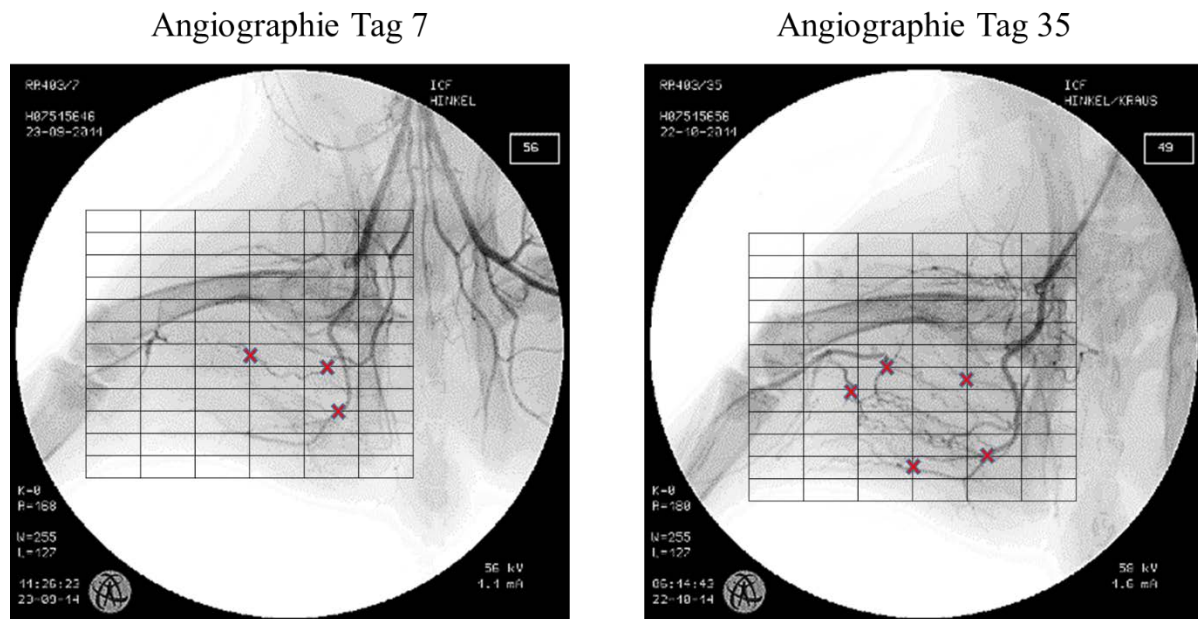


Abbildung 6: exemplarische Darstellung der Kollateralauswertung. Zu sehen sind zwei angiographische Bilder desselben Tieres an Tag 7 und 35. Das Prinzip zur Ermittlung des Scores ist hier mit einigen Markierungen (rote Kreuze) beispielhaft präsentiert. Die Anzahl der Kreuzungspunkte an Tag 35 wurde durch den Wert von Tag 7 geteilt und das Ergebnis in Prozent (%) von Tag 7 angegeben.

2.4.9 Messung der Flussgeschwindigkeit (Cinedensitometrie)

Zur Quantifizierung der Fließgeschwindigkeit des Blutes wurde ein Verfahren nach Gibson et al. durchgeführt [195]. Die sogenannte Cinedensitometrie wurde ebenfalls auf Basis von Angiographien analysiert. Hierfür wurde in der Bilderreihe des angiographischen Films zunächst nach dem Bild gesucht, das die Passage des Kontrastmittels über eine entlang des Leistenbands gedachte Linie zeigte. Von hier an wurden die Bilder bis zu dem Frame gezählt, welches als erstes ein kontrastiertes Gefäß im Bereich des Kniespalts darstellte. Die Differenz der beiden Bildernummern konnte nun, unter Berücksichtigung einer konstanten Injektionsgeschwindigkeit von 1 ml/s und Aufnahmezeit von 25 fps, zur Berechnung der Fließgeschwindigkeit des Blutes im untersuchten Gefäßbett herangezogen werden. Hierbei galt der Quotient der gezählten Frames von Tag 35 zu Tag 7 des nicht-ischämischen Beins als Bezugsgröße für den Quotienten des ischämischen Beins. Der ermittelte Wert, der die genormte Änderung der Flussgeschwindigkeit von Tag 7 zu Tag 35 repräsentierte, wurde in Prozent (%) von Tag 7 dargestellt. Die Cinedensitometrie kann neben der

Fließgeschwindigkeit, die sie misst, als guter Schätzer für die regionale Perfusion des Gewebes herangezogen werden (Hinkel et al., unpublizierte Daten).

2.5 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (q-PCR oder rt-PCR) ermöglicht es, die Transkriptionsrate eines Gens zum Zeitpunkt der Konservierung der Probe anhand von RNA-Quantifizierung zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit diente dieses Verfahren der Überprüfung der Funktionalität des Tet-Off Systems, dem Nachweis einer Überexpression des Gens MRTF-A nach Virentransduktion und der Bestätigung einer funktionellen Wirkung von MRTF-A durch Messung erhöhter Konzentration der Downstream-Gene CCN1 und CCN2 [187].

2.5.1 Probenaufbereitung

Zu Beginn der RNA-Aufreinigung wurde das tiefgefrorene Gewebe portioniert und zu jeweils 100 mg Fragmenten in ein Homogenisator tube überführt. Anschließend wurden je Röhrchen 1 ml TRI Reagent[®] hinzugefügt, um durch das enthaltene Guanidinthiocyanat ein rasches Aufspalten der Zellen mit Inaktivierung von Enzymen, vor allem RNAsen, zu bedingen. Außerdem enthielt das Reagenz Phenol zur Lösung von DNA und Proteinen. Die Homogenisierung erfolgte mittels ULTRA-TURRAX[®]. Hierbei war eine Reinigung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) zwischen den Proben nötig, um Kontaminationen zu verhindern. In den folgenden Ausführungen werden exemplarisch die Mengenangaben für jeweils ein Reaktionsgefäß verwendet. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine Phasentrennung mit 200 µl Chloroform vorgenommen. Es folgte eine erneute kurze Inkubation bei Raumtemperatur unter Verrühren des Gemischs. Danach wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 4° C und 12000 rpm zentrifugiert. Sodann wurde der RNA-haltige Überstand in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 500 µl Isopropanol 96% zum Ausfällen gebracht. Nach Vortexen und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut bei 4° C und 12000 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Diesmal wurde der Überstand abpipettiert und verworfen, das Präzipitat in 1 ml Ethanol 75 % gewaschen, gevortext und kurz bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet für 10 Minuten auf einem Heizblock bei 40° C getrocknet. Die Resuspension erfolgte in abhängig

von der Menge des Präzipitats in 50 - 100 µl Nuclease-Free Water (NFW) [196].

Nun konnte die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt werden. Hierfür wurden 5 µl des erzeugten Gemischs mit 495 µl NFW 1:100 in einer Küvette verdünnt. Daraufhin erfolgte die Bestimmung des RNA-Gehalts bei 260 nm Wellenlänge und wurde ins Verhältnis mit der Proteinmenge gesetzt, die bei 280 nm gemessen wurde. Bei einem Quotienten von 1,9 bis 2,1 wurde die gemessene RNA-Konzentration mal 4 genommen und auf 1 µg RNA/µl eingestellt. Dann wurde erneut eine Photometrie durchgeführt.

Um ein Umschreiben der RNA auf die cDNA zu ermöglichen, stand als nächster Schritt der DNase-Verdau an. Hierfür wurde 1 µl der RNA-Probe mit 1µl DNase 10x Puffer, 1µl DNase und 7 µl NFW kombiniert und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 µl 25 mM EDTA beendet. Vor dem Umschreiben wurde die Lösung bei 70° C inkubiert, kurz zentrifugiert und anschließend 5 Minuten auf Eis gelegt. Um gegebenenfalls zu kontrollieren, ob das Gemisch DNA-frei war, wurde 1 µl der Probe entnommen und aufbewahrt. Die restlichen 10 µl dienten zur Herstellung der cDNA.

2.5.2 cDNA-Herstellung

Zum Umschreiben von RNA in einzelsträngige cDNA wurde das Reverse-Transkription-System Protokoll der Firma Promega angewandt. Hierzu wurden folgende Bestandteile in angegebener Reihenfolge in ein Reaktionsglas hinzugefügt:

4 µl 25 mM MgCl₂, 2µl Reverse Transkriptase 10x Puffer, 2 µl 10 mM dNTP Mischung, 0,5 µl Recombinant RNasin[®] Ribonuklease Inhibitor, 0,6 - 0,75 µl hochkonzentrierte AMV Reverse Transkriptase, 0,5 µg Random Primer und schließlich die 10 µl hergestellte RNA-haltige Lösung. Das Endvolumen sollte mit NFW auf 20 µl aufgestockt werden.

Das Gemisch wurde dann zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 45 Minuten bei 42 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Erhitzung auf 95° C für 5 Minuten und die Zwischenlagerung für 5 Minuten auf Eis, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die Probe konnte dann bis zur Durchführung der PCR bei -20 ° C gelagert werden

2.5.3 rt-PCR

Der Ansatz für die rt-PCR bestand aus folgenden Substanzen:

10 µl iQ[™] SYBR[®] Green Supermix, jeweils 1 µl Primer forward und reverse (siehe Kapitel

2.1.9), 6 µl destilliertes H₂O und zuletzt 2µl des umgeschriebenen cDNA-Reagenz.

Für die Messung wurde ein MyiQ™ single color real-time PCR detection system von Bio-Rad verwendet. Die PCR-Tubes wurden darin positioniert und die Reaktion ausgeführt. Im Gegensatz zu einer gewöhnlichen PCR war das Gerät zusätzlich in der Lage die amplifizierte doppelsträngige DNA zu quantifizieren. Dazu interkalierte zunächst das zugesetzte SYBR® Green mit der Doppelstrang-DNA, sodass es zu einer Fluoreszenz kam. Die Intensität des fluoreszierenden Farbstoffs konnte dann mittels Signalmessung bei einer Wellenlänge von 521 nm bestimmt werden, wobei die Stärke des Signals proportional zur Menge der DNA war. Die Quantifizierung erfolgte mittels MyiQ™ Software bei optimalen Reaktionsbedingungen während des exponentiellen Wachstums. Das Ergebnis wurde in Relation zum Expressionslevels des Housekeeping-Gens GAPDH angegeben.

2.6 Histologische Färbungen

Die histologischen Analysen des entnommenen Muskelgewebes dienten zur Quantifizierung von Kapillarwachstum und Gefäßreifung (PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung), Muskelfaser-Durchmesser (WGA Färbung) und Fibrose (Siriusrot Färbung).

Alle Muskelpräparate wurden zunächst mit einem Leica 3050 S Kryotom zu 5 µm dicken Schnitten verarbeitet. Hierfür mussten die Proben zunächst von -80° C auf -20° C aufgewärmt, mit einem Skalpell zugeschnitten und mit Tissue-Tek® auf einem vorgekühlten Präparatträger befestigt werden. Dabei war zu beachten, dass die Muskelfasern senkrecht zur Schnitttrichtung positioniert wurden, um Querschnitte der Muskulatur zu erhalten. Sodann wurden sechs bis neun Schnitte pro Muskel angefertigt und jeweils drei auf einem Objektträger aufgezogen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde immer an der dicksten Stelle des Muskelbauchs mit den Schnitten begonnen. Die Zwischenlagerung bis zur Färbung erfolgte bei 4° C.

2.6.1 PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung

Die PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung ist eine immunhistochemische Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern. Sie bietet die Möglichkeit nicht nur Kapillarwachstum mithilfe des Endothelzellmarkers CD-31 (PECAM-1) zu quantifizieren [197], sondern zusätzlich eine Aussage über den Grad der Reifung der Kapillaren durch Markierung von NG-2 zu treffen,

das u.a. auf Perizyten exprimiert wird [198, 199].

Zur Fixierung wurden die Objektträger mit den Proben für 15 Minuten in 4° C kaltes Aceton gelegt. Nach drei Waschsritten à fünf Minuten in PBS wurden überschüssige Tropfen abgeklopft und die einzelnen Schnitte vorsichtig mit einem hydrophoben Dako Pen umrahmt. Um unspezifische Antikörperbindungen, die zu Hintergrundfluoreszenz führen können, zu blocken wurden 2 % bovines Serumalbumin (BSA) und 0,2 % Triton™ X-100 in PBS gelöst und auf die Schnitte pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation wurde erneut drei mal fünf Minuten in PBS gewaschen und anschließend der primäre Antikörper gegen PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) 1:100 in der vorher hergestellten Blocking-Lösung verdünnt und gleichmäßig auf die Schnitte verteilt. Die Proben wurden dann über Nacht bei 4° C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte wie gewohnt gewaschen und anschließend mit einem rot fluoreszierenden sekundären Antikörper (Verdünnung 1:200 in Antibody Diluent) benetzt. Ab diesem Zeitpunkt war möglichst unter Abdunkelung zu arbeiten, um die Fluoreszenz des Farbstoffes nicht zu beeinträchtigen. Nach zwei-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtschutz wurde wieder wie üblich gewaschen und danach der zweite primäre Antikörper, diesmal gegen NG-2 (neuron-gial Antigen-2 oder Chondroitinsulfat Proteoglykan), 1:200 in Antibody Diluent verdünnt aufgetragen. Es folgte eine erneute Inkubation bei 4° C über Nacht und am nächsten Tag die Befreiung von überschüssigem Antikörper durch drei Waschschrte je fünf Minuten. Danach wurde der zweite sekundäre Antikörper, diesmal mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff markiert, pipettiert und nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur abgewaschen. Alle verwendeten Antikörper sind in Kapitel 2.1.10 detailliert aufgeführt.

Zum Schluss wurde noch die Kern-DNA mit DAPI-haltigen VECTASHIELD® Eindeck-Medium angefärbt (blau fluoreszierend) und die Schnitte mit einem Deckglas geschützt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C bis zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop, die möglichst innerhalb einer Woche erfolgen sollte.

Für die Mikroskopie wurde ein Axiovert 200M Mikroskop verwendet und die Bilder mit einer AxioCam HRc in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Es wurden sechs Bilder je Muskel aus unterschiedlichen Hauptgesichtsfeldern fotografiert und mit der AxioVision Software bearbeitet. Die Auswertung erfolgte mittels ImageJ, indem die roten und grünen Signale gezählt und dann ins Verhältnis zueinander gesetzt wurden, um den Grad der Gefäßreifung zu bestimmen.

2.6.2 WGA Färbung

Mit der WGA (wheat germ agglutinin) Färbung ist es möglich Sialinsäure- und N-Acetylglucosamin-haltige Glykoproteine und Glykolipide der Zellmembran anzufärben [200]. Da Skelettmuskelzellen einen großen Querdurchmesser haben eignet sich diese Färbung besonders gut, um Querschnittsflächen von Muskelfasern darzustellen, auszumessen und zur Bewertung von Hypertrophie oder Atrophie heranzuziehen. Zu beachten ist außerdem, dass WGA kein Antikörper, sondern ein Lektin ist [201].

Für die Färbung wurden die Proben zehn Minuten in 4° C kaltem Aceton fixiert. Es folgten ein Waschschrift von drei mal zehn Minuten mit PBS und das Entfernen von überschüssigen Tropfen im Anschluss. Das mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff versehene WGA wurde 50-fach verdünnt in PBS mit 1 mM CaCl₂ aufbereitet und auf die Schnitte pipettiert. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtschutz wurden die Schnitte erneut drei mal zehn Minuten gewaschen, trocken geklopft und danach mit VECTASHIELD® DAPI eingedeckelt.

Die Mikroskopie erfolgte mit denselben Geräten und Software wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Es wurden immer jeweils zehn nebeneinanderliegende Muskelzellen in sechs unterschiedlichen Hauptgesichtsfeldern pro Muskel untersucht. Für die Auswertung wurde in AxioVision die Querschnittsfläche der einzelnen Muskelfasern gemessen und anschließend gemittelt.

2.6.3 Pikro-Siriusrot Färbung

Die Pikro-Siriusrot Färbung nach Puchtler ist eine histologische Methode zur Darstellung von kollagenem Bindegewebe [202]. Sie eignet sich daher besonders zur Quantifizierung von Fibrose.

Zur Fixierung wurde eine Bouin'sche Lösung hergestellt und die Proben darin 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Schnitte eine Stunde lang in 0,1 %-iger Siriusrot-/Pikrinsäurelösung gefärbt. Um ein Überfärben zu vermeiden, wurden die Objektträger im Anschluss für 20 Sekunden in 10 mM Salzsäure überführt. Nach kurzer Reinigung in H₂O wurde die Kernfärbung in Mayer's Hämalaun für fünf bis zehn Minuten durchgeführt. Sodann wurde überschüssige Färbelösung fünf Minuten unter fließendem Wasser entfernt. Zur Dehydrierung wurde eine Alkoholreihe angewandt. Dafür wurden die Schnitte kurz in 70 %-iges Ethanol und dann für drei Minuten in 96 %-iges Ethanol getaucht. Weiterhin folgten drei

Überführungen in 100 %-iges Ethanol, die ersten beiden Male für jeweils drei Minuten und das letzte Mal für zwei Minuten. Die Alkoholreihe wurde mit zehn-minütiger Inkubation in Xylol abgeschlossen. Schließlich wurden die Proben mit Entellan® eingebettet.

Für die Mikroskopie wurde ein Axiovert 100 Mikroskop verwendet und mit einer AxioCam HCr sechs Bilder unterschiedlicher Lokalisation pro Muskel bei 50-facher Vergrößerung geschossen.

Die Auswertung wurde mit den Programmen ImageJ und Photoshop durchgeführt. Hierbei wurde das gewünschte Bild an zufälliger Stelle zu einem standardisierten Quadrat zugeschnitten und in dem ausgewählten Bereich eine Schwellenanalyse (Threshold) durchgeführt. Dabei wurde die Schwelle so lange angepasst bis der gesamte, im histologischen Schnitt rot gefärbte Bereich (entspricht dem Anteil an kollagenem Bindegewebe) erfasst wurde. Die Berechnung lieferte dann den Anteil von fibrosiertem Gewebe am Gesamtbild in Prozent.

2.7 Statistische Analyse

Die nachfolgenden Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (standard error of the mean, SEM) angegeben. Zur Berechnung des p-Werts wurden die statistischen Methoden ungepaarter t-Test, ANOVA und Bonferroni-Korrektur verwendet. Als signifikant wurden Ergebnisse mit $p < 0,05$ gewertet. Signifikante Unterschiede wurden in Abbildungen mit * gekennzeichnet, hochsignifikante Ergebnisse ($p < 0,001$) mit **.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der rAAV.MRTF-A Transduktion auf die Genexpression *in vivo*

Zur Analyse der rAAV.MRTF-A-vermittelten Expressionslevel der Gene MRTF-A, CCN-1 und CCN-2 wurden Messungen mittels quantitativer Echtzeit-PCR durchgeführt. Die untersuchte RNA wurde aus Proben der Unterschenkelmuskeln (M. tibialis anterior und M. gastrocnemius) des operierten Beins isoliert, die 35 Tage nach intramuskulärer Virusapplikation entnommen worden waren. Es wurden jeweils die Expressionsniveaus in rAAV.LacZ- und rAAV.MRTF-A-transduziertem Gewebe miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind auf einer logarithmischen Skala und normalisiert zur Expression von GAPDH aufgeführt.

3.1.1 rt-PCR-Nachweis von MRTF-A

Um die Eignung des rekombinanten adeno-assoziierten Virus 2/9 für die Übertragung von Genen mit konsekutiver Überexpression *in vivo* zu belegen, wurde exemplarisch die Transkriptionsrate von MRTF-A in Skelettmuskeln, worin Viren mit dem gleichnamigen Transgen injiziert worden waren, untersucht. In Kontrolltieren übertrugen die Vektoren lediglich ein Reportergen. Der Vergleich der lokalen Expressionslevel von MRTF-A zeigte in rAAV-MRTF-A-behandelten Tieren nach 35 Tagen einen signifikanten Anstieg gegenüber Tieren, die nur das Kontrollvirus erhalten hatten ($11,13 \pm 5,76$ vs. $0,36 \pm 0,06$) (siehe Abbildung 7).

