

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Weber

Kardioprotektive Wirkung der LNA-vermittelten microRNA-92a-Suppression bei chronischer myokardialer Ischämie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Veronika Münch

geb. Kaczmarek

aus Soldau

München 2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Kupatt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Simon Rothenfusser Prof. Dr. med. Christian Weber
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. vet. Rabea Hinkel
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	16.12.2021

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Koronare Herzerkrankung	1
1.1.1 Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung.....	1
1.1.2 Pathophysiologie des Herzinfarktes.....	2
1.1.3 Therapeutisches Vorgehen bei KHK und Folgeerkrankungen.....	2
1.2 Chronische myokardiale Ischämie.....	3
1.2.1 Die Pathophysiologie des hibernierenden Myokards.....	4
1.2.2 Tiermodelle der chronischen myokardialen Ischämie	6
1.2.3 Nicht-invasive Diagnostische Verfahren zur Bestimmung der myokardialen Vitalität und Funktionseinschränkung.....	8
1.3 microRNAs	9
1.3.1 Wirkmechanismus von microRNAs	9
1.3.2 Relevanz der miRNAs in der Forschung.....	9
1.3.3 Die Funktion des <i>miR-17-92a</i> Cluster sowie Auswirkungen der miR-92a - Modulation	11
1.3.4 Regulierung der miRNA-Expression	13
2 ZIEL DER ARBEIT.....	15
3 MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Versuchsablauf	16
3.2 Versuchstiere.....	16
3.3 Modell myokardialer Hibernation mittels perkutaner Implantation eines Reduktionsstents.....	17
3.4 Versuchsablauf der Tierversuche	18
3.4.1 medikamentöse Versorgung und Überwachung	18
3.4.2 Anlage von arteriellen und venösen Katheterschleusen	19
3.4.3 Hämodynamische Messungen (Tag 0, 28 und 56)	20
3.4.4 Quantifizierung und Einteilung angiographisch sichtbarer Kollateralen nach Rentrop	23
3.4.5 LNA Applikation	24
3.5 Molekulare Experimente.....	25
3.5.1 Kapillar- und Perizyten-Färbung	26
3.5.2 Kardiomyozytengröße: Wheat Germ Agglutinin Färbung	28
3.5.3 Quantifizierung von Gewebsfibrose mittels <i>Sirius Red</i> Färbung	28
3.6 Statistik	30
4 ERGEBNISSE	31
4.1 Versuchsablauf	31
4.2 Verbesserung der globalen myokardialen Funktion bei chronischer myokardialer Ischämie nach LNA-92a Applikation.....	31
4.3 Verbesserung der regionalen myokardialen Funktion durch den Einsatz von LNA-92a	32
4.4 Beeinflussung der Angiogenese durch LNA-92a in chronischer myokardialer Ischämie	33
4.5 Auswirkungen der miRNA-92a Inhibition auf die Arteriogenese	34
4.6 Reduzierung der myokardiale Fibrose durch LNA-92a	35
4.7 Verhinderung der Myozytenhypertrophie nach LNA-92a Applikation in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie	36

5 DISKUSSION	38
5.1 Kardioprotektives Potential der regionalen miR-92a Inhibition	38
5.1.1 Einfluss der Inhibition der miR-92a auf die regionale und globale myokardiale Funktion in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie	39
5.1.2 Auswirkungen der LNA-92a auf Angiogenese	40
5.1.3 Auswirkungen der LNA-92a auf die Arteriogenese	42
5.1.4 Beeinflussung der pathologischen Kardiomyozytenhypertrophie durch microRNAs.....	44
5.1.5 Kardiale Fibrose als Resultat pathologischer Remodeling-Prozesse.....	46
5.2 Vorteile der Applikation von LNA-92a mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion	49
5.3 Großtiermodelle der chronisch ischämischen Kardiomyopathie	49
5.4 Bedeutung von microRNAs für die klinische Anwendung: eine mögliche neue Perspektive	50
5.5 Vergleich ausgewählter gentherapeutischer Ansätze	51
5.6 Schlussfolgerung und Ausblick	53
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	55
7 DANKSAGUNGEN	65
8 AFFIDAVIT	66

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal die Auswirkungen der lokalen, retrograden Applikation von LNA 92a am Herzen in einem Großtiermodell (Schwein) der chronischen myokardialen Ischämie. Durch den Einsatz eines Reduktionsstents in den Ramus circumflexus des Herzens wurde initial eine 75 % Stenose des Gefäßes induziert. 28 Tage nach Implantation konnte eine Totalokklusion des Gefäßes gezeigt werden. Die Messungen der hämodynamischen Funktionsparameter zeigten bereits zu diesem Zeitpunkt eine Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion. An Tag 28 nach Stentimplantation erfolgte eine lokale Applikation von LNA-92a in der Therapiegruppe der Versuchstiere mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion. Kontrolltiere erhielten eine PBS-Lösung ohne LNA. Weitere vier Wochen später, an Tag 56, erfolgten erneute Funktionsmessungen. Neben Messungen der globalen Herzfunktion, erfolgte ebenso die Ermittlung der regionalen Funktion mittels Sonomikrometrie nach Eröffnung des Thorax und des Perikards. Gleichzeitig wurde eine angiographische Messung zur Quantifizierung der Kollateralausbildung nach Totalokklusion durchgeführt mit darauffolgender Einteilung der distalen Gefäßfüllung der okkludierten Gefäße nach Rentrop. Postmortem erfolgte die histologische Untersuchung des ischämischen Gewebes zur Ermittlung der Auswirkungen der LNA-92a zum einen auf die Kapillarausbildung (PECAM-1) und das Gefäßwachstum mit Perizytenbildung (NG2 positive Zellen) und zum anderen zur Darstellung der Effekte auf Myozytengröße (WGA Färbung) und Ausbildung von kardialer Fibrose (Sirius Red Färbung).