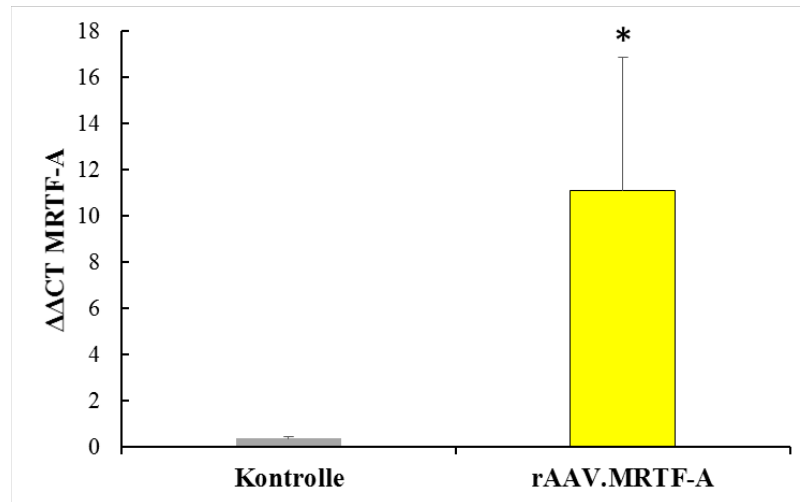


Abbildung 7: Vergleich von MRTF-A Expressionsniveaus in Kontroll- und Therapietieren. Die MRTF-A Expression in rAAV.MRTF-A-transduzierten Tieren war nach 35 Tagen ca. 30-fach und damit signifikant höher als in Kontrolltieren (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$).

3.1.2 rt-PCR-Nachweis von CCN-1

Um aufzuzeigen, dass sich die erhöhten MRTF-A Spiegel auch in funktionell relevantes Protein übersetzt hatten, wurde zusätzlich die Expression von zwei nachgeschalteten Genen der T β 4/MRTF-A/SRF-Achse analysiert. Eines davon war der pro-angiogene Faktor CCN-1 (CYR61) [203]. Die CCN-1 Expression war unter der rAAV-induzierten Überexpression von MRTF-A signifikant erhöht ($7,19 \pm 1,95$), verglichen mit dem Niveau in Kontrolltieren ($1,81 \pm 0,21$) (siehe Abbildung 8).

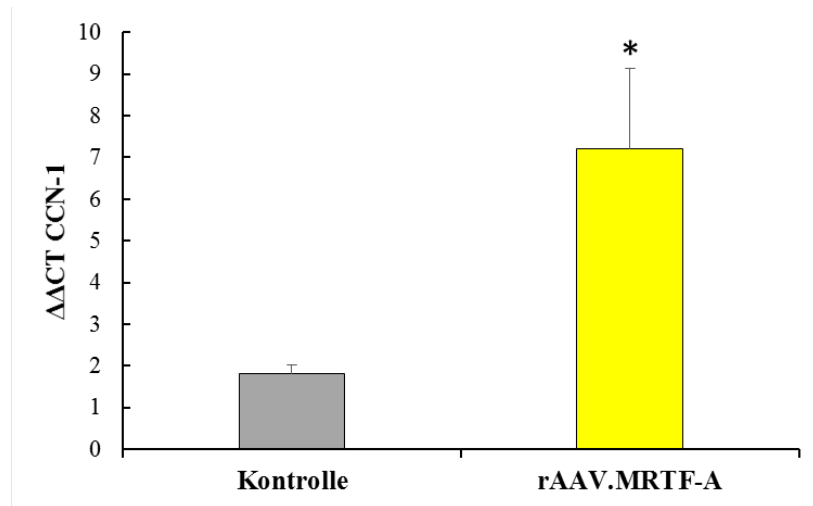


Abbildung 8: Vergleich von CCN-1 Expressionsniveaus in Kontroll- und Therapietieren. CCN-1 wurde in rAAV.MRTF-A-transduzierten Tieren ca. 4-fach überexprimiert und war signifikant höher als in der Vehikel-Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$).

3.1.3 rt-PCR-Nachweis von CCN-2

Das zweite Gen, das unter dem Einfluss von MRTF-A steht und deshalb untersucht wurde, war CCN-2 (CTGF) [204]. RAAV.MRTF-A-behandelte Tiere zeigten signifikant höhere CCN-2 Level ($3,63 \pm 0,55$) als LacZ-Kontrollen ($0,71 \pm 0,43$) (siehe Abbildung 9).

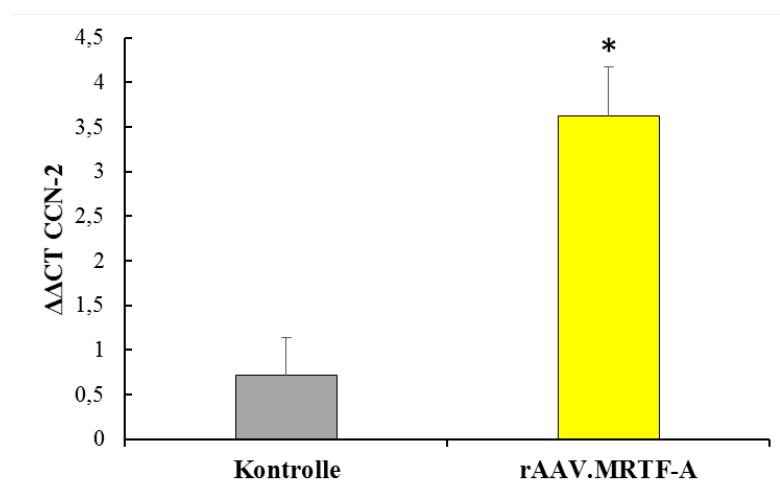


Abbildung 9: Vergleich von CCN-2 Expressionsniveaus in Kontroll- und Therapietieren. In rAAV.MRTF-A transduziertem Gewebe war an Tag 35 im Vergleich zum Kontrollgewebe ein ca. 5-

facher und signifikanter Anstieg des CCN-2 Expressionsniveaus zu beobachten (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$).

3.2 Effekte des Tet-off Systems auf die Genexpression *in vivo*

Um die Funktionalität des Tet-off Systems zur Steuerung der Genexpression *in vivo* zu zeigen, wurde eine quantitative Echtzeit-PCR-Messung angewandt. Dabei wurden im Vorfeld Tiere, die aufgrund einer Transduktion mit rAAV.Tet-off Ang-2 Doxyzyklin oral zugeführt bekamen, randomisiert zur einen Hälfte gemäß Versuchsprotokoll bis zur Euthanasie mit dem Tetrazyklin-Antibiotikum weiter behandelt. Bei der anderen Hälfte wurde Doxyzyklin drei Tage vor Beendigung des Versuchs ausgesetzt. Anschließend wurden exemplarisch im M. gastrocnemius des operierten Beins die Expressionsniveaus von Angiopoietin-2 in den beiden Vergleichsgruppen gegenüber gestellt. Zu beobachten war ein signifikant hohes Expressionslevel in der ausgesetzten „Kontrollgruppe“ ($2,39 \pm 0,18$), verglichen mit dem niedrigen Expressionsniveau in der Doxyzyklin-behandelten Gruppe ($0,26 \pm 0,06$) (siehe Abbildung 10).

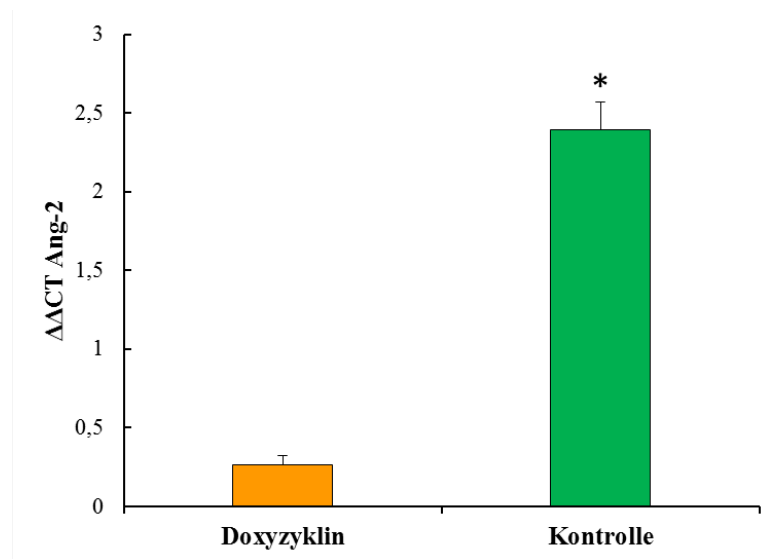


Abbildung 10: Vergleich von Angiopoietin-2 Expressionsniveaus in Tieren mit und ohne Doxyzyklinzufuhr zum Zeitpunkt der Muskelentnahme. Mit „Kontrolle“ sind hier Tiere gemeint, die 3 Tage vor Versuchsende kein Doxyzyklin mehr erhalten haben. Es zeigte sich eine signifikante, ca. 9-fache Reduktion der Ang-2 Expression bei Tetrazyklin-behandelten Tieren. (Mittelwert \pm

Standardfehler, * $p < 0,05$).

3.3 Funktionelle Effekte von MRTF-A in vivo

Zunächst sollte nun untersucht werden ob mit dem in der Kaskade nachgeschalteten Ko-Transkriptionsfaktor MRTF-A ein vergleichbarer oder gar verstärkter funktioneller Effekt erzielt werden kann wie mit dem pleiotropen Peptid T β 4. Zusätzlich sollte die Rolle der Gefäßdestabilisierung im Prozess der Gefäßneubildung näher betrachtet werden. Hierzu wurde durch Ko-Applikation von Angiopoietin-2 eine Inhibition dieser Zellen bewirkt, um die Auswirkungen auf die therapeutischen Effekte von MRTF-A zu analysieren. Die histologischen Untersuchungen wurden exemplarisch an Schnitten des M. tibialis anterior des operierten Hinterlaufs durchgeführt. Untersuchungen der Kollateralisierung und Blutflussgeschwindigkeit wurden an Angiographien beider Hinterläufe durchgeführt.

3.3.1 Analyse des Kapillarwachstums mittels Immunfluoreszenzhistochemie

Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden die PECAM-1 Signale (rote Fluoreszenz in Abbildung 11) pro Hauptgesichtsfeld in der PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung gezählt. Es ließen sich hoch signifikant mehr Kapillaren in der Unterschenkelmuskulatur der MRTF-A Gruppe finden ($39,0 \pm 1,8$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf) als im Gewebe der Kontrolltiere ($25,4 \pm 0,6$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf). Durch die Ko-Applikation von Angiopoietin-2 in MRTF-A-behandelten Tieren blieb dieser Effekt aus, sodass die Kapillardichte wieder hoch signifikant niedriger als in mono-therapierten Tieren war ($20,7 \pm 0,6$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf). Der Unterschied zu Kontrolltieren war nicht signifikant (siehe Abbildung 12).

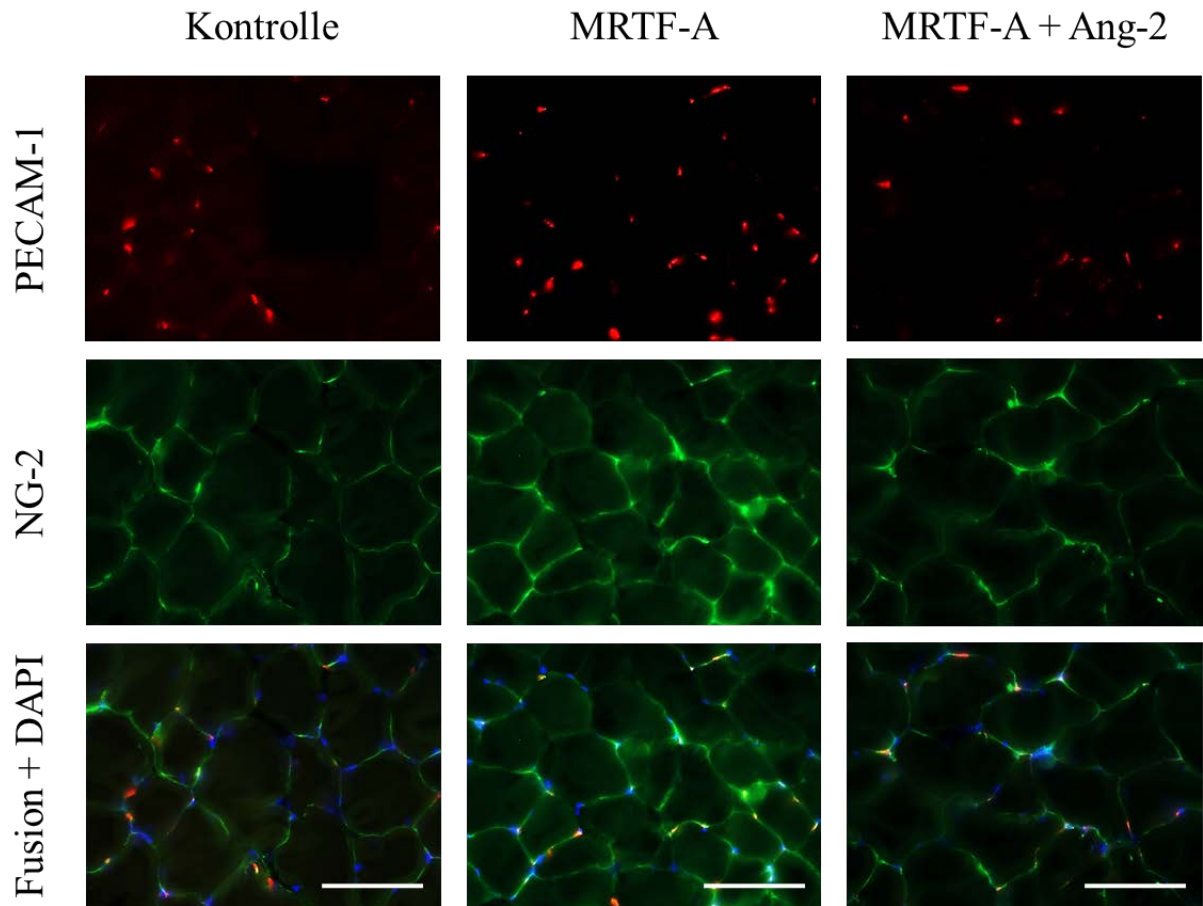


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten des M. tibialis anterior zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse. PECAM-1 Antikörper wurden mit einem rot-fluoreszierenden, NG-2 Antikörper mit einem grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper beladen. DAPI stellt die Kern-DNA blau-fluoreszierend dar. Die Anzahl der PECAM-1 Signale ist ein Maß für die Kapillardichte und damit für die Angiogenese. NG-2 Signale markieren die perivaskulären Perizyten. Im Mischbild erscheinen maturierte Kapillaren gelb aufgrund der Fusion von roter und grüner Fluoreszenz. Die Ausschnitte wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 50 μm .

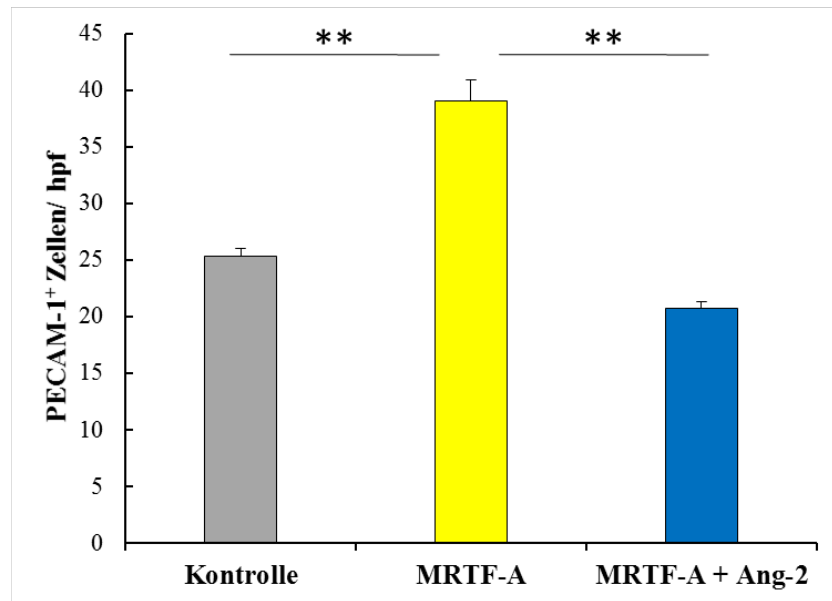


Abbildung 12: Potential von MRTF-A für die Kapillarisation *in vivo*. In MRTF-A-therapierten Tieren ließ sich eine hoch signifikant gesteigerte Endothelialisierung beobachten (ca. Faktor 1,5 zu Kontrollen). In Kombination mit Angiopoietin-2 ließ sich dieser Effekt verhindern, die Werte blieben im Bereich des Kontrollniveaus (Mittelwert \pm Standardfehler, $***p < 0,001$).

3.3.2 Analyse der Kapillarreifung mittels Doppelimmunofluoreszenzhistochemie

Zur Evaluation der Perizytenrekrutierung wurden zunächst die NG-2 Signale (grüne Fluoreszenz in Abbildung 11) pro Hauptgesichtsfeld in der PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung gezählt. Der Wert wurde sodann ins Verhältnis zum entsprechenden Wert für die Endothelialisierung gesetzt, um den Anteil reifer Kapillaren zu bestimmen. Wie bei der Angiogenese zeigte sich eine hoch signifikante Steigerung der Perizytenzahl in der MRTF-A Therapiegruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ($22,0 \pm 1,5$ NG-2⁺ Zellen/ hpf vs. $8,0 \pm 0,4$ NG-2⁺ Zellen/ hpf). Die Inhibierung der perivaskulären Zellen in MRTF-A-behandelten Tieren durch Angiopoietin-2 führte zu hoch signifikant niedrigeren Perizytenzahlen als in Tieren, in denen diese Inhibition nicht stattfand ($8,3 \pm 0,4$ NG-2⁺ Zellen/ hpf). Auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 13).

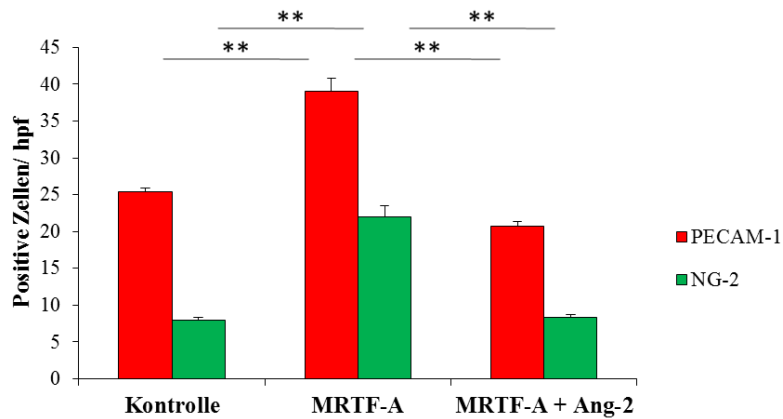


Abbildung 13: Potential von MRTF-A für Kapillarisation und Perizytenrekrutierung *in vivo*. Sowohl für Perizyten als auch für Endothelzellen zeigten sich hoch signifikante Erhöhungen in der MRTF-A Gruppe verglichen zu Kontrolltieren (bei Perizyten ca. um den Faktor 2,8). Durch Ko-Applikation von Angiopoietin-2 konnten beide Werte nicht über das Kontrollniveau hinaus gesteigert werden und blieben hoch signifikant niedriger als in der MRTF-A Gruppe (Mittelwert \pm Standardfehler, $**p < 0,001$).

Das Verhältnis der korrespondierenden Werte für Angiogenese und Perizytenrekrutierung zeigte eine hoch signifikant gesteigerte Reife der Kapillaren im Unterschenkelgewebe der MRTF-A Gruppe ($0,56 \pm 0,03$) gegenüber dem Kontrollgewebe ($0,33 \pm 0,02$). Im Vergleich mit einer reinen MRTF-A Behandlung wurde in Kombination mit Angiopoietin-2 ein signifikant geringerer Anteil an Endothelzellen von Perizyten stabilisiert ($0,41 \pm 0,03$). Der Unterschied der Kombinations- zur Kontrollgruppe war nicht signifikant (siehe Abbildung 11 und Abbildung 14).

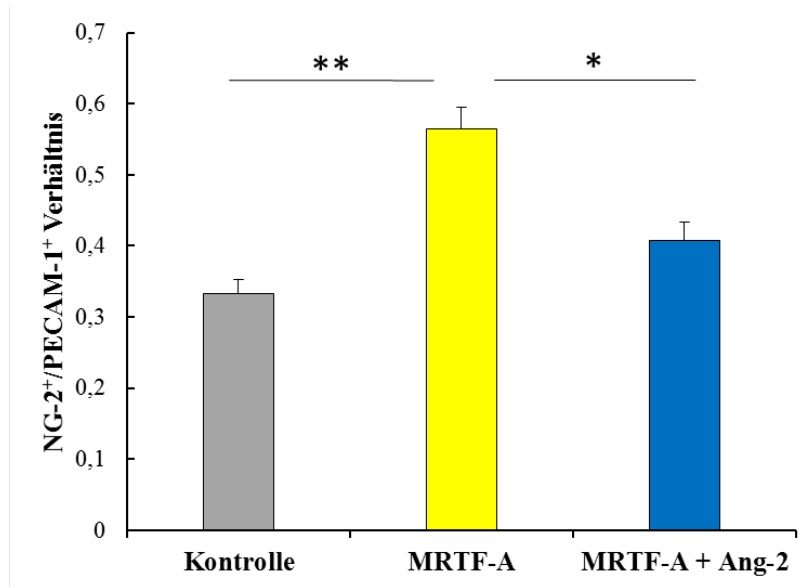


Abbildung 14: Potential von MRTF-A für die Gefäßmaturierung *in vivo*. MRTF-A induzierte im behandelten Gewebe einen hoch signifikant gesteigerten Anteil an reifen Kapillaren im Vergleich zur Kontrolle (ca. Faktor 1,7). Durch die Kombination mit Angiopoietin-2 wurde dieser Effekt unterbunden, sodass ein signifikant geringerer Anteil ausreifte (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.3.3 Analyse des Kollateralwachstums mittels Angiographie

Zur Beurteilung der Arteriogenese wurden die Kollateralgefäße des rechten Hinterlaufs mithilfe eines Gitternetzes in den Angiographien der Tage 7 und 35 gezählt (siehe Kapitel 2.4.8). Die Werte des 35. Tages wurden dann ins Verhältnis zu den entsprechenden Werten des 7. Tages nach Versuchsbeginn gesetzt und als Ergebnis in Prozent präsentiert. In der MRTF-A Gruppe fanden sich hoch signifikant mehr Kollateralen im Verhältnis zu Tag 7 ($154 \pm 4 \%$) als in der Kontrollgruppe ($101 \pm 3 \%$). In der MRTF-A + Ang-2 Gruppe konnte dieser Effekt nicht reproduziert werden, die Werte waren hoch signifikant niedriger als in der Monotherapie Gruppe und befanden sich auf Kontrollniveau ($111 \pm 2 \%$) (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16).

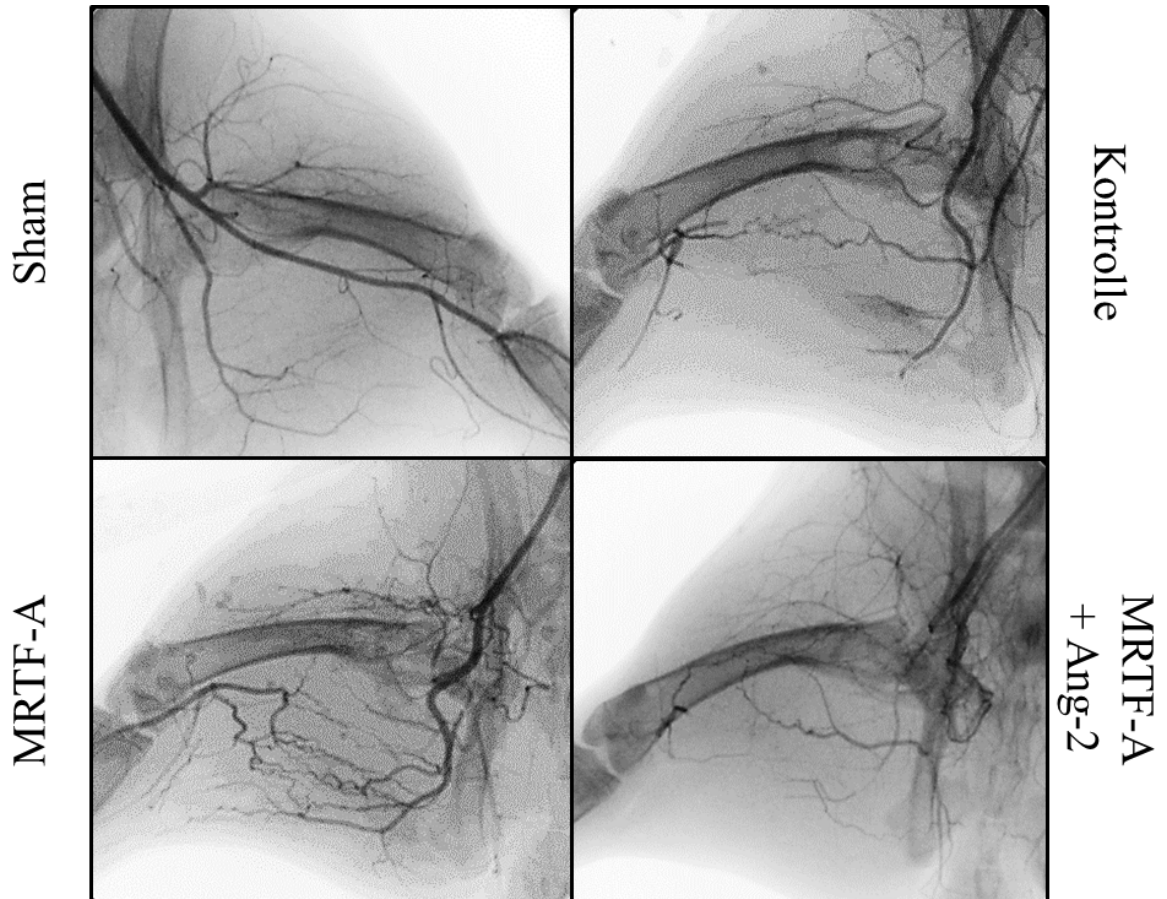


Abbildung 15: Angiographische Aufnahmen des Oberschenkels an Tag 35 nach Versuchsbeginn zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse. Zu erkennen ist ein deutlich ausgeprägtes Kollateralsystem im rechten operierten Bein der MRTF-A Gruppe gegenüber den Extremitäten der Kontroll- und Kombinationsgruppe, in denen kaum eine Arterioneogenese stattfand. Zum Vergleich ist eine Angiographie des linken Hinterlaufs (Sham-Kontrolle) mit noch vorhandener Femoralarterie dargestellt.

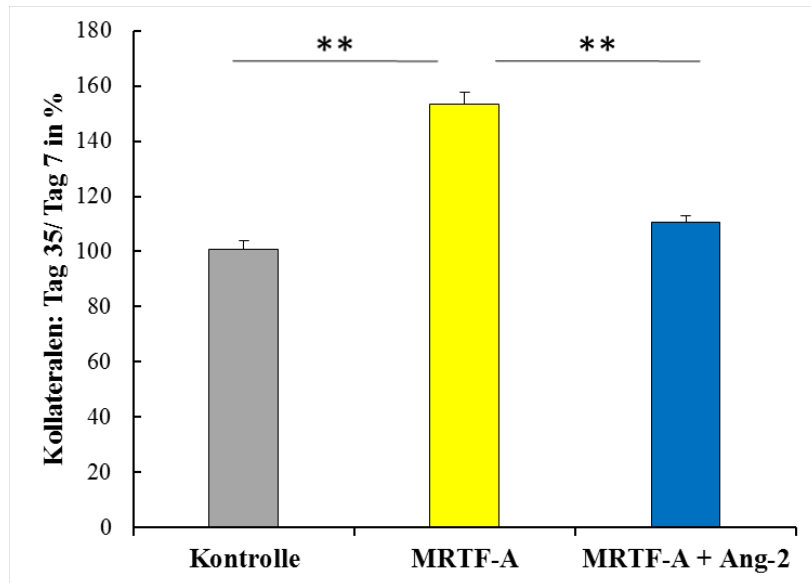


Abbildung 16: Potential von MRTF-A für die Kollateralisierung *in vivo*. MRTF-A war in der Lage eine ca. 1,5-fache, hoch signifikante Steigerung der Arteriogenese ab Tag 7 hervorzurufen. Die Ko-Applikation von Angiopoietin-2 führte zum Ausbleiben einer verbesserten Kollateralisierung, die Werte blieben im Kontrollbereich (Mittelwert \pm Standardfehler, $**p < 0,001$).

3.3.4 Analyse der Blutflussgeschwindigkeit mittels Cinedensitometrie

Zur Erfassung der Blutflussgeschwindigkeit wurde die Methode der Cinedensitometrie verwendet (siehe Kapitel 2.4.9). Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der angiographischen Filme des 7. und 35. Tages beider Hinterläufe. Das Verhältnis der Werte des rechten ischämischen Beins (Tag 35 zu Tag 7) wurde zum analogen Verhältnis der Werte des linken gesunden Beins normalisiert und das Ergebnis in Prozent angegeben. Als Maß für die Durchblutung gilt die Blutflussgeschwindigkeit als entscheidende Größe zur Beantwortung der Frage nach einer therapeutischen Neovaskularisierung.

MRTF-A induzierte eine signifikante Steigerung der Fließgeschwindigkeit im ischämischen Lauf ab Tag 7 im Vergleich zu Kontrollen (202 ± 21 % vs. 98 ± 6 %). Dieser Effekt blieb aus, wenn MRTF-A zusammen mit Angiopoietin-2 appliziert wurde. Die Werte waren signifikant niedriger als bei bloßer MRTF-A Verabreichung und befanden sich im Kontrollbereich (120 ± 4 %) (siehe Abbildung 17).

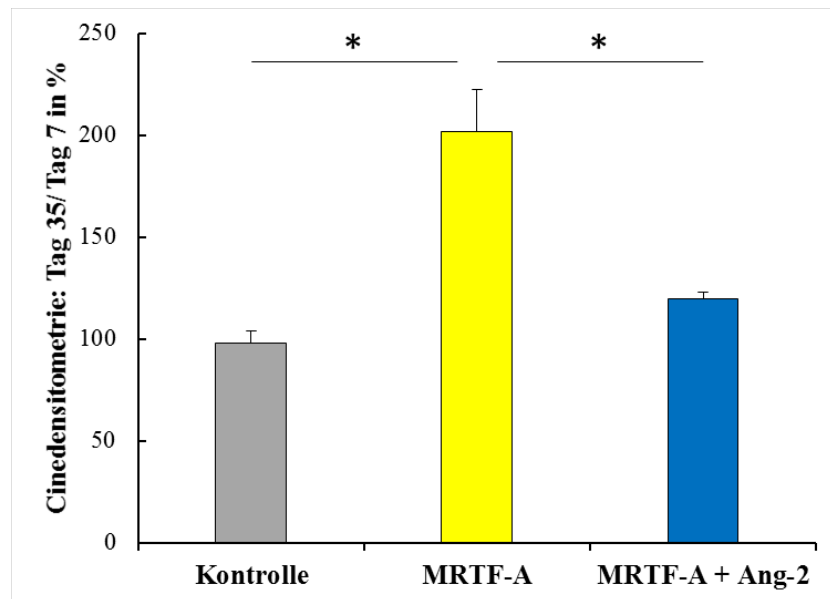


Abbildung 17: Potential von MRTF-A für die Durchblutung *in vivo*. Mit MRTF-A konnte eine signifikante Verdopplung des Blutflusses im ischämischen Hinterlauf verglichen mit Kontrolltieren erzielt werden. In Kombination mit Angiotensin-2 unterblieb eine signifikante Verbesserung über das Kontrollniveau hinaus (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$).

3.4 Funktionelle Effekte der frühen Destabilisierung der Kapillaren *in vivo*

Das Konzept der frühen Destabilisierung von Kapillaren während der Angiogenese wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und bereits erfolgreich zur Induktion einer therapeutischen Neovaskularisierung im Mausmodell eingesetzt [192]. Kerngedanke dahinter ist die Inhibition myofibroblastischer Zellen in der Frühphase der postischämischen Gefäßneubildung, um eine ungestörte Kapillarsprossung zu ermöglichen. Das Konzept sollte nun in dem fortgeschrittenen Modell der chronischen Ischämie des Kaninchenhinterlaufs re-evaluiert und auf seine Funktionalität hin geprüft werden. Hierfür wurde in der Gruppe Tet-off Ang-2 + Ang-1 die Perizytenrekrutierung zu Beginn der Endothelialisierung nach Ischämie durch Angiotensin-2 blockiert und konsekutiv mit Angiotensin-1 wieder aktiviert. Dadurch erhoffte man sich ein verbessertes natives Kapillarbett, das dann verzögert stabilisiert und zur Ausreifung gebracht wird. Außerdem sollte untersucht werden ob eine Kopplung der frühen Destabilisierung mit dem Ko-Transkriptionsfaktor MRTF-A einen verstärkten neovaskulären Effekt hervorrufen kann. In der Gruppe MRTF-A + Tet-off Ang-2 wurde dabei nur anfangs die Gefäßstabilisierung mittels Angiotensin-2 Überexpression unterbunden

und anschließend durch kontinuierliche Gabe von Doxyzyklin wieder ermöglicht. Eine detaillierte Beschreibung der Behandlungsschemata ist in Kapitel 2.4.5 aufgeführt. Das Vorgehen zur Datenerhebung erfolgte identisch zu Kapitel 3.3.

3.4.1 Analyse des Kapillarwachstums mittels Immunfluoreszenzhistochemie

Bei der Quantifizierung der PECAM-1/NG-2 Doppelfärbung ergab sich für die Kapillardichte eine hoch signifikante Steigerung in der MRTF-A + Tet-off Ang-2 Gruppe gegenüber der MRTF-A Gruppe ($51,5 \pm 3,4$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf vs. $39,0 \pm 1,8$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf). Tet-off Ang-2 + Ang-1-behandelte Tiere wiesen signifikant weniger Kapillaren ($41,5 \pm 2,7$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf) im Vergleich zu den Kaninchen mit MRTF-A Kombination auf, zeigten jedoch eine hoch signifikante Steigerung der Angiogenese verglichen mit Kontrollen ($25,4 \pm 0,6$ PECAM-1⁺ Zellen/ hpf). Zu MRTF-A-therapierten Tieren zeigte sich in dieser Gruppe kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19).

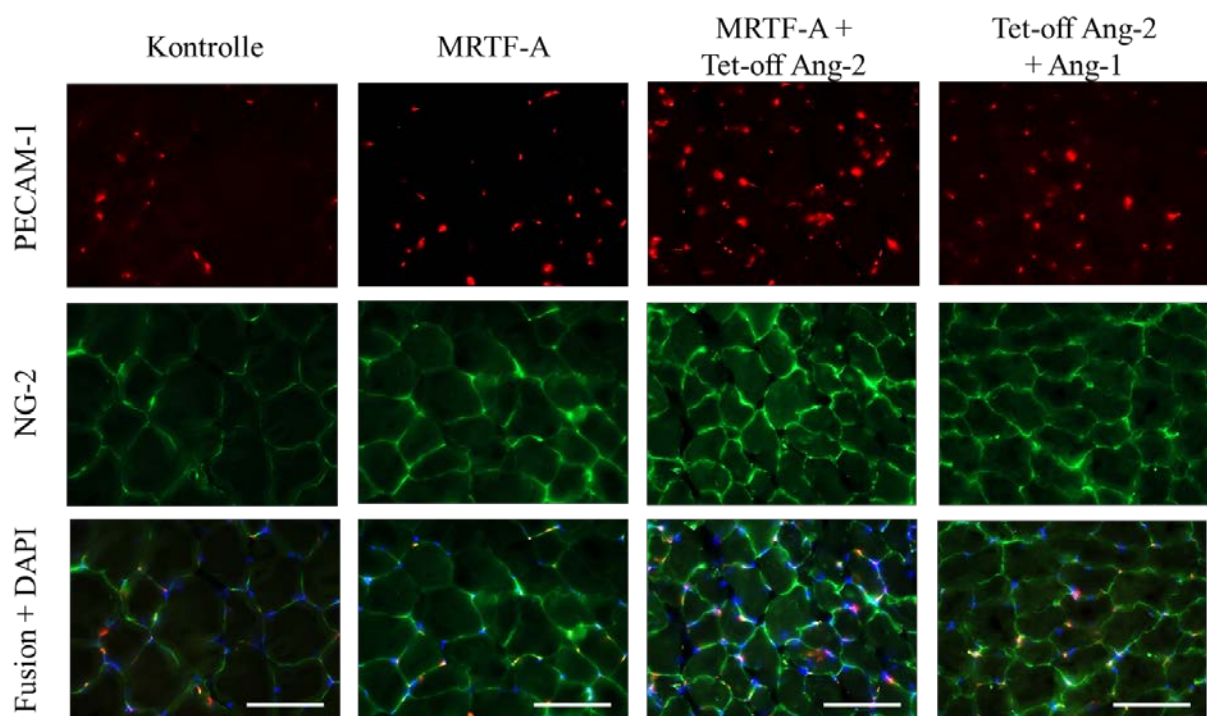


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten des M. tibialis anterior zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse. Die Anzahl der PECAM-1 Signale ist ein Maß für die Kapillardichte und damit für die Angiogenese. NG-2 Signale markieren die perivaskulären Perizyten. Im Mischbild erscheinen maturierte Kapillaren gelb aufgrund der Fusion von roter und grüner

Fluoreszenz. Die Ausschnitte wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 50 μm .

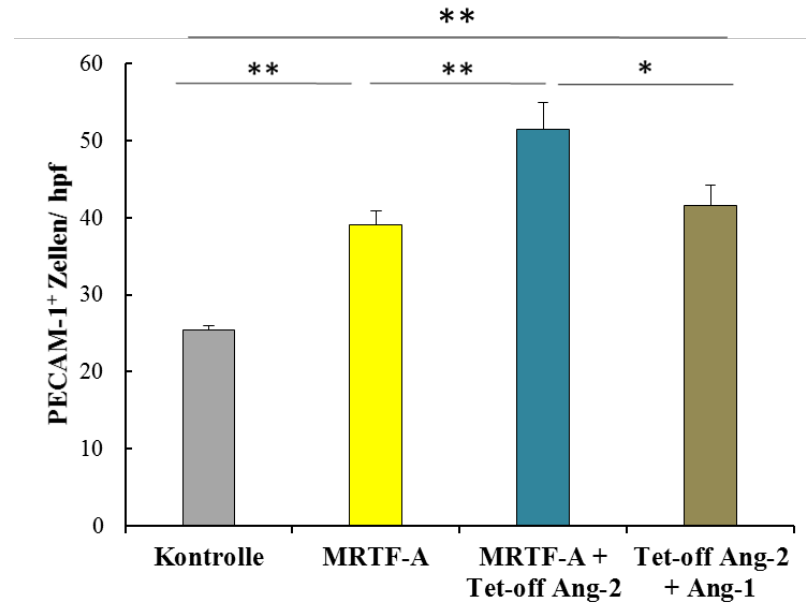


Abbildung 19: Potential der frühen Destabilisierung für die Kapillarisation *in vivo*. Mit MRTF-A + Tet-off Ang-2 konnte eine hoch signifikante, 1,3-fache Steigerung der Angiogenese im Vergleich zur MRTF-A Gruppe erzielt werden. Tet-off Ang-2 + Ang-1 Tiere konnten diesen Effekt nicht erreichen und blieben auf MRTF-A Niveau, zeigten jedoch hoch signifikant mehr Kapillaren als die Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.4.2 Analyse der Kapillarreifung mittels Doppelimmunofluoreszenzhistochemie

Die Untersuchungen der Perizytdichte ergaben eine hoch signifikante Steigerung für das MRTF-A + Tet-off Ang-2-behandelte Gewebe gegenüber dem Gewebe der MRTF-A Gruppe ($31,4 \pm 1,3$ NG-2⁺ Zellen/ hpf vs. $22,0 \pm 1,5$ NG-2⁺ Zellen/ hpf). Im Vergleich zur Tet-off Ang-2 + Ang-1 Gruppe war noch eine signifikante Steigerung zu beobachten ($25,7 \pm 1,1$ NG-2⁺ Zellen/ hpf). In Tet-off Ang-2 + Ang-1-therapierten Tieren wurden zwar hoch signifikant mehr Perizyten rekrutiert als in Kontrolltieren ($8,0 \pm 0,4$ 1 NG-2⁺ Zellen/ hpf), jedoch zeigte sich keine signifikante Erhöhung zu Tieren mit alleiniger MRTF-A Therapie (siehe Abbildung 18 und Abbildung 20).