Die Messungen an Tag 56 des Versuches zeigten in der Kontrollgruppe eine deutlich eingeschränkte Herzfunktion mit herabgesetzter EF (Ejektionsfraktion) und einem gesteigerten LVEDP (linksventrikulärem enddiastolischem Druck). Die mit LNA-92a behandelte Gruppe, zeigten dahingegen eine verbesserte globale Herzfunktion (verbesserte EF mit geringerem LVEDP) mit einer verbesserten regionalen Kontraktilität unter Funktionsreservebedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnte anhand weiterer Untersuchungen der vaskuloprotektive Effekt der miR-92a Suppression durch eine verbesserte Kollateralausbildung und Kapillarisierung beschrieben werden. Histopathologische Analysen ergaben eine herabgesetzte Ausbildung von Kardiomyozytenhypertrophie und Fibrose nach Applikation von LNA-92a gegenüber Kontrolltieren.

Zusammenfassend, könnte die miR-92a-Inhibition mittels LNA-92a durch ihre kardio- und vaskuloprotektive Funktion, bei gleichzeitiger chronischer Myokardischämie, eine neue therapeutische Option darstellen, womit eine neue Perspektive für die Erhaltung einer adäquaten Herzfunktion in einem hibernierenden Myokard geschaffen werden kann.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Überblick über die Funktionen von miRNAs im kardiovaskulären System	10
Abbildung 2 Relevante Regulation verschiedener Prozesse nach Myokardinfarkt.....	11
Abbildung 3 Darstellung verschiedener AntimiRs	14
Abbildung 4 Detaillierte Darstellung des Versuchsablaufs	16
Abbildung 5 Darstellung eines hibernierenden Myokards mittels PET	18
Abbildung 6 Chirurgische Anlage einer Katheterschleuse.....	20
Abbildung 7 Lokalisation des Einsatzes piezoelektrischer Kristalle in das Endokard.....	23
Abbildung 8 Darstellung eines Katheters zur selektiven druckregulierten Retroinfusion.....	24
Abbildung 9 Angiographische Darstellung zur Selektiven druckregulierten Retroinfusion (SSR) in die mittlere Herzvene.....	25
Abbildung 10 LNA-92a Applikation verbessert die globale Funktion bei chronischer myokardialer Ischämie 31	
Abbildung 11 Der Einsatz von LNA-92a verbessert die regionale myokardiale Funktion	33
Abbildung 12 LNA-92a vermittelt Angiogenese	34
Abbildung 13 LNA-92a fördert Kollateralausbildung.....	35
Abbildung 14 LNA-92a reduziert die Ausbildung myokardialer Fibrose	36
Abbildung 15 LNA-92a verhindert Myozytenhypertrophie in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie.....	37
Abbildung 16 Effekte nach lokaler Verabreichung von LNA-92a	54

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIV	<i>Vena interventricularis anterior</i>
Ak	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AngII	Angiotensin II
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Arterieller Druck
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl	Calciumchlorid
CTGF	Connective tissue growth factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dLVP/dt	Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit
dLVP/dt _{max}	Maximaler Anstieg des linksventrikulären Drucks
dLVP/dt _{min}	Maximaler Abfall des linksventrikulären Drucks
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl.: extracellular matrix)
EDL	Enddiastolische Länge
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESC	European Society of Cardiology
ESL	Endsystolische Länge
ESV	Endsystolisches Volumen
HCl	Hydrochlorid
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin
ITGA5	Integrin alpha-5
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KHK	Koronare Herzerkrankung
KLF2	Krüppel-like Factor 2
LAD	Left Anterior Descending (Coronary) Artery
LNA	Locked Nucleic Acid
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (engl.: left ventricular enddiastolic pressure)
LVP	Linksventrikulärer Druck (engl.: left ventricular pressure)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten-Chemotaktische-Protein-1
miRNA	Micro Ribonucleic Acid
MRT	Magnetresonanztomographie
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NG2	Neural/Glial Antigen 2

NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate-buffered saline
PCI	Percutaneous Coronary Intervention
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	Perkutaner transluminaler coronarer Angioplastie
PTFE	Polytetrafluorethylen
RCA	Right coronar artery
RCx	<i>Ramus circumflexus</i>
RISC	RNA-induced Silencing Complex
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
ROS	Reaktiven Sauerstoffspezies
SES	Subendothelial Segment Shortening
SIRT1	Sirtuin-1 (NAD-dependent protein deacetylase)
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl.: single-photon-emission-computed-tomography, SPECT)
SS	Segmentlängenverkürzung (engl.: segment shortening)
SSR	Synchronized Suction and Retroinfusion, Selective pressure-regulated retroinfusion
TBS	