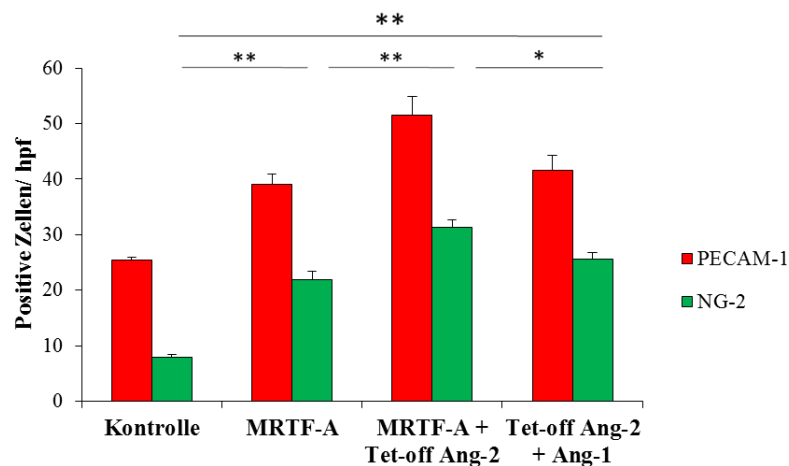


Abbildung 20: Potential der frühen Destabilisierung für Kapillarisation und Perizytenrekrutierung *in vivo*. MRTF-A + Tet-off Ang-2 induzierte eine hoch signifikant gesteigerte Perizyten-dichte als es mit bloßer MRTF-A Verabreichung möglich war (ca. Faktor 1,4). Tet-off Ang-2 + Ang-1 rekrutierte signifikant weniger Perizyten als in Kombination mit MRTF-A, zeigte jedoch hoch signifikant mehr Perizyten als die Kontrolle, vergleichbar mit Werten der MRTF-A Gruppe (Mittelwert \pm Standardfehler, *p < 0,05, **p < 0,001).

Für das Verhältnis von Perizyten zu Kapillaren ergab sich eine signifikante Steigerung in der MRTF-A + Tet-off Ang-2 Gruppe gegenüber den MRTF-A-behandelten Tieren ($0,65 \pm 0,04$ vs. $0,56 \pm 0,03$). Auch mit Tet-off Ang-2 + Ang-1 konnte die Gefäßstabilisierung im Vergleich zu MRTF-A signifikant erhöht werden ($0,65 \pm 0,03$). Zwischen den beiden Kombinationsgruppen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden (siehe Abbildung 18 und Abbildung 21).

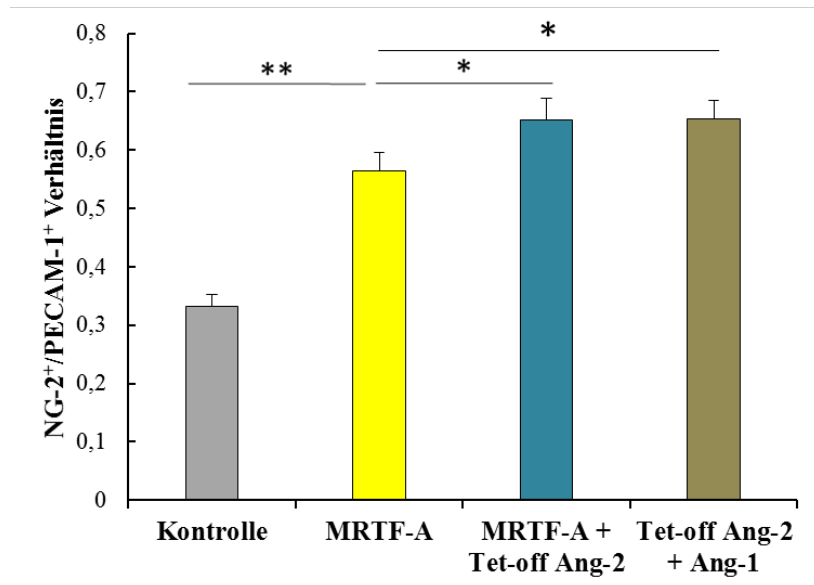


Abbildung 21: Potential der frühen Destabilisierung für die Gefäßmaturierung *in vivo*. Beide Kombinationsgruppen waren in der Lage den bereits durch MRTF-A erzielten Effekt auf die Reifung der Kapillaren um ca. das 1,2-fache signifikant zu erhöhen. Zwischen diesen Gruppen ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied ausmachen, die Niveaus der Gefäßreifung waren nahezu identisch (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.4.3 Analyse des Kollateralwachstums mittels Angiographie

Bei der Beurteilung der Arterioneogenese fand sich eine signifikante Zunahme in der Gruppe der MRTF-A + Tet-off Ang-2-behandelten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe (138 ± 12 % zu Tag 7 vs. 101 ± 3 % zu Tag 7), jedoch kein signifikanter Unterschied zur MRTF-A Gruppe (153 ± 4 % zu Tag 7). Tiere mit Tet-off Ang-2 + Ang-1 transduziertem Gewebe zeigten lediglich eine Kollateralisierung des Oberschenkels auf Kontrollniveau (94 ± 8 % zu Tag 7) und wiesen signifikant weniger Kollateralen als die Kombination mit MRTF-A und sogar hoch signifikant weniger Kollateralgefäße im Vergleich zur alleinigen MRTF-A Applikation auf (siehe Abbildung 22 und Abbildung 23).

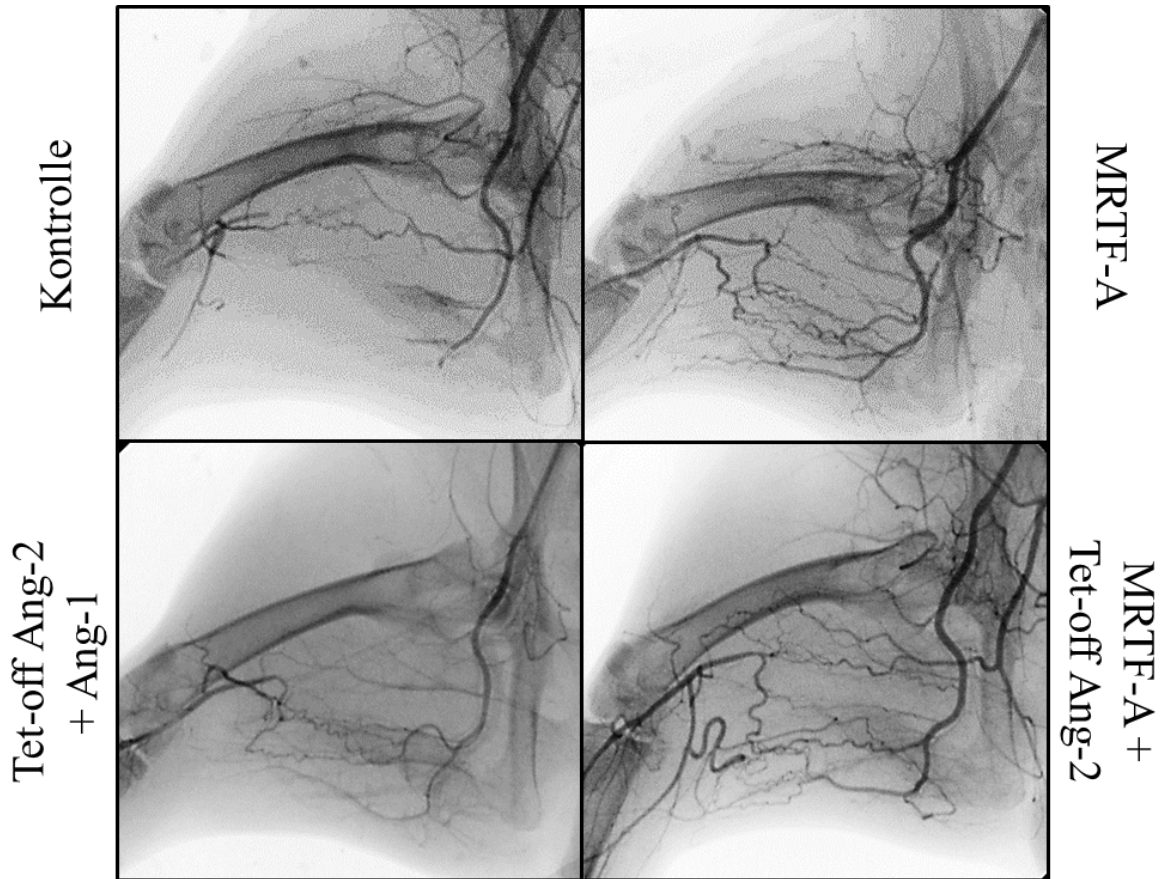


Abbildung 22: Angiographische Aufnahmen des Oberschenkels an Tag 35 nach Versuchsbeginn zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse. Zu erkennen ist ein gut ausgeprägtes Netz aus Kollateralgefäßen in MRTF-A-behandelten Tieren (sowohl ledig als auch in Kombination mit Tet-off Ang-2). Kontrollen und Tet-off Ang-2 + Ang-1-therapierte Tiere zeigen hingegen eine eher spärliche Ausbildung von Umgehungskreisläufen. In der Tet-off Ang-2 + Ang-1 Gruppe sind zwar Ansätze zu sehen, diese erscheinen jedoch zart und brüchig.

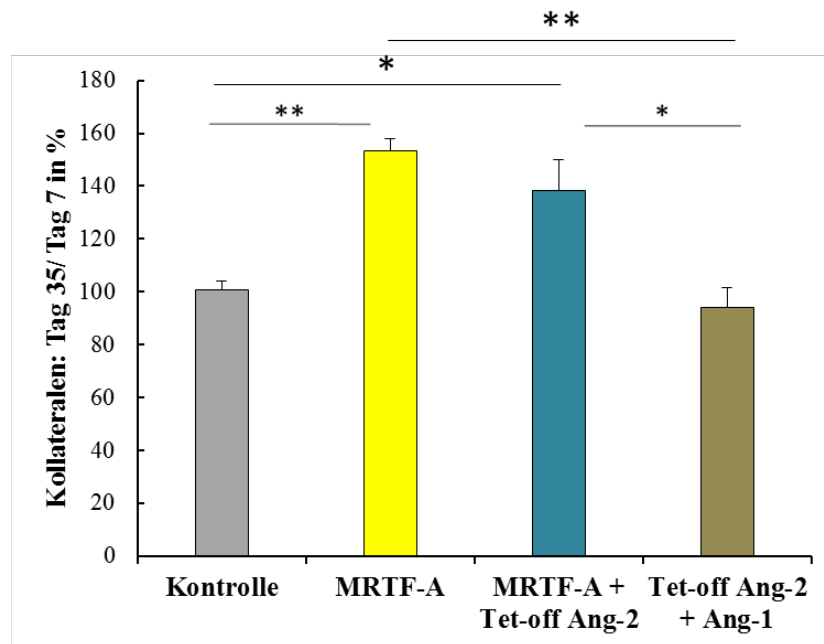


Abbildung 23: Potential der frühen Destabilisierung für die Kollateralisierung *in vivo*. Die Kombination aus MRTF-A + Tet-off Ang-2 zeigte eine signifikante Erhöhung der Arteriogenese über das Kontrolllevel hinaus (ca. Faktor 1,4). Verglichen mit MRTF-A alleine gab es in dieser Gruppe jedoch keinen signifikanten Unterschied und somit auch keine Verbesserung des Effekts. Tet-off Ang-2 + Ang-1 bewirkte nur eine Kollateralisierung auf Kontrollniveau (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

3.4.4 Analyse der Blutflussgeschwindigkeit mittels Cinedensitometrie

Die funktionelle Evaluation des neu entstandenen Gefäßsystems in den unterschiedlichen Gruppen ergab für die Blutflussgeschwindigkeit folgende Ergebnisse.

MRTF-A + Tet-off Ang-2-behandelte Tiere zeigten eine signifikante Verbesserung des Blutflusses gegenüber Kontrolltieren (220 ± 52 % zu Tag 7 vs. 98 ± 6 % zu Tag 7) und befanden sich damit auf einem vergleichbaren Level mit der MRTFA Gruppe (202 ± 21 % zu Tag 7). Die operierten Beine der Tet-off Ang-2 + Ang-1 Gruppe waren signifikant schlechter perfundiert als die MRTF-A-behandelten Extremitäten (ledig und kombiniert mit Tet-off Ang-2). Die Werte befanden sich eher im Kontrollbereich (95 ± 14 % zu Tag 7) (siehe Abbildung 24).

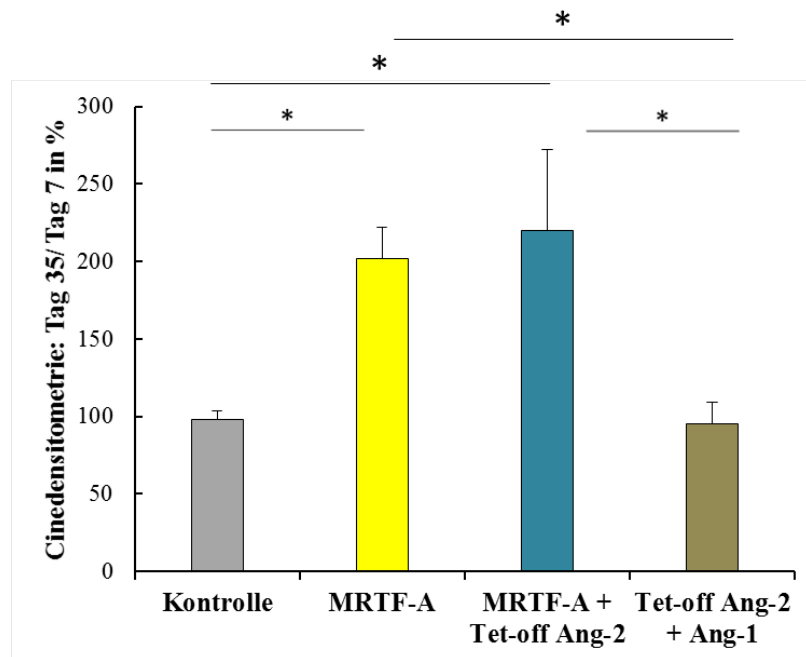


Abbildung 24: Potential der frühen Destabilisierung für die Durchblutung *in vivo*. Mit MRTF-A + Tet-off Ang-2 wurde eine signifikante Verbesserung des Blutflusses, ähnlich wie mit bloßer MRTF-A Verabreichung, erreicht (ca. Faktor 2,2). Tet-off Ang-2 + Ang-1-behandelte Tiere zeigten eine signifikant schlechtere Durchblutung als die beiden Gruppen unter MRTF-A Einfluss, eine Zunahme jenseits des Kontrolllevels blieb bei dieser Kombination aus (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$).

3.5 Strukturelle Effekte von MRTF-A *in vivo*

MRTF-A steht u.a. in der Kritik mit muskulärer Hypertrophie und Fibrose assoziiert zu sein [205, 206]. Vor allem das in der Signalkaskade nachgeschaltete CCN-2 (CTGF) stützt diese Hypothese aufgrund des proliferativen Einflusses auf die Extrazellulärmatrix [207]. Eine nähere Betrachtung dieser beiden Aspekte schien daher lohnenswert, um neben den identifizierten positiven Effekten auch mögliche Risiken und Schäden einer MRTF-A Therapie zu berücksichtigen. Da Angiotensin-2 aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf myofibroblastische Zellen diese Prozesse beeinflussen könnte, wurden auch Gruppen, in denen MRTF-A mit Angiotensin-2 kombiniert wurde, in die Untersuchung miteinbezogen. Als Material für die histologischen Analysen wurden exemplarisch Querschnitte des M. gastrocnemius verwendet.

3.5.1 Quantifizierung von Fibrose mittels Picro-Siriusrot Färbung

Zur Quantifizierung von Fibrose diente die Piko-Siriusrot Färbung, die kollagenes Bindegewebe rot markiert. In den lichtmikroskopischen Aufnahmen wurde der kollagene Flächenanteil im Verhältnis zur gesamten Gewebsfläche gemessen und in Prozent angegeben. In allen Gruppen war der Anteil an Kollagen zum Gesamtgewebe vergleichbar hoch. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen identifizieren (Kontrolle: $8,1 \pm 0,6$ %; MRTF-A: $7,3 \pm 0,4$ %; MRTF-A + Ang-2: $7,8 \pm 0,5$ %; MRTF-A + Tet-off ang-2: $7,1 \pm 0,7$ %) (siehe Abbildung 25 und Abbildung 26).

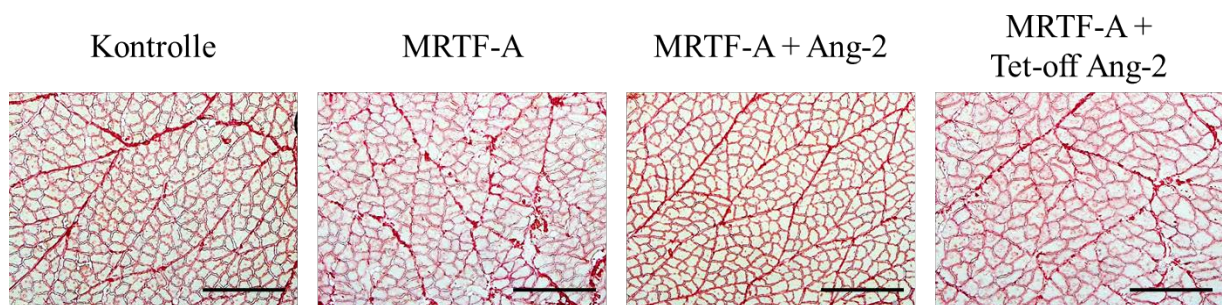


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten des M. gastrocnemius zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse. Kollagenes Bindegewebe ist Siriusrot angefärbt. In keiner der Behandlungsgruppen ließen sich vermehrte Anzeichen von Fibrose im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Die Ausschnitte wurden in 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 400 μm .

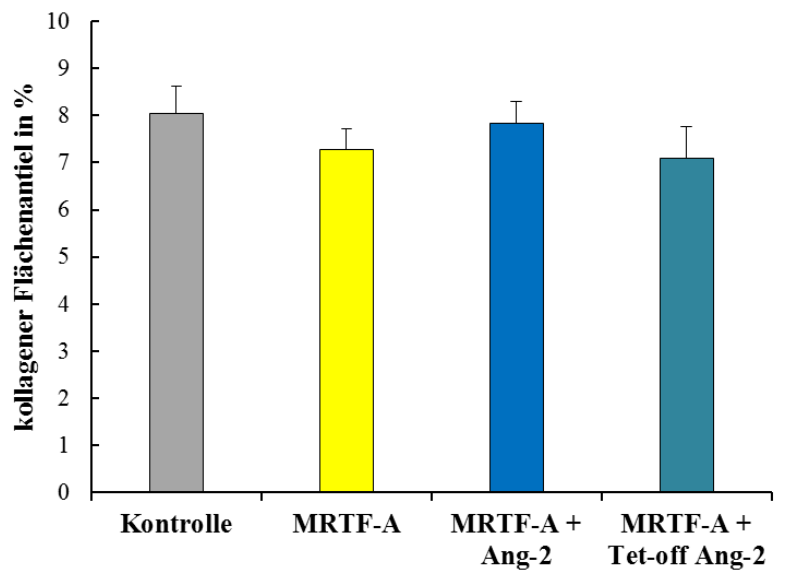


Abbildung 26: Einfluss von MRTF-A und Angiopoietin-2 auf den fibrotischen Umbau von ischämischem Muskelgewebe. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen aufdecken. Weder MRTF-A noch Angiopoietin-2 scheinen eine nennenswerten Wirkung auf die Fibrosierung von Skelettmuskelgewebe zu haben (Mittelwert \pm Standardfehler).

3.5.2 Quantifizierung von Hypertrophie mittels WGA-Färbung

Mit der WGA-Färbung lassen sich allgemein Zellmembranen anfärben. So konnten die Querschnittsflächen einzelner Muskelfasern eingegrenzt und in μm^2 ausgemessen werden. MRTF-A-behandelte Tiere wiesen hoch signifikant größere Muskelfaserquerschnitte auf als Kontrolltiere ($1502 \pm 44 \mu\text{m}^2$ vs. $1053 \pm 25 \mu\text{m}^2$). Auch die MRTF-A + Ang-2 Gruppe zeigte hoch signifikant kleinere Querschnittsflächen als MRTF-A Tiere ($1013 \pm 37 \mu\text{m}^2$) und befand sich damit auf Kontrollniveau. In der MRTF-A + Tet-off Ang-2 Gruppe waren die Faserquerschnittsflächen signifikant größer ($1349 \pm 47 \mu\text{m}^2$) verglichen mit Kontrollmuskeln und der Kombination ohne Tet-off System, allerdings zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu Tieren mit bloßer MRTF-A Applikation (siehe Abbildung 27 und Abbildung 28).

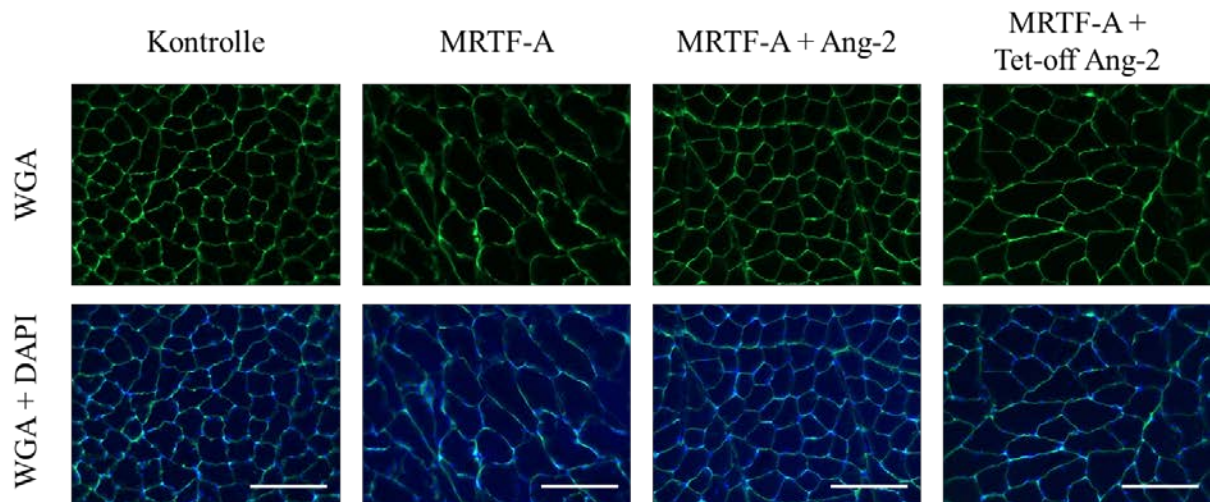


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten des *M. gastrocnemius* zur repräsentativen Darstellung der Ergebnisse. Die Zellmembranen wurden mit grün-fluoreszierendem WGA markiert. Zu sehen sind deutlich größere Faserquerschnittsflächen in MRTF-A- und MRTF-A + Tet-off Ang-2-behandelten Tieren verglichen mit dem Gewebe aus Kontroll- und MRTF-A + Ang-2 Gruppe. Die Ausschnitte wurden in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

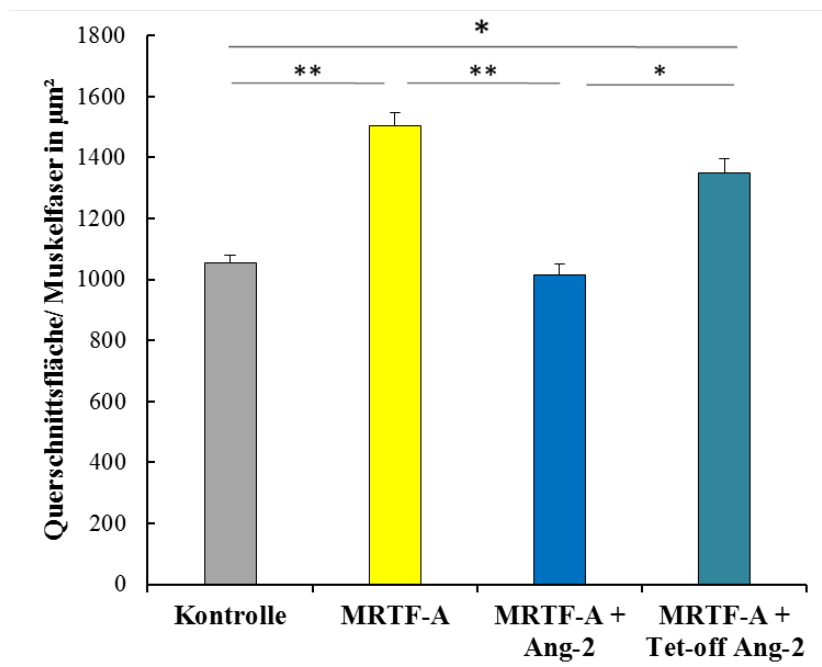


Abbildung 28: Einfluss von MRTF-A und Angiotensin-II auf die Hypertrophie von ischämischem Muskelgewebe. MRTF-A führte zu einer ca. 1,5-fachen, hoch signifikanten Vergrößerung der Muskelfaserquerschnitte gegenüber Kontroll- und MRTF-A + Ang-2 Tieren. In MRTF-A + Tet-off

Ang-2-transduziertem Muskelgewebe fand sich eine signifikante Zunahme im Vergleich zu diesen beiden Gruppen, jedoch keine signifikante Minderung der Querschnittsfläche gegenüber der MRTF-A Gruppe (Mittelwert \pm Standardfehler, * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

4 Diskussion

4.1 Potential von MRTF-A in der Gefäßneubildung

Erste konkrete Hinweise auf ein therapeutisches Potential von MRTF-A in der chronischen Ischämie ergaben sich aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe. Zunächst konnten durch regionale Applikation von embryonalen endothelialen Progenitorzellen (eEPCs) protektive Effekte in Ischämie modellen des Schweineherzens und Kaninchenhinterlaufs erzielt werden [33, 158]. In späteren Untersuchungen wurde diese Wirkung zum Teil auf eine funktionelle Neovaskularisierung zurückgeführt, die durch parakrine Sekretion von Thymosin-beta-4 aus den injizierten eEPCs induziert wurde [208]. Tβ4 zeigte sich als ein wesentlicher vorgeschalteter Regulator der MRTF/SRF Achse, weil es im Zytosol der meisten Zellen das wichtigste Aktin-bindende Peptid darstellt [155]. Da jedoch keine unmittelbare transkriptionelle Aktivität von Tβ4 bekannt ist, lag die Vermutung nahe, dass Tβ4 seine Wirkung über MRTF-A entfalten könnte. In einer großen aktuellen Studie unserer Gruppe wurden diese Einzelbefunde gezielt nachgeprüft, auf ihren Zusammenhang hin untersucht und zu einem mechanistischen Konzept zusammengefasst [187]. Es zeigte sich, dass die pro-angiogenen Effekte von Tβ4 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die Ko-Applikation von MRTF shRNA inhibiert wurden. Die lokale Therapie ischämischer Schweineherzen und Hinterläufe von Maus und Kaninchen durch einen Tβ4-überexprimierenden Adeno-assoziierten viralen Vektor zeigte in allen Modellen funktionelle Verbesserungen [187]. Diese Ergebnisse stützten damit die bisherige Vermutung einer Rolle von MRTF-A in der Tβ4-vermittelten Gefäßneubildung. In der vorliegenden Arbeit sollte nun, als Vergleich zu der bereits gut studierten Funktion Tβ4s, die Wirkung von rAAV.MRTF-A im chronischen Ischämie modell des Kaninchenhinterlaufs untersucht werden.

Tatsächlich konnte MRTF-A die Wirkung von Tβ4 in allen essentiellen Aspekten der therapeutischen Neovaskularisierung reproduzieren. Auf Ebene der Mikrozirkulation erreichten wir mithilfe von MRTF-A nicht nur ein ausgeprägteres Kapillarnetz als in den Kontrollen, sondern auch eine verbesserte Maturierung der kleinen Gefäße durch gesteigerte Perizytenanlagerung (siehe Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14). Eine Förderung der Gefäßmaturierung durch MRTF-A konnte mittlerweile auch von der Arbeitsgruppe um Eric Small bestätigt werden [209]. Im Hinblick auf die Makrozirkulation zeigte eine solide Kollateralisierung den Einfluss von MRTF-A auf die Arteriogenese (siehe Abbildung 16).

Damit konnten die drei morphologischen Kriterien einer therapeutischen Neovaskularisierung bereits durch die alleinige Applikation dieses Faktors erfüllt werden. Dass es sich dabei nicht um dysfunktionale Gefäße handelte, wurde durch Messungen des Blutflusses gezeigt, die deutlich besser ausfielen als in den Kontrolltieren (siehe Abbildung 17). Analog dazu konnten wir ähnliche Erfolge von MRTF-A in den ischämischen Schweineherzen und Maushinterläufen erzielen [187]. Eine funktionelle Neovaskularisierung scheint also neben Tß4 auch direkt mit MRTF-A induzierbar zu sein. Da die Überexpression von MRTF-A im Vergleich zu Tß4 eine unmittelbare transkriptionelle Konsequenz zur Folge hat und das Signal nicht erst über das vielfach beeinflussbare G-Aktin übermittelt werden muss, ist MRTF-A wohl die bessere Wahl für eine gezielte Therapie.

4.2 Potential der frühen Destabilisierung in der Gefäßneubildung

Das Konzept der frühen Destabilisierung wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt mit dem Ziel eine therapeutische Neovaskularisierung durch gezielte Modulation der Gefäßmaturierung zu erreichen. In der Theorie sollen Kapillaraussprossung und –wachstum durch die verminderte Anlagerung von Perizyten und Auflockerung des perivaskulären Bindegewebes in der Frühphase der Angiogenese gefördert werden. Diese Hypothese wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits in einer aktuellen Publikation untersucht [192].

Darin konnten Qin et al. in Ringformation-Assays und im Mausmodell der chronischen Ischämie des Hinterlaufs das starke inhibitorische Potential von Angiopoietin-2 auf die Gefäßmaturierung zeigen. Die gefäßdestabilisierende Wirkung konnte von anderen Gruppen bestätigt werden [138], Reiss et al. stellten sogar eine relevante Beeinträchtigung der funktionellen postischämischen Revaskularisierung durch Ang-2 fest [210]. Ang-2 minderte jedoch nicht die angiogene Antwort, im Gegenteil zeigte es in Anwesenheit bestimmter pro-angiogener Faktoren (VEGF, Apelin [211]) eine Augmentation der positiven Effekte auf die Kapillaraussprossung [192]. In Kombination mit Ang-1 inhibierte Ang-2 aufgrund der kompetitiven Hemmung am Tie-2-Rezeptor allerdings zusätzlich die Ringformation, da Ang-1 neben der gefäßstabilisierenden [212] zumindest *in vitro* auch eine Endothel-aktivierende Komponente aufweist. Funktionell konnte Ang-1 allein jedoch nicht überzeugen. Die Arbeitsgruppe um Koh konnte allerdings mit der Kombination aus Ang-1 (stabilisierend) und VEGF (destabilisierend, pro-angiogen) vielversprechende Erfolge in der therapeutischen Neovaskularisierung erzielen [213]. Einzeln appliziert würde eine zu einseitige, Perizyten-rekrutierende (Ang-1) oder Perizyten-hemmende – wenn auch pro-angiogene - Wirkung

(Ang-2, VEGF) einen funktionellen Effekt unterbinden [214]. In unseren Vorarbeiten führte die Ko-Applikation entweder zweier stabilisierender (Apelin und Ang-1) oder zweier destabilisierender (Ang-2 und VEGF) Faktoren ebenso zu keiner nennenswerten Neovaskularisierung [192]. Im ersten Fall wird eine zu starke Perizytenanlagerung, die zur „Einmauerung“ des wachsenden Gefäßastes führen könnte, verantwortlich gemacht, im zweiten Fall führt die gesteigerte Instabilität wahrscheinlich zur Regression der neuen Kapillaren im Verlauf. Tatsächlich gelang es uns in Vorversuchen am Mausmodell mithilfe dieser beiden Wachstumsfaktoren und dem Konzept der frühen Destabilisierung und späten Stabilisierung des wachsenden Gefäßnetzes eine potente Neovaskularisierung hervorzurufen [192], analog zu weiteren Tierstudien [215, 216].

Aufgabe vorliegender Arbeit war es nun, die Ang-1-auf-Ang-2-vermittelte Neovaskularisierung in einem stabileren Tiermodell zu überprüfen. Dafür bot sich das chronische Ischämiemodell am Kaninchenhinterlauf an, das in unserer Gruppe schon langjährig zur Anwendung kommt [110, 185-187]. Es bietet gewisse Vorteile gegenüber dem Mausmodell. Zunächst ist die Ischämie im Kaninchen ab einem gewissen Zeitpunkt eher statisch. Innerhalb von ca. sieben Tagen kommt es physiologisch weitestgehend zum Stillstand der funktionellen Revaskularisierung mit Erreichen von bis zu 40% der Ausgangsperfusion [71]. Nachfolgende Veränderungen sind dann vor allem durch Interventionen bedingt und können ab diesem Zeitpunkt gut mit dem Ist-Zustand an Tag 7 verglichen werden. Nekrosen bleiben aufgrund der gut ausgeprägten Baseline-Kollateralisierung in der Regel aus [58]. Im dynamischen Mausmodell lässt sich eher das Maß der Veränderung im Verlauf vergleichen, da es nicht zu einem stabilen Plateau des ischämischen Zustandes kommt [217]. Auch fällt die Regeneration hier sehr unterschiedlich aus, von Nekrosen bis hin zur Restitution über das Ausgangsniveau hinaus konnte bereits alles beobachtet werden. Die Ischämieinduktion im Kaninchen ist aufgrund der Exzision ganzer Gefäßstücke effektiver und weniger fehlerbehaftet als durch bloße Ligatur in der Maus [218]. Schließlich ermöglicht das Kaninchenmodell eine differenziertere Untersuchung der Neovaskularisierung, da sich zwei Kompartimente unterscheiden lassen: der ischämische Unterschenkel bietet Raum zur Analyse der Hypoxie-induzierten mikrozirkulatorischen Prozesse während im nicht-ischämischen Oberschenkel die durch Scherspannung induzierte Arteriogenese mithilfe von Angiographien genauer betrachtet werden kann [188]. Trotz der höheren Kosten und der aufwändigeren Forschung entschlossen wir uns daher für das Kaninchenmodell zur weiteren Untersuchung der chronischen Ischämie des Skelettmuskels. In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich wie erwartet, dass die frühe Destabilisierung mit

Ang-2 und die späte Stabilisierung mit Ang-1 zu einer verstärkten, angiogenen Antwort mit verbesserter konsekutiver Perizytenrekrutierung führt. Das Resultat ist ein gut ausgebildetes mikrozirkulatorisches Gefäßnetz, das in Kapillarierungs- und Maturierungsgrad mindestens mit den Effekten des hochpotenten MRTF-A vergleichbar ist (siehe Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21). Allerdings blieben Effekte auf die Kollateralisierung und damit leider auch eine funktionelle Verbesserung aus (siehe Abbildung 23, Abbildung 24). Momentan fallen Erklärungsversuche für dieses Phänomen schwer, da noch wenig über die Interaktion zwischen Mikro- und Makrozirkulation bekannt ist. Im nächsten Kapitel wird auf dieses Thema näher eingegangen und eine unserer Ansicht nach denkbare Version präsentiert. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in der Maus und im Kaninchen lässt folgende Vermutung zu. Angiopoietine sind vor allem für ihre Wirkung auf die Angiogenese und Maturierung kleiner Gefäße bekannt, die Datenlage zu ihrem Beitrag in der Modulation der Arteriogenese ist eher ernüchternd. In der Maus scheint ihr Effekt relevanter zu sein, da viel kleinere Gefäße als im Kaninchen (geschweige denn im Menschen) bereits eine Perfusionsverbesserung hervorrufen. Für die Induktion großer Konduktanzgefäße scheinen Angiopoietine nicht potent genug zu sein. Die Umbauprozesse größerer Gefäße sind ungleich komplexer und dauern länger, da das Zusammenspiel vieler Zellen geregelt werden muss. Die Maturierung durch glatte Gefäßmuskulzellen ist ein noch schlecht verstandener Prozess, es könnte z.B. ein ganz anderer zeitlicher Rahmen für die Modulation durch Maturierungsfaktoren relevant sein als bei Perizyten. Das Konzept der frühen Destabilisierung mithilfe von Angiopoietinen konnte sich daher in einem translationalen Modell der chronischen Ischämie bislang noch nicht bewähren.

4.3 Von der Mikro- zur Makrozirkulation: Rolle der Gefäßmaturierung

Die Interaktion zwischen mikro- und makrozirkulatorischen Komponenten der Gefäßneubildung ist bislang ein weitestgehend unerforschtes Terrain. In den meisten hochrangigen Reviews zu diesem Thema wird vor allem die Bedeutung der Angiogenese und Arteriogenese für eine erfolgreiche Neovaskularisierung hervorgehoben. Der Einfluss der Gefäßmaturierung wird oft nur am Rande erwähnt. Im Folgenden soll daher vor allem auf diesen Aspekt des Gefäßwachstums eingegangen und dessen Rolle für den Gesamtprozess der Gefäßneubildung entschlüsselt werden.

Verstärkte Aufmerksamkeit erlangte das Feld der Perizytenrekrutierung und Gefäßstabilisierung mit den ersten unzufriedenstellenden klinischen Ergebnissen des wohl

bekanntesten pro-angiogenen Faktors VEGF. Dieser zeigte in seiner Anwendung zur Therapie der kritischen Extremitätenischämie nur mäßige Erfolge, die zum Teil auf Permeabilitäts erhöhungen mit konsekutiver Ausbildung von Ödemen zurückgeführt wurden [114]. Greenberg et al. konnten anschließend in einer wichtigen experimentellen Studie die destabilisierende Wirkung von VEGF belegen und damit auf die Wichtigkeit einer effektiven Perizytenrekrutierung hinweisen [214]. Vorarbeiten unserer Gruppe konnten durch die Kombination von VEGF-A mit PDGF-B, einem wichtigen Faktor der Gefäßmaturierung, eine merkliche funktionelle Verbesserung der therapeutischen Neovaskularisierung mittels augmentierter Perizytenanlagerung erreichen [110]. Die Verbesserung ging mit einer deutlichen Erhöhung des Kollateralisierungsgrades einher, wofür es zwei plausible Erklärungen gibt. Zum einen wäre ein direkter Effekt von PDGF auf glatte Gefäßmuskelzellen und damit die kollateralen Umbauprozesse denkbar [219]. Angiogenese und Arteriogenese könnten dann als isoliert voneinander ablaufende Prozesse angesehen werden. Zum anderen könnte das hoch entwickelte und ausgereifte Kapillarnetz die Arteriogenese fördern. Ein Erklärungsansatz für diese Hypothese wäre eine Erhöhung des Blutflusses und damit der Scherspannung, die als wesentlicher Trigger des Kollateralwachstums gilt, durch die Verminderung des kapillären Gefäßwiderstands gemäß dem Ohm'schen Gesetz. Die Arbeitsgruppe um Schaper erzielte mit diesem Prinzip eine enorme Induktion der Arteriogenese, indem der periphere Widerstand durch eine Ableitung des arteriellen Blutflusses über einen AV-Shunt gesenkt wurde [220].

Weitere Untersuchungen unserer Gruppe erbrachten Erkenntnisse in dieser Thematik. Hierfür eigneten sich T β 4 und MRTF-A besonders, die zu den wenigen Faktoren gehören, mit deren Hilfe eine potente Neovaskularisierung durch Aktivierung der drei Kernprozesse Angiogenese, Maturierung und Arteriogenese induzierbar ist [187]. Zunächst zeigte die Kopplung T β 4s mit dem NO-Synthase-Inhibitor L-NAME eine isolierte Verhinderung der Arteriogenese mit konsekutivem Ausbleiben einer Durchblutungsverbesserung. NO ist als wichtiger pro-arteriogener Faktor bekannt, der die Scherspannung erheblich zu erhöhen vermag, und scheint daher in der T β 4-vermittelten Neovaskularisierung eine essentielle Rolle zu spielen [221]. Des Weiteren erbrachte im Kaninchenmodell die isolierte Applikation von T β 4 in den Unterschenkel (US) genauso gute Erfolge wie bei einer Transduktion der gesamten Beinmuskulatur. Hingegen waren isolierte Applikationen in den Oberschenkel (OS) kaum wirksam, wodurch ebenso die Auffassung gestützt wird, dass die im nicht-ischämischen Areal ablaufende Arteriogenese durch die im ischämischen US stattfindenden Prozesse reguliert wird, vermutlich über NO [187]. Um diesen verblüffenden Ergebnissen weiter nachzugehen,

wurde durch die Ko-Applikation von T β 4 und Ang-2 in den US eine gezielte Inhibition der Perizytenrekrutierung bewirkt, um die Auswirkung auf die therapeutische Neovaskularisierung zu überprüfen. Überraschenderweise inhibierte diese Kombination nicht nur die Perizytenanlagerung, sondern auch die Angiogenese und sogar die Arteriogenese und damit die Perfusion. Der Erfolg der T β 4-vermittelten Neovaskularisierung schien also maßgeblich von einer geglückten Maturierung des Kapillarnetzes abzuhängen. Ohne die Ausbildung einer reifen, gut ausgebauten Mikrozirkulation sind die Voraussetzungen für ein verbessertes Kollateralwachstum offensichtlich nicht erfüllt.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse für die Kombination von MRTF-A und Ang-2 validiert und bestätigt werden (siehe Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 16, Abbildung 17). Auch hier zeigte sich die perivaskuläre Funktion der Perizyten als essentiell für einen funktionellen Effekt der Gefäßneubildung. Mit Bezug auf die im Kaninchenmodell bislang erfolglose Anwendung der frühen Gefäßdestabilisierung wurde ein Augmentationsversuch der MRTF-A Wirkung mit früher Ang-2 Überexpression gestartet. Damit wurde die quantitativ stärkste Kapillarisation und Maturierung unter allen Versuchsgruppen erreicht (siehe Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21). Allerdings ließ sich der Effekt auf die Arteriogenese und den Blutfluss nicht weiter steigern, sodass der maximal mögliche therapeutische Effekt in der post-ischämischen Revaskularisierung mit MRTF-A alleine momentan ausgeschöpft ist (siehe Abbildung 23, Abbildung 24). Es sei nochmals herausgehoben, dass die kontinuierliche Inhibition der Perizytenrekrutierung durch Ang-2 Überexpression die potente Wirkung von MRTF-A auf Mikro- und Makrozirkulation vollständig unterbinden konnte, während die nur kurze Destabilisierung in der Induktionsphase der Gefäßneubildung den Effekt – zumindest auf die Mikrozirkulation – eher augmentierte. Durch gezielte Modulation der Perizytenfunktion konnte folglich ein starker Einfluss auf den Gesamtprozess der therapeutischen Neovaskularisierung ausgeübt werden. Der Schlüssel für eine funktionelle Verbesserung über Kollateralgefäße scheint ein optimales Verhältnis aus Angiogenese und Maturierung zu sein, das durch MRTF-A offenbar erzielt werden kann. Die Ergebnisse mit früher Ang-2 und später Ang-1 Überexpression zeigen uns jedoch, dass eine gut ausgebaute Mikrozirkulation kein Garant für eine bessere Makrozirkulation ist. Für die Übersetzung über dieses sogenannte Rückwärtssignal scheinen weitere Faktoren wie NO und Scherspannung eine Rolle zu spielen. Offensichtlich ist die Ang-1-auf-Ang-2-Kombination nicht in der Lage, diese Mechanismen anzusprechen wie MRTF-A und T β 4. Ob eine direkte Wirkung der frühen Destabilisierung auf die Kollateralgefäße zum Erfolg geführt hätte, ist bislang unklar, da die Applikation der Faktoren

stets regional in den US erfolgte. Dies könnte jedoch eine weitere Erklärung für die Funktionalität im Mausmodell sein, da hier das gesamte Bein behandelt wurde. Die Ergebnisse um den Einfluss der Gefäßmaturierung auf die therapeutische Neovaskularisierung mittels MRTF-A Überexpression sind daher nicht ohne weiteres auf den Wirkmechanismus anderer Faktoren zu verallgemeinern. Weitere Forschung wird nötig sein, um das Zusammenspiel von Angiogenese, Gefäßmaturierung und Arteriogenese sowie die Rolle verschiedener Signalkaskaden für den Prozess der funktionellen Gefäßneubildung vollends zu verstehen.

4.4 Hypertrophie und Fibrose: Probleme von MRTF-A

Bisher wurde die MRTF/SRF Achse vor allem mit Blick auf die potente Induktion einer therapeutischen Neovaskularisierung diskutiert. Ein Großteil der Erkenntnisse über MRTF-A und dessen für Angiogenese und Maturierung essentiellen Zielgene CCN-1 und CCN-2 stammt jedoch aus Kontexten, die sich für den Einsatz in der chronischen Ischämie als limitierend erweisen könnten. Die zwei wichtigsten Probleme, die in Bezug auf post-ischämische Umbauprozesse mit MRTF assoziiert wurden, sind Fibrose und muskuläre Hypertrophie.

MRTF-A wurde bereits eindringlich im Zusammenhang mit der Differenzierung von Myofibroblasten beschrieben, die die Narbenbildung maßgeblich induzieren können [144]. Sie haben eine große Ähnlichkeit mit Perizyten und werden sogar manchmal mit diesen gleichgesetzt, sodass die oben beschriebene zentrale Rolle der Perizyten im Wirkmechanismus der MRTF-A-vermittelten Neovaskularisierung plausibel erscheint [48]. Da die Expression des Maturierungsfaktors CCN-2, der auch als „Connective Tissue Growth Factor“ (CTGF) bekannt ist, durch MRTF-A reguliert wird, ist eine Induktion von potentiellen fibrotischen Veränderungen über CCN-2 denkbar [222]. Erhöhte CCN-2 Level wurden im Hinblick auf das kardiovaskuläre System vor allem in post-ischämischen fibrotischen Umbauprozessen des Herzens beobachtet. Eine unmittelbare Induktion dieser Prozesse durch CTGF ist jedoch umstritten und als Kontext- und Dosis-abhängig anzusehen [223]. Die eigenen Ergebnisse dieser Arbeit konnten kein verstärktes fibrotisches Potential der MRTF/SRF Achse im Skelettmuskel feststellen (siehe Abbildung 26). Auch in den Schweinmodellen unserer Gruppe stellte sich MRTF-A eher als kardioprotektiv heraus und verhinderte eine übermäßige Narbenbildung (Hinkel et al., unpublizierte Daten). Tatsächlich wäre eine Limitierung der Bindegewebsproduktion durch MRTF-A denkbar, nämlich über die

Hochregulation des anti-fibrotisch wirksamen CCN-1 [224]. Grundsätzlich scheint es aber sinnvoll zu sein, den Aspekt der Fibrose als potentielle unerwünschte Wirkung beim Einsatz von Perizyten-modulierenden Faktoren zur Bekämpfung der chronischen Ischämie in Erwägung zu ziehen.

Die zweite negativ bewertete, strukturelle Veränderung im post-ischämischen „Remodelling“ ist die muskuläre Hypertrophie. Die Kontribution von MRTF-A in diesem Prozess ist wenig erforscht und scheint, wenn überhaupt, eher im Herzen Bedeutung zu haben [148]. CTGF zeigte sich allerdings im Zusammenhang mit kardialer Hypertrophie vor allem protektiv [225], sodass eine relevante Induktion hypertropher Muskelveränderungen über die MRTF/SRF Achse weiter angezweifelt werden kann. In den Ergebnissen dieser Arbeit am Skelettmuskel zeigten sich größere Muskelfaserquerschnitte in Tieren, die funktionell erfolgreich therapiert wurden, verglichen mit den Gruppen, die signifikant geringere Blutflüsse aufwiesen (siehe Abbildung 28). Zum einen sollte erwähnt werden, dass der Anteil des atrophen Gewebes aufgrund stärkerer Ischämie in funktionell schlechten Tieren größer und damit der Mittelwert der Faserquerschnittsfläche wesentlich geringer ist. Zum anderen ist die Beanspruchbarkeit der Muskulatur in erfolgreich behandelten Tieren größer, wodurch eine muskuläre Atrophie weitestgehend verhindert wird. Dadurch erscheinen die Fasern der „gesünderen“ Muskulatur auf den ersten Blick zwar hypertroph, sind aber eher normotroph, wie Vergleiche mit nicht-operierten Beinen zeigten (unpublizierte Daten). Die Diskrepanz zwischen den Gruppen sollte also nicht primär auf MRTF-A, sondern auf die Unterschiede in der Perfusion zurückgeführt werden, sonst wäre der geringe Faserdurchmesser auf Kontrollniveau in MRTF-A + Ang-2-behandelten Tieren schwer zu erklären. Eine direkt hypertrophe Wirkung von MRTF-A wäre jedoch im Skelettmuskel ohnehin funktionell eher von Vorteil und lediglich im Herzen unter Umständen problematisch.

4.5 RAAVs in der Gentherapie

RAAVs gehören momentan zu den beliebtesten Vektoren in der kardiovaskulären Gentherapie. Sie vereinen viele vorteilhafte Eigenschaften, denen nur wenige limitierende Aspekte gegenüberstehen. Positiv bewertet werden vor allem die fehlende Humanpathogenität, die hohe Transduktionseffizienz, die geringe Immunogenität und die teils sehr langen Expressionszeiten. Kritiker bemängeln jedoch die geringe Kapazität für genetische Informationen, die hohe Prävalenz neutralisierender Antikörpern im Menschen und den teils noch unspezifischen Gewebetropismus. Dennoch hat unsere Arbeitsgruppe schon seit

Jahren erfolgreich diese Vektoren in unseren kardiovaskulären Krankheitsmodellen eingesetzt [110, 187, 226].

Mit verschiedenen Verfahren wird versucht die Nachteile der AAVs zu mindern, um dem Traum des perfekten Vektors näher zu kommen. Beispielweise gelang es mittels *trans-splicing*, Gene zu fragmentieren und auf mehrere Vektoren aufzuteilen, um somit die maximal transduzierbare genetische Information zu verdoppeln [100] und seit neuestem sogar zu verdreifachen [227]. Ebenso lohnt es sich, das Problem der neutralisierenden Antikörper anzugehen, da deren hohe Prävalenz immerhin zu einem Ausschluss von bis zu 50% der Patienten in klinischen Studien führte [228]. Plasmapherese, Immunsuppression und wiederholte Virusapplikationen werden diskutiert, bleiben jedoch problematisch, da bereits geringe Mengen an Antikörper die Transduktion stark beeinträchtigen können [229]. Eine beliebte Methode ist daher aktuell das „AAV-Shuffling“, das die Elemente der Virushülle aus unterschiedlichen Serotypen rekombiniert. Dabei wird durch Rekombination verschiedener Wildtyp-AAV Serotypen ein den Anforderungen angepasstes Hybrid-Virus hergestellt [106]. AAV9 wird nicht nur seltener durch Antikörper neutralisiert, sondern hat auch einen besseren Tropismus für myozytäre Zellen [108]. Die Effizienz von rAAV2/9 stellte sich für unsere Versuche im Tiermodell als völlig ausreichend heraus [187]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte nach 35 Tagen nicht nur die Überexpression von MRTF-A via rAAV2/9 auf der RNA-Ebene nachgewiesen werden, sondern indirekt auch das Vorhandensein aktiven Proteins durch eine Überexpression der nachgeschalteten Gene CCN-1 und CCN-2 (siehe Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9). Da aber immer noch rund 33 % der Menschen Antikörper gegen das AAV9-Kapsid aufweisen, gibt es weitere Bestrebungen, die Epitope der Viruspartikel zu verändern oder unzugänglich zu machen [230]. Dabei reichen die entwickelten Methoden von „Kapsid-Shuffling“, wobei die Kapside einzelner Serotypen untereinander rekombiniert werden [231], bis hin zur Applikation von AAVs, die an extrazelluläre Vesikel gebunden sind (ev-AAV) [232]. Diese und weitere Verfahren, wie z.B. die Verwendung gewebsspezifischer Promotoren, können auch zur Verbesserung des Tropismus der Viren genutzt werden [233]. In unserer Gruppe gelang uns durch Verwendung Nanopartikel-assoziiertes AAVs die Transduktion vaskulärer Zellen zu verbessern (Lee et al., unpublizierte Daten). Ein stets zu berücksichtigendes Risiko unserer Versuche aufgrund des starken hepatischen Tropismus von AAVs und der Verwendung pro-angiogener Substanzen ist das der Lebermutagenese. In Untersuchungen an der Maus konnte allerdings kein erhöhtes Risiko eines Vektor-induzierten Hepatozellulären Karzinoms festgestellt werden [234]. Regionale Applikationsverfahren (Retroidfusion, intramuskulär) konnten in unseren Versuchen dosisabhängig die

Kontamination anderer Organe weitestgehend verhindern [110]. Systemische Nebeneffekte, die auf die Viren zurückzuführen waren, konnten daher nicht beobachtet werden, sodass der Vektor von uns als relativ sicher eingestuft wird. Des Weiteren konnte eine andere Gruppe den Lebertropismus von AAV9 durch Vektor-Engineering um das 10-25-fache verringern [235].

4.6 Das Tet-off System in der Gentherapie

Das Tetracyclin-System gehört wie das Tamoxifen-System zu den induzierbaren Systemen der Genregulation. Das Tet-off System war 1992 das erste, das entwickelt wurde [180], gefolgt vom Tet-on System 1995 [181]. Ersteres ermöglicht eine Abschaltung von Genen durch Applikation eines Tetracyclin-Antibiotikums, zweiteres deren Überexpression. Seit ihrer Entdeckung wurden diese beiden Systeme weiterentwickelt und *in vitro* sowie *in vivo* validiert [236]. Aufgrund der besseren Wirksamkeit in viralen Vektoren entschieden wir uns für das Tet-off System zur Expressionskontrolle in unseren Versuchen [237]. Tatsächlich zeigten sich signifikant unterschiedliche Niveaus des transduzierten Gens (Ang-2) zwischen Tieren, die bis zum Versuchsende mit Doxzyklin behandelt wurden, und Tieren, bei denen drei Tage zuvor das Tetracyclin abgesetzt worden war (siehe Abbildung 10). Dadurch konnten wir zum einen die Effektivität dieses genregulierenden Systems in unserem Modell zeigen, zum anderen aber auch den reversiblen Charakter durch wiederholtes Ansteigen des Expressionsniveaus bei Absetzen von Doxzyklin veranschaulichen. Da rAAVs unter Umständen das transduzierte Gen noch Jahre nach Applikation exprimieren können [238], wäre der Einsatz eines Tet-on Systems zur Behandlung chronischer Ischämien vermutlich sinnvoller. Dadurch wäre die Einnahme von Doxzyklin nur im gewünschten therapeutischen Zeitraum notwendig, um im Anschluss durch Absetzen eine übermäßige Angiogenese, z.B. in Form eines Hämangioms, sowie unerwünschte systemische Nebenwirkungen zu verhindern [239]. Hierfür könnte sich das optimierte Tet-on-3G System als nützlich erweisen, das 100-fach sensitiver für Doxzyklin und 7-fach potenter als das ursprüngliche Tet-on System ist [240].

4.7 Klinischer Ausblick

Die vorliegende Arbeit ist zusammen mit den Ergebnissen im Maus- und Schweinmodell

nach unserem Kenntnisstand die erste translationale Studie, die den Faktor MRTF-A als potenten Induktor einer therapeutischen Neovaskularisierung herausarbeitete [187]. Für klinische Untersuchungen ist MRTF-A daher noch zu wenig erforscht, weitere molekulare und prä-klinische Analysen werden nötig sein, bevor dieser Schritt gewagt werden kann. Als Gegenstand aktueller klinischer Studien könnte dagegen das besser untersuchte, vorgeschaltete Peptid T β 4, dessen Wirkung mit MRTF-A vergleichbar ist, von Interesse sein. T β 4 stellte sich bereits in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Verträglichkeitsstudie als sicher und gut tolerierbar heraus [241]. Des Weiteren wurde in Patienten mit ischämischer Herzinsuffizienz eine Verbesserung des NYHA-Stadiums mit erhöhten T β 4-Levels nach Stammzelltherapie assoziiert [242]. In einer anderen klinischen Studie konnte durch topische T β 4-Applikation ein wundheilungsfördernder Effekt in venösen Ulzerationen erzielt werden [243]. Weitere Untersuchungen werden womöglich zeigen, ob sich T β 4 und dessen nachgeschaltete Kaskade in der Therapie chronischer Ischämien des Herz- und Skelettmuskels bewähren wird.

Mit Bezug auf den geeigneten Vektor im kardiovaskulären System können wir eine Empfehlung für rAAVs aussprechen. Diese überzeugten bislang so gut, dass sie im ersten zugelassenen Gentherapeutikum Glybera[®] zum Einsatz kamen [95]. Aktuelle Verfahren des Vektor-Engineering versprechen die Möglichkeit, rAAVs in naher Zukunft auf die Anforderungen moderner Gentherapie zuzuschneiden. Genmodulierende Systeme wie das Tet System könnten hierbei eine gezieltere Therapie unterstützen. Zur Vermeidung systemischer Effekte sind regionale Applikationsverfahren generell zu bevorzugen. Aufgrund der Gefahr noch unentdeckter Risiken sollte jedoch insgesamt noch vorsichtig mit dem Einsatz viraler Vektoren im Menschen umgegangen werden.

5 Zusammenfassung

MRTF-A ist bekannt als Ko-Transkriptionsfaktor in der Thymosin beta 4 Signalkaskade. Deswegen spielt es eine wichtige Rolle in Prozessen der Angiogenese und Gefäßmaturierung. Vorangehende Experimente haben gezeigt, dass MRTF-A in der Lage ist, die Gefäßneubildung in einem ischämischen Milieu zu verstärken. Angiopoietin 1 und Angiopoietin 2 sind beides Liganden des Tie2 Rezeptors und bewirken antagonistische Effekte auf die Perizytenrekrutierung an Mikrogefäßen. Ang1 erhöht die Gefäßmaturierung, Ang2 hebt diesen Effekt auf. Ausgehend von diesen Erkenntnissen haben wir in dieser Arbeit untersucht ob die Modulation der Perizytenrekrutierung während einer MRTF-A Therapie das therapeutische Outcome in ischämischen Kaninchenhinterläufen beeinflussen kann.

Dazu haben wir Kaninchen die Femoralarterie entfernt und die gewünschten Faktoren und Faktorkombinationen mithilfe von adeno-assoziierten Viren im ischämischen Bein überexprimiert. Um die Transkription *in vivo* zu steuern wurde zum Teil ein tet-off Doxzyklin-System verwendet. Mittels Angiographien haben wir dann das Kollateralwachstum und die regionale Fließgeschwindigkeit des Blutes bestimmt. Angiogenese und Gefäßmaturierung wurden durch immunhistochemische Färbungen in Gewebeproben des Beines untersucht.

Bei unseren Versuchen zeigten sich starke Effekte auf Kapillarwachstum und Perizytenrekrutierung durch MRTF-A Überexpression, was durch Ko-Applikation von Ang2 verhindert wurde. Die Effekte von MRTF-A auf diese beiden Kompartimente der Neovaskularisierung konnten durch frühe Gefäßdestabilisierung mithilfe von Ang2 sogar verstärkt werden. Eine frühe Destabilisierung allein gepaart mit einer späten Stabilisierung durch Ang1 in Abwesenheit von MRTF-A konnte diesen Effekt jedoch nicht im selben Maße imitieren. MRTF-A verbesserte ebenso die Arteriogenese und die Durchblutung in den ischämischen Extremitäten signifikant. Auch dieser Effekt wurde durch die Ko-Applikation von Ang2 unterbunden. Es handelt sich hierbei wohl um ein therapeutisches Maximum, da dieser Effekt durch frühe Destabilisierung nicht mehr verstärkt werden konnte.

Somit schlussfolgern wir, dass die Modulation der Perizytenrekrutierung während einer MRTF-A Behandlung, respektive eine frühe Destabilisierung, einen wichtigen Einfluss auf der mikrozirkulatorischen Ebene hat, diese Effekte sich jedoch nicht auf die großen Gefäße und den Blutfluss übersetzen, sodass noch mehr Forschung nötig sein wird, um die Zusammenhänge in den Prozessen der Gefäßneubildung gänzlich zu verstehen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ABI	Knöchel-Arm-Index
ABIN-2	A20-bindender Inhibitor von NFκB 2
Ad	Adenovirus
aFGF	acidic fibroblast growth factor
Akt	Proteinkinase B
ALK	Activin receptor-like kinase
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
Ang	Angiopoietin
ASS	Acetylsalicylsäure
AV-Shunt	arterio-venöser Shunt
bGH	boviner Wachstumsfaktor
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
CAP	capsid protein
CCR2	C-C chemokine receptor type 2
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
cDNA	komplementäre DNA
CLI	critical limb ischemia
CMV	Zytomegalievirus
CTGF	connective tissue growth factor/CCN-2
CYR61	Cysteine-rich angiogenic inducer 61/CCN-1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLL4	Delta-like canonical Notch ligand 4
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRG	Diagnosis related groups
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
eEPC	embryonale endotheliale Progenitorzellen
ERK	extracellular signal-regulated kinase/MAPK
FBS	fetales Rinderserum
F-Aktin	filamentöses/polymeres Aktin
FGF	fibroblast growth factor
G-Aktin	globuläres/monomeres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	human embryonic kidney
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
hpf	high power field
HSV	Herpes-simplex-Virus
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IEG	immediate early gene
ITR	inverted terminal repeat
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF-2	Krüppel-like factor 2

Abkürzungsverzeichnis

LacZ	Gen für β -Galactosidase
L-NAME	L-NG-Nitroarginine methyl ester
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Lentivirus
MAL	Myocardin related transcription factor A
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
mDia	mammalian diaphanous
MKL-1	megakaryoblastic leukemia 1/MRTF-A
MMP	Matrix-Metalloprotease
MRTF	Myocardin related transcription factor
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NFW	Nuclease-Free Water
NG-2	Neuron Glial Antigen 2
NO	Stickstoffmonoxid
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1/CD-31
PEI	Polyethylenimin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIGF	placental growth factor
rAAV	rekombinantes Adeno-assoziiertes Virus
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
REP	replication initiation protein
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-assoziierte Kinase
rpm	rotations per minute
rtPCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
shRNA	small hairpin RNA
SRF	serum response factor
ssDNA	einzelsträngige DNA
STARS	Striated Muscle Activator of Rho Signaling
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor
TB4	Thymosin beta 4
TCF	ternary complex factor
Tet-on/off	Tetrazyklin-on/off
TetR	Tetrazyklin Repressor Protein
TGF- β	transforming growth factor beta
TGF β R	transforming growth factor receptor
Tie	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains
TIVA	total intravenöse Anästhesie
TMN	Tris-MgCl ₂ -NaCl Puffer
tTA	tetracycline-controlled transactivator protein
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherine
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VP16	alpha trans inducing factor
WGA	Wheat Germ Agglutinin

7 Literaturverzeichnis

1. Lawall, H., P. Huppert, and G. Rümenapf. *S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit*. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Angiologie - Gesellschaft für Gefäßmedizin 30.09.2015 [cited 21.09. 2016]; Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/065-003m_S3_PAVK_periphere_arterielle_Verschlusskrankheitfinal-2015-11.pdf.
2. Duvall, W. and D. Vorchheimer, *Multi-bed vascular disease and atherothrombosis: scope of the problem*. J Thromb Thrombolysis, 2004. **17**(1): p. 51-61.
3. Hirsch, A.T., et al., *ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic)*. Circulation, 2006. **113**(11): p. e463-e654.
4. Criqui, M.H., et al., *The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population*. Circulation, 1985. **71**(3): p. 510-515.
5. Diehm, C., et al., *High prevalence of peripheral arterial disease and co-morbidity in 6880 primary care patients: cross-sectional study*. Atherosclerosis, 2004. **172**(1): p. 95-105.
6. Kröger, K., et al., *Prevalence of Peripheral Arterial Disease – Results of the Heinz Nixdorf Recall Study*. European Journal of Epidemiology, 2006. **21**(4): p. 279-285.
7. Malyar, N., et al., *Recent trends in morbidity and in-hospital outcomes of in-patients with peripheral arterial disease: a nationwide population-based analysis*. European Heart Journal, 2013. **34**(34): p. 2706-2714.
8. Fowkes, F.G.R., et al., *Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis*. The Lancet, 2013. **382**(9901): p. 1329-1340.
9. Krause, D., et al., *The risk of peripheral artery disease in older adults - seven-year results of the getABI study*. Vasa, 2016. **45**(5): p. 403-410.
10. Hirsch, A.T., et al., *Peripheral arterial disease detection, awareness, and treatment in primary care*. JAMA, 2001. **286**(11): p. 1317-1324.
11. Criqui, M.H., et al., *Mortality over a Period of 10 Years in Patients with Peripheral Arterial Disease*. New England Journal of Medicine, 1992. **326**(6): p. 381-386.
12. Kannel, W.B., *Risk Factors for Atherosclerotic Cardiovascular Outcomes in Different Arterial Territories*. Journal of Cardiovascular Risk, 1994. **1**(4): p. 333-339.
13. Reinecke, H., et al., *Peripheral arterial disease and critical limb ischaemia: still poor outcomes and lack of guideline adherence*. European Heart Journal, 2015. **36**(15): p. 932-938.
14. Fratezi, A.C., et al., *Outcome and quality of life of patients with severe chronic limb ischaemia: A cohort study on the influence of diabetes*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 1995. **10**(4): p. 459-465.
15. Steg, P., et al., *One-year cardiovascular event rates in outpatients with atherothrombosis*. JAMA, 2007. **297**(11): p. 1197-1206.

16. Tendera, M., et al., *ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases*. Eur Heart J, 2011. **32**(22): p. 2851-2906.
17. Rooke, T.W., et al., *2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (Updating the 2005 Guideline): A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Journal of the American College of Cardiology, 2011. **58**(19): p. 2020-2045.
18. Catapano, A.L., et al., *2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias*. Eur Heart J, 2016. [Epub ahead of print].
19. Rydén, L., et al., *ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD*. Eur Heart J, 2013. **34**(39): p. 3035-3087.
20. Mancia, G., et al., *2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension*. Eur Heart J, 2013. **34**(28): p. 2159-2219.
21. Alonso-Coello, P., et al., *Antithrombotic Therapy in Peripheral Artery Disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. Chest, 2012. **141**(2, Supplement): p. e669S-e690S.
22. Soejima, H., et al., *Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in patients with peripheral artery disease or diabetes mellitus. Analyses from the JPAD, POPADAD and AAA trials*. Thrombosis and Haemostasis, 2010. **104**(12): p. 1085-1088.
23. Lane, R., et al., *Exercise for intermittent claudication*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014(7).
24. de Backer, T.L.M., et al., *Naftidrofuryl for intermittent claudication*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2012(12).
25. Bedenis, R., et al., *Cilostazol for intermittent claudication*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014(10).
26. participants, B.t., *Bypass versus angioplasty in severe ischaemia of the leg (BASIL): multicentre, randomised controlled trial*. The Lancet, 2005. **366**(9501): p. 1925-1934.
27. Kudo, T., et al., *Changing pattern of surgical revascularization for critical limb ischemia over 12 years: Endovascular vs open bypass surgery*. Journal of Vascular Surgery, 2006. **44**(2): p. 304-313.
28. Böckler, D., et al., *Early Surgical Outcome after Failed Primary Stenting for Lower Limb Occlusive Disease*. Journal of Endovascular Therapy, 2005. **12**(1): p. 13-21.
29. Conte, M.S., et al., *Impact of Increasing Comorbidity on Infrainguinal Reconstruction: A 20-Year Perspective*. Annals of Surgery, 2001. **233**(3): p. 445-452.
30. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
31. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. Cell, 2011. **146**(6): p. 873-87.
32. Swift, M.R. and B.M. Weinstein, *Arterial-Venous Specification During Development*. Circulation Research, 2009. **104**(5): p. 576-588.

33. 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*, 2005. **19**(11): p. 1576-8.
34. Johannes, A.E. and N. Stephan, *The Extracellular Matrix of Blood Vessels*. *Current Pharmaceutical Design*, 2009. **15**(12): p. 1385-1400.
35. Lee, J., et al., *Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions*. *Exp Mol Med*, 2004. **36**(1): p. 1-12.
36. Arroyo, A.G. and M.L. Iruela-Arispe, *Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response*. *Cardiovascular Research*, 2010. **86**(2): p. 226-235.
37. Nyberg, P., L. Xie, and R. Kalluri, *Endogenous Inhibitors of Angiogenesis*. *Cancer Research*, 2005. **65**(10): p. 3967-3979.
38. Phng, L.K. and H. Gerhardt, *Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch*. *Developmental Cell*, 2009. **16**(2): p. 196-208.
39. Jakobsson, L., et al., *Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting*. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(10): p. 943-953.
40. Eilken, H. and R. Adams, *Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(5): p. 617-25.
41. Fantin, A., et al., *Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction*. *Blood*, 2010. **116**(5): p. 829-840.
42. Nicoli, S., et al., *MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signalling during angiogenesis*. *Nature*, 2010. **464**(7292): p. 1196-1200.
43. Mazzone, M., et al., *Heterozygous Deficiency of PHD2 Restores Tumor Oxygenation and Inhibits Metastasis via Endothelial Normalization*. *Cell*, 2009. **136**(5): p. 839-851.
44. Pardali, E., M.-J. Goumans, and P. ten Dijke, *Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease*. *Trends in Cell Biology*, 2010. **20**(9): p. 556-567.
45. Aguilera, K.Y. and R.A. Brekken, *Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(2): p. 299-309.
46. Armulik, A., G. Genove, and C. Betsholtz, *Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises*. *Dev Cell*, 2011. **21**(2): p. 193-215.
47. Stapor, P.C., et al., *Pericyte Dynamics during Angiogenesis: New Insights from New Identities*. *Journal of Vascular Research*, 2014. **51**(3): p. 163-174.
48. Hinz, B., et al., *The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins*. *The American Journal of Pathology*, 2007. **170**(6): p. 1807-1816.
49. Caplan, A.I., *All MSCs Are Pericytes?* *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(3): p. 229-230.
50. Gaengel, K., et al., *Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2009. **29**(5): p. 630-638.
51. Geevarghese, A. and I.M. Herman, *Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies*. *Transl Res*, 2014. **163**(4): p. 296-306.

52. Lucke, S. and B. Levkau, *Endothelial Functions of Sphingosine-1-phosphate*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2010. **26**(1): p. 87-96.
53. Sennino, B., et al., *Cellular Source and Amount of Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Growth Factor in Tumors Determine Response to Angiogenesis Inhibitors*. Cancer Research, 2009. **69**(10): p. 4527-4536.
54. Song, S., et al., *PDGFR[beta]+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(9): p. 870-879.
55. Simons, M. and A. Eichmann, *Molecular controls of arterial morphogenesis*. Circ Res, 2015. **116**(10): p. 1712-24.
56. Faber, J.E., et al., *A Brief Etymology of the Collateral Circulation*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2014. **34**(9): p. 1854-1859.
57. van Horssen, P., et al., *Innate collateral segments are predominantly present in the subendocardium without preferential connectivity within the left ventricular wall*. The Journal of Physiology, 2014. **592**(5): p. 1047-1060.
58. Scholz, D., et al., *Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis)*. Virchows Archiv, 2000. **436**(3): p. 257-270.
59. Schaper, W., *Collateral circulation: past and present*. Basic Res Cardiol, 2009. **104**(1): p. 5-21.
60. Toriumi, H., et al., *Dually Supplied T-Junctions in Arteriole-Arteriolar Anastomosis in Mice. Key to Local Hemodynamic Homeostasis in Normal and Ischemic States?*, 2009. **40**(10): p. 3378-3383.
61. Deindl, E., et al., *Involvement of the Fibroblast Growth Factor System in Adaptive and Chemokine-Induced Arteriogenesis*. Circulation Research, 2003. **92**(5): p. 561-568.
62. Voskuil, M., et al., *Modulation of collateral artery growth in a porcine hindlimb ligation model using MCP-1*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 2003. **284**(4): p. H1422-H1428.
63. Tirziu, D., et al., *Endothelial nuclear factor- κ B-dependent regulation of arteriogenesis and branching*. Circulation, 2012. **126**(22): p. 2589-2600.
64. Bergmann, C.E., et al., *Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **80**(1): p. 59-65.
65. Stabile, E., et al., *CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16*. Circulation, 2006. **113**(1): p. 118-124.
66. Koch, S., et al., *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. Biochemical Journal, 2011. **437**(2): p. 169-183.
67. Ren, B., et al., *ERK1/2-Akt1 crosstalk regulates arteriogenesis in mice and zebrafish*. The Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(4): p. 1217-1228.
68. Hoefler, I.E., B. den Adel, and M.J. Daemen, *Biomechanical factors as triggers of vascular growth*. Cardiovasc Res, 2013. **99**(2): p. 276-83.
69. Pipp, F., et al., *Elevated Fluid Shear Stress Enhances Postocclusive Collateral Artery Growth*

- and Gene Expression in the Pig Hind Limb*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004. **24**(9): p. 1664-1668.
70. Chilian, W.M., et al., *Coronary collateral growth—Back to the future*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012. **52**(4): p. 905-911.
71. Ito, W., et al., *Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion*. *Am J Physiol*, 1997. **273**(3): p. 1255-1265.
72. Geary, R.L., et al., *Time course of flow-induced smooth muscle cell proliferation and intimal thickening in endothelialized baboon vascular grafts*. *Circulation Research*, 1994. **74**(1): p. 14-23.
73. Heil, M., et al., *Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(1): p. 45-55.
74. S, M., *Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution*. *J Assoc Physicians India*, 2013. **61**(2): p. 127-33.
75. Wirth, T., N. Parker, and S. Yla-Herttuala, *History of gene therapy*. *Gene*, 2013. **525**(2): p. 162-9.
76. Rincon, M.Y., T. VandenDriessche, and M.K. Chuah, *Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation*. *Cardiovasc Res*, 2015. **108**(1): p. 4-20.
77. Wolff, J., et al., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. *Science*, 1990. **247**(4949): p. 1465-1468.
78. Su, C.-H., et al., *Nonviral gene therapy targeting cardiovascular system*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2012. **303**(6): p. H629-H638.
79. Scimia, M.C., A. Cannavo, and W.J. Koch, *Gene therapy for heart disease: molecular targets, vectors and modes of delivery to myocardium*. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 2013. **11**(8): p. 999-1013.
80. Fujii, H., et al., *Repeated and targeted transfer of angiogenic plasmids into the infarcted rat heart via ultrasound targeted microbubble destruction enhances cardiac repair*. *European Heart Journal*, 2011. **32**(16): p. 2075-2084.
81. Rabea Hinkel, T.T., Christian Kupatt, *Gene therapy for ischemic heart disease*. *Expert Opin Biol Ther*, 2011. **11**(16): p. 723-37.
82. Kouprina, N., et al., *A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy*. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 2013. **70**(7): p. 1135-1148.
83. Parker, A., S. Nicklin, and A. Baker, *Interactions of adenovirus vectors with blood: implications for intravascular gene therapy applications*. *Curr Opin Mol Ther*, 2008. **10**(5): p. 439-448.
84. Wright, M., et al., *In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors*. *Basic Res Cardiol*, 2001. **96**(3): p. 227-236.
85. Muona, K., et al., *10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb*. *Gene Ther*, 2012. **19**(4): p. 392-395.
86. Krause, A., et al., *Epitopes Expressed in Different Adenovirus Capsid Proteins Induce Different Levels of Epitope-Specific Immunity*. *Journal of Virology*, 2006. **80**(11): p. 5523-5530.

87. Raper, S.E., et al., *Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer*. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2003. **80**(1–2): p. 148-158.
88. Kaski, J.C. and L. Consuegra-Sanchez, *Evaluation of ASPIRE trial: a Phase III pivotal registration trial, using intracoronary administration of Generx (Ad5FGF4) to treat patients with recurrent angina pectoris*. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2013. **13**(12): p. 1749-1753.
89. VandenDriessche, T. and M.K. Chuah, *Targeting endothelial cells by gene therapy*. *Blood*, 2013. **122**(12): p. 1993-1994.
90. Aiuti, A., et al., *Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome*. *Science*, 2013. **341**(6148).
91. Biffi, A., et al., *Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy*. *Science*, 2013. **341**(6148).
92. Cooray, S., S.J. Howe, and A.J. Thrasher, *Chapter three - Retrovirus and Lentivirus Vector Design and Methods of Cell Conditioning*, in *Methods in Enzymology*, F. Theodore, Editor. 2012, Academic Press. p. 29-57.
93. Papayannakos, C. and R. Daniel, *Understanding lentiviral vector chromatin targeting: working to reduce insertional mutagenic potential for gene therapy*. *Gene Ther*, 2013. **20**(6): p. 581-588.
94. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency*. *New England Journal of Medicine*, 2003. **348**(3): p. 255-256.
95. Bryant, L.M., et al., *Lessons Learned from the Clinical Development and Market Authorization of Glybera*. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 2013. **24**(2): p. 55-64.
96. Samulski, R.J. and N. Muzyczka, *AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes*. *Annu Rev Virol*, 2014. **1**(1): p. 427-51.
97. Mingozzi, F. and K.A. High, *Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(5): p. 341-355.
98. Vandendriessche, T., et al., *Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2007. **5**(1): p. 16-24.
99. Samulski, R.J., et al., *Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19*. *The EMBO Journal*, 1991. **10**(12): p. 3941-3950.
100. Lai, Y., et al., *Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors*. *Nature biotechnology*, 2005. **23**(11): p. 1435-1439.
101. Gao, G., et al., *Clades of Adeno-Associated Viruses Are Widely Disseminated in Human Tissues*. *Journal of Virology*, 2004. **78**(12): p. 6381-6388.
102. Srivastava, A., *In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors*. *Current Opinion in Virology*, 2016. **21**: p. 75-80.
103. Work, L.M., et al., *Vascular Bed-Targeted in Vivo Gene Delivery Using Tropism-Modified Adeno-associated Viruses*. *Mol Ther*, 2006. **13**(4): p. 683-693.

104. Nonnenmacher, M. and T. Weber, *Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors*. Gene Ther, 2012. **19**(6): p. 649-658.
105. Calcedo, R., et al., *Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses*. Journal of Infectious Diseases, 2009. **199**(3): p. 381-390.
106. Asokan, A., D.V. Schaffer, and R. Jude Samulski, *The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads*. Molecular Therapy, 2012. **20**(4): p. 699-708.
107. Jiang, H., et al., *Evidence of Multiyear Factor IX Expression by AAV-Mediated Gene Transfer to Skeletal Muscle in an Individual with Severe Hemophilia B*. Mol Ther, 2006. **14**(3): p. 452-455.
108. Pacak, C.A., et al., *Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo*. Circulation Research, 2006. **99**(4): p. e3-e9.
109. Wang, D., et al., *The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue*. Expert opinion on drug delivery, 2014. **11**(3): p. 345-364.
110. 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, 2010. **56**(5): p. 414-22.
111. Ouma, G.O., et al., *Therapeutic angiogenesis in critical limb ischemia*. Angiology, 2013. **64**(6): p. 466-80.
112. Ylä-Herttuala, S., et al., *Vascular Endothelial Growth Factors: Biology and Current Status of Clinical Applications in Cardiovascular Medicine*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **49**(10): p. 1015-1026.
113. Kusumanto, Y.H., et al., *Treatment with Intramuscular Vascular Endothelial Growth Factor Gene Compared with Placebo for Patients with Diabetes Mellitus and Critical Limb Ischemia: A Double-Blind Randomized Trial*. Human Gene Therapy, 2006. **17**(6): p. 683-691.
114. Rajagopalan, S., et al., *Regional Angiogenesis With Vascular Endothelial Growth Factor in Peripheral Arterial Disease. A Phase II Randomized, Double-Blind, Controlled Study of Adenoviral Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor 121 in Patients With Disabling Intermittent Claudication*, 2003. **108**(16): p. 1933-1938.
115. Shimamura, M., et al., *Gene Therapy and Cell-Based Therapies for Therapeutic Angiogenesis in Peripheral Artery Disease*. BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 186215.
116. Comerota, A.J., et al., *Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: Preliminary results of a phase I trial*. Journal of Vascular Surgery, 2002. **35**(5): p. 930-936.
117. Nikol, S., et al., *Therapeutic Angiogenesis With Intramuscular NVIFGF Improves Amputation-free Survival in Patients With Critical Limb Ischemia*. Mol Ther, 2008. **16**(5): p. 972-978.
118. Belch, J., et al., *Effect of fibroblast growth factor NVIFGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia*. The Lancet, 2011. **377**(9781): p. 1929-1937.
119. Kaga, T., et al., *Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation: Differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor*. Vascular Pharmacology, 2012. **57**(1): p. 3-9.
120. Shigematsu, H., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte*

- growth factor plasmid for critical limb ischemia*. Gene Ther, 2010. **17**(9): p. 1152-1161.
121. Ylä-Herttua, S. and A.H. Baker, *Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future*. Molecular Therapy, 2017. **25**(5): p. 1095-1106.
122. Fagiani, E. and G. Christofori, *Angiopoietins in angiogenesis*. Cancer Letters, 2013. **328**(1): p. 18-26.
123. Saharinen, P., et al., *Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2*. The Journal of Cell Biology, 2005. **169**(2): p. 239-243.
124. Davis, S., et al., *Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering*. Nat Struct Mol Biol, 2003. **10**(1): p. 38-44.
125. Augustin, H.G., et al., *Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(3): p. 165-177.
126. Makinde, T. and D.K. Agrawal, *Intra and extravascular transmembrane signalling of angiopoietin-1-Tie2 receptor in health and disease*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008. **12**(3): p. 810-828.
127. Teichert-Kuliszewska, K., et al., *Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2*. Cardiovascular Research, 2001. **49**(3): p. 659-670.
128. Maisonpierre, P.C., et al., *Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis*. Science, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
129. Yuan, H.T., et al., *Angiopoietin 2 Is a Partial Agonist/Antagonist of Tie2 Signaling in the Endothelium*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(8): p. 2011-2022.
130. Xu, Y. and Q. Yu, *Angiopoietin-1, Unlike Angiopoietin-2, Is Incorporated into the Extracellular Matrix via Its Linker Peptide Region*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(37): p. 34990-34998.
131. Wong, A.L., et al., *Tie2 Expression and Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues*. Circulation Research, 1997. **81**(4): p. 567-574.
132. Jeansson, M., et al., *Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(6): p. 2278-2289.
133. Park, Y., N. Kim, and I. Jo, *Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes*. Microvasc Res, 2003. **65**(2): p. 125-131.
134. Thurston, G., et al., *Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1*. Science, 1999. **286**(5449): p. 2511-2514.
135. Yana, I., et al., *Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(9): p. 1607-1614.
136. Witzensbichler, B., et al., *Protective Role of Angiopoietin-1 in Endotoxic Shock*. Circulation, 2005. **111**(1): p. 97-105.
137. Thurston, G. and C. Daly, *The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin-Tie Signaling Pathway*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012. **2**(9): p. a006650.

138. Scharpfenecker, M., et al., *The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(4): p. 771-780.
139. Ziegler, T., et al., *Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis*. J Clin Invest, 2013.
140. Lobov, I.B., P.C. Brooks, and R.A. Lang, *Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(17): p. 11205-11210.
141. Felcht, M., et al., *Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling*. The Journal of Clinical Investigation, 2012. **122**(6): p. 1991-2005.
142. Wang, D.-Z., et al., *Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(23): p. 14855-14860.
143. Parmacek, M.S., *Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 633-44.
144. Small, E.M., *The Actin–MRTF–SRF Gene Regulatory Axis and Myofibroblast Differentiation*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2012. **5**(6): p. 794-804.
145. Treisman, R., *Shedding light on nuclear actin dynamics and function*. Trends Biochem Sci, 2013. **38**(8): p. 376-7.
146. Olson, E.N. and A. Nordheim, *Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 353-65.
147. Busche, S., et al., *Epithelial cell-cell contacts regulate SRF-mediated transcription via Rac-actin-MAL signalling*. Journal of Cell Science, 2008. **121**(7): p. 1025-1035.
148. Kuwahara, K., et al., *Myocardin-Related Transcription Factor A Is a Common Mediator of Mechanical Stress- and Neurohumoral Stimulation-Induced Cardiac Hypertrophic Signaling Leading to Activation of Brain Natriuretic Peptide Gene Expression*. Molecular and Cellular Biology, 2010. **30**(17): p. 4134-4148.
149. Lamon, S., M.A. Wallace, and A.P. Russell, *The STARS signaling pathway: a key regulator of skeletal muscle function*. Pflugers Arch, 2014.
150. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF- β Signaling in Myocardial Infarction and Cardiac Remodeling*. Cardiovascular research, 2007. **74**(2): p. 184-195.
151. Mack, C.P. and J.S. Hinson, *Regulation of smooth muscle differentiation by the myocardin family of serum response factor co-factors*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2005. **3**(9): p. 1976-1984.
152. Muehlich, S., et al., *Serum-Induced Phosphorylation of the Serum Response Factor Coactivator MKL1 by the Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway Inhibits Its Nuclear Localization*. Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(20): p. 6302-6313.
153. Mannherz, H. and E. Hannappel, *The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family*. Cell Motil Cytoskeleton, 2009. **66**(10): p. 839-851.
154. Rubin, B.K., A.P. Kater, and A.L. Goldstein, *Thymosin β 4 Sequesters Actin in Cystic Fibrosis Sputum and Decreases Sputum Cohesivity in Vitro*. Chest, 2006. **130**(5): p. 1433-1440.

155. Morita, T. and K.i. Hayashi, *G-actin sequestering protein thymosin- β 4 regulates the activity of myocardin-related transcription factor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013. **437**(3): p. 331-335.
156. Qiu, P., et al., *Thymosin β 4 inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation, IL-8 expression, and the sensitizing effects by its partners PINCH-1 and ILK*. The FASEB Journal, 2011. **25**(6): p. 1815-1826.
157. Badamchian, M., et al., *Thymosin β 4 reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock*. International Immunopharmacology, 2003. **3**(8): p. 1225-1233.
158. Hinkel, R., et al., *Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2232-40.
159. Smart, N., A. Rossdeutsch, and P.R. Riley, *Thymosin β 4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential*. Angiogenesis, 2007. **10**(4): p. 229-241.
160. Grant, D., et al., *Thymosin beta4 enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis*. Angiogenesis, 1999. **3**(2): p. 125-135.
161. Jo, J.-O., et al., *Thymosin β 4 induces the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in a hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α -dependent manner*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2010. **1803**(11): p. 1244-1251.
162. Rossdeutsch, A., et al., *Essential role for thymosin beta4 in regulating vascular smooth muscle cell development and vessel wall stability*. Circ Res, 2012. **111**(4): p. e89-102.
163. Teresa Trenkwalder, E.D., Dario Bongiovanni, Seungmin Lee, Heribert Schunkert, Christian Kupatt & Rabea Hinkel, *Thymosin-b4-mediated therapeutic neovascularization: role of the PI3K/AKT pathway*. Expert Opin Biol Ther, 2015. **15**(Sup 1): p. 175-185.
164. Weinl, C., et al., *Endothelial SRF/MRTF ablation causes vascular disease phenotypes in murine retinæ*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(5): p. 2193-2206.
165. Posern, G. and R. Treisman, *Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction*. Trends in Cell Biology, 2006. **16**(11): p. 588-596.
166. Miano, J.M., *Role of serum response factor in the pathogenesis of disease*. Lab Invest, 2010. **90**(9): p. 1274-1284.
167. Buchwalter, G., C. Gross, and B. Wasylyk, *Ets ternary complex transcription factors*. Gene, 2004. **324**: p. 1-14.
168. Franco, C.A., et al., *SRF selectively controls tip cell invasive behavior in angiogenesis*. Development, 2013. **140**(11): p. 2321-2333.
169. Medjkane, S., et al., *Myocardin-related transcription factors and SRF are required for cytoskeletal dynamics and experimental metastasis*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 257-268.
170. Fataccioli, V., et al., *Stimulation of Angiogenesis by Cyr61 Gene: A New Therapeutic Candidate*. Human Gene Therapy, 2002. **13**(12): p. 1461-1470.
171. Lau, L.F., *CCN1/CYR61: The Very Model of a Modern Matricellular Protein*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2011. **68**(19): p. 3149-3163.
172. Hall-Glenn, F., et al., *CCN2/Connective Tissue Growth Factor Is Essential for Pericyte*

- Adhesion and Endothelial Basement Membrane Formation during Angiogenesis.* PLoS ONE, 2012. **7**(2): p. e30562.
173. Lau, L., *CCN1 and CCN2: blood brothers in angiogenic action.* Journal of Cell Communication and Signaling, 2012. **6**(3): p. 121-123.
174. Matsushita, T., et al., *Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus.* Gene Ther, 1998. **5**(7): p. 938-945.
175. Xiao, X., J. Li, and R. Samulski, *Production of High-Titer Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors in the Absence of Helper Adenovirus.* J Virol, 1998. **72**(3): p. 2224-2232.
176. Katwal, A.B., et al., *Adeno-associated virus serotype 9 efficiently targets ischemic skeletal muscle following systemic delivery.* Gene Ther, 2013. **20**(9): p. 930-8.
177. Pankajakshan, D., et al., *Successful transfection of genes using AAV-2/9 vector in swine coronary and peripheral arteries.* J Surg Res, 2012. **175**(1): p. 169-75.
178. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995. **92**(16): p. 7297-7301.
179. Grieger, J.C., V.W. Choi, and R.J. Samulski, *Production and characterization of adeno-associated viral vectors.* Nat. Protocols, 2006. **1**(3): p. 1412-1428.
180. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992. **89**(12): p. 5547-5551.
181. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells.* Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-1769.
182. Jiang, L., et al., *Tight regulation from a single tet-off rAAV vector as demonstrated by flow cytometry and quantitative, real-time PCR.* Gene Ther, 2004. **11**(13): p. 1057-1067.
183. Lai, N.C., et al., *Improved function of the failing rat heart by regulated expression of insulin-like growth factor I via intramuscular gene transfer.* Hum Gene Ther, 2012. **23**(3): p. 255-61.
184. Kohan, D.E., *Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease.* Kidney Int, 2008. **74**(4): p. 427-37.
185. Pfosser, A., et al., *Liposomal Hsp90 cDNA induces neovascularization via nitric oxide in chronic ischemia.* Cardiovasc Res, 2005. **65**: p. 728-736.
186. Stachel, G., et al., *SDF-1 fused to a fractalkine stalk and a GPI anchor enables functional neovascularization.* Stem Cells, 2013. **31**(9): p. 1795-805.
187. Hinkel, R., et al., *MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 3970.
188. Rissanen, T., et al., *Fibroblast growth factor 4 induces vascular permeability, angiogenesis and arteriogenesis in a rabbit hindlimb ischemia model.* FASEB J, 2003. **17**(1): p. 100-102.
189. Arras, M., et al., *Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb.* J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 40-50.
190. Gruchala, M., et al., *Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors.* J Gene Med, 2004. **6**(5): p. 545-554.

191. Kessler, P., et al., *Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(24): p. 14082-14087.
192. Qin, D., et al., *Early vessel destabilization mediated by Angiopoietin-2 and subsequent vessel maturation via Angiopoietin-1 induce functional neovasculature after ischemia*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e61831.
193. Takeshita, S., et al., *Time course of increased cellular proliferation in collateral arteries after administration of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of lower limb vascular insufficiency*. Am J Pathol, 1995. **147**(6): p. 1649-1660.
194. Takeshita, S., et al., *Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **227**(2): p. 628-635.
195. Gibson, C., et al., *TIMI frame count: a quantitative method of assessing coronary artery flow*. Circulation, 1996. **93**(5): p. 879-888.
196. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-159.
197. Page, C., et al., *Antigenic heterogeneity of vascular endothelium*. Am J Pathol, 1992. **141**(3): p. 673-683.
198. Ozerdem, U., et al., *NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis*. Dev Dyn, 2001. **222**(2): p. 218-27.
199. Ozerdem, U., E. Monosov, and W.B. Stallcup, *NG2 proteoglycan expression by pericytes in pathological microvasculature*. Microvasc Res, 2002. **63**(1): p. 129-34.
200. Chazotte, B., *Labeling membrane glycoproteins or glycolipids with fluorescent wheat germ agglutinin*. Cold Spring Harb Protoc, 2011. **2011**(5): p. pdb.prot5623. doi: 10.1101/pdb.prot5623.
201. Lis, H. and N. Sharon, *Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition*. Chem Rev, 1998. **98**(2): p. 637-674.
202. Sweat, F., H. Puchtler, and S. Rosenthal, *Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue*. Arch Pathol, 1964. **78**: p. 69-72.
203. Latinkic, B., T. O'Brien, and L. Lau, *Promoter function and structure of the growth factor-inducible immediate early gene *cyr61**. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(12): p. 3261-3267.
204. Muehlich, S., et al., *Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1732-8.
205. Small, E.M., et al., *Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction*. Circ Res, 2010. **107**(2): p. 294-304.
206. Weng, X., et al., *Endothelial MRTF-A mediates angiotensin II induced cardiac hypertrophy*. J Mol Cell Cardiol, 2015. **80**: p. 23-33.
207. Sakai, N., et al., *LPA1-induced cytoskeleton reorganization drives fibrosis through CTGF-dependent fibroblast proliferation*. FASEB J, 2013. **27**(5): p. 1830-46.
208. Hinkel, R., et al., *Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1194**: p. 105-11.

209. Trembley, M.A., et al., *Myocardin-related transcription factors control the motility of epicardium-derived cells and the maturation of coronary vessels*. Development (Cambridge, England), 2015. **142**(1): p. 21-30.
210. Reiss, Y., et al., *Angiopoietin-2 Impairs Revascularization After Limb Ischemia*. Circulation Research, 2007. **101**(1): p. 88-96.
211. Kidoya, H., H. Naito, and N. Takakura, *Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia*. Blood, 2010. **115**(15): p. 3166-3174.
212. Saharinen, P., et al., *Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 527-537.
213. Chae, J., et al., *Coadministration of Angiopoietin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor Enhances Collateral Vascularization*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2573-8.
214. Greenberg, J.I., et al., *A Role for VEGF as a Negative Regulator of Pericyte Function and Vessel Maturation*. Nature, 2008. **456**(7223): p. 809-813.
215. Sandhu, R., et al., *Reciprocal regulation of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 following myocardial infarction in the rat*. Cardiovascular Research, 2004. **64**(1): p. 115-124.
216. Smith, A.H., et al., *Sustained Improvement in Perfusion and Flow Reserve After Temporally Separated Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1 Plasmid Deoxyribonucleic Acid*. Journal of the American College of Cardiology, 2012. **59**(14): p. 1320-1328.
217. Limbourg, A., et al., *Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia*. Nat Protoc, 2009. **4**(12): p. 1737-46.
218. Krishna, S.M., S.M. Omer, and J. Golledge, *Evaluation of the clinical relevance and limitations of current pre-clinical models of peripheral artery disease*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(3): p. 127-50.
219. Schierling, W., et al., *The Role of Angiogenic Growth Factors in Arteriogenesis*. Journal of Vascular Research, 2009. **46**(4): p. 365-374.
220. Eitenmüller, I., et al., *The Range of Adaptation by Collateral Vessels After Femoral Artery Occlusion*. Circulation Research, 2006. **99**(6): p. 656-662.
221. Cai, W., et al., *Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis*. Mol Cell Biochem, 2004. **264**(1-2): p. 193-200.
222. Shi-Wen, X., A. Leask, and D. Abraham, *Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2008. **19**(2): p. 133-144.
223. Hall-Glenn, F. and K.M. Lyons, *Roles for CCN2 in normal physiological processes*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2011. **68**(19): p. 3209-3217.
224. Jun, J.-I. and L.F. Lau, *The Matricellular Protein CCN1/CYR61 Induces Fibroblast Senescence and Restricts Fibrosis in Cutaneous Wound Healing*. Nature cell biology, 2010. **12**(7): p. 676-685.
225. Gravning, J., et al., *CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload*. Int J Cardiol, 2013. **168**(3): p. 2049-56.

226. Pinkenburg, O., et al., *Recombinant Adeno-associated Virus-Based Gene Transfer of Cathelicidin Induces Therapeutic Neovascularization Preferentially via Potent Collateral Growth*. *Hum Gene Ther*, 2009. **20**(2): p. 159-67.
227. Koo, T., et al., *Triple Trans-Splicing Adeno-Associated Virus Vectors Capable of Transferring the Coding Sequence for Full-Length Dystrophin Protein into Dystrophic Mice*. *Human Gene Therapy*, 2013. **25**(2): p. 98-108.
228. Jessup, M., et al., *Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID)*. *Circulation*, 2011. **124**(3): p. 304-313.
229. Jeune, V.L., et al., *Pre-existing Anti-Adeno-Associated Virus Antibodies as a Challenge in AAV Gene Therapy*. *Human Gene Therapy Methods*, 2013. **24**(2): p. 59-67.
230. 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*. *Human Gene Therapy*, 2010. **21**(6): p. 704-712.
231. Li, W., et al., *Engineering and Selection of Shuffled AAV Genomes: A New Strategy for Producing Targeted Biological Nanoparticles*. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2008. **16**(7): p. 1252-1260.
232. György, B., et al., *Naturally enveloped AAV vectors for shielding neutralizing antibodies and robust gene delivery in vivo*. *Biomaterials*, 2014. **35**(26): p. 7598-7609.
233. Wang, B., et al., *Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors*. *Gene Ther*, 2008. **15**(22): p. 1489-1499.
234. Li, H., et al., *Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model*. *Blood*, 2011. **117**(12): p. 3311-3319.
235. Pulicherla, N., et al., *Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer*. *Molecular Therapy*, 2011. **19**(6): p. 1070-1078.
236. Stieger, K., et al., *In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009. **61**(7-8): p. 527-541.
237. Mizuguchi, H. and T. Hayakawa, *The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in a single adenovirus vector*. *J Gene Med*, 2002. **4**(3): p. 240-247.
238. Buchlis, G., et al., *Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer*. *Blood*, 2012. **119**(13): p. 3038-3041.
239. Young, R.J., et al., *Angiogenic growth factor expression in benign and malignant vascular tumours*. *Experimental and Molecular Pathology*, 2014. **97**(1): p. 148-153.
240. Zhou, X., et al., *Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution*. *Gene Ther*, 2006. **13**(19): p. 1382-1390.
241. Ruff, D., et al., *A randomized, placebo-controlled, single and multiple dose study of intravenous thymosin β 4 in healthy volunteers*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010. **1194**(1): p. 223-229.
242. Choudry, F.A., et al., *Increases in plasma T β 4 after intracardiac cell therapy in chronic ischemic heart failure is associated with symptomatic improvement*. *Regenerative Medicine*, 2015. **10**(4): p. 403-410.

243. Guarnera, G., et al., *The effect of thymosin treatment of venous ulcers*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1194**(1): p. 207-212.

8 Danksagung

Mein erster Dank gilt den wissenschaftlichen und finanziellen Förderern dieses Projektes. Vielen Dank an die Ludwig-Maximilians-Universität für die Aufnahme in den Promotionsstudiengang „Molekulare und systembiologische Medizin“ im Rahmen des Programms Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe). Ebenso einen herzlichen Dank an die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie für die Gewährung des Otto-Hess-Promotionsstipendiums und die Verleihung des Hans-Jürgen-Bretschneider Posterpreises im Rahmen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Förderer Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt für die Ermöglichung dieses Projektes durch die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die hierfür nötigen Mittel. Danke für diese wertvolle wissenschaftliche und persönliche Erfahrung, die ich während meiner Zeit in der Arbeitsgruppe „Molekulare Interventionen in Kardiovaskulären Systemen“ machen durfte.

Einen weiteren besonderen Dank möchte ich an meine Betreuerin Prof. Dr. Rabea Hinkel richten, die mir bei allen Fragen und Experimenten mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke auch für den wissenschaftlichen Blick über den Tellerrand meiner Promotionsarbeit hinaus, den sie mir im Rahmen Ihrer Studien ermöglicht hat. Ich wünsche ihr alles Gute für Ihren weiteren beruflichen Werdegang in Göttingen.

Desweiteren möchte ich allen übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken, besonders meinen Mitdoktoranden Dario Bongiovanni, Andrea Howe und Seungmin Lee ohne die es nur halb so großartig gewesen wäre. Danke für die lebhaften Diskussionen, stetige Hilfsbereitschaft und aufmunternden Worte. Vielen Dank auch an Herrn Cuong Kieu und Frau Elisabeth Raatz für die ausgezeichnete technische Unterstützung und die aufbauenden Gespräche im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir während der gesamten Zeit unterstützend zur Seite standen und in Phasen der Frustration motivierend auf mich eingewirkt haben.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name, Vorname: Kraus, Markus
Geburtsdatum: 26. August 1992
Geburtsort: München
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische und universitäre Laufbahn:

2003 – 2011 Gymnasium Gröbenzell
Okt. 2011 – Jun. 2018 Studium der Medizin an der LMU
Feb. 2014 – Sep. 2015 Promotionsstudium der molekularen und systembiologischen Medizin (Forschungsthema: Einfluss der Gefäßmaturierung auf die therapeutische Neovaskularisierung mittels MRTF-A Überexpression) Prof. Christian Kupatt, Medizinische Poliklinik I, Klinikum rechts der Isar

Praktische Tätigkeit, Ausbildung, Weiterbildung

Feb. 2015 – Apr. 2015 Famulatur am Karapitiya Teaching Hospital, Sri Lanka im Bereich Chirurgie und Innere Medizin
Aug. 2015 Ausbildung zum Rettungssanitäter beim MKT München
Aug. 2015 – Sep. 2015 Famulatur an der BGU Murnau im Bereich Unfallchirurgie/Nothilfe
Mai 2017 – Aug. 2017 Orthopädie-Tertial an der Schulthess Klinik, Zürich
Sep. 2017 – Dez. 2017 Innere-Tertial am städt. Klinikum München-Harlaching und am Nepean Hospital, University of Sydney
Dez. 2017 – Apr. 2018 Chirurgie-Tertial an der BGU Murnau
Aug. 2018 – heute Weiterbildungsassistent an der Abteilung für Unfallchirurgie,

orthopädische Chirurgie, Hand- und Wirbelsäulenchirurgie des
Klinikum Traunstein, Prof. Rupert Ketterl

Preise und Stipendien:

- Okt. 2014 – Sep. 2015 Otto-Hess-Promotionsstipendium der Deutschen Gesellschaft für
Kardiologie (DGK)
- Jun. 2015 Posterpreis im Rahmen der Doktorarbeitstage Medizin
(DoktaMed) der LMU
- Okt. 2015 Hans-Jürgen-Bretschneider-Posterpreis des Basic Science
Meetings der DGK

Publikationen:

Ziegler T, **Kraus M**, Husada W, Gesenhues F, Jiang Q, Pinkenburg O, Trenkwalder T,
Laugwitz KL, le Noble F, Weber C, Kupatt C, Hinkel R. *Steerable induction of the Thymosin
 β 4/MRTF-A pathway via AAV-based overexpression induces therapeutic neovascularization.*
Hum Gene Ther. 2017 Jul 20. doi: 10.1089/hum.2017.013. [Epub ahead of print]



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Kraus, Markus

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Einfluss der Gefäßmaturierung auf die therapeutische Neovaskularisierung mittels MRTF-A-Überexpression

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 06.02.20

Ort, Datum

Markus Kraus

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand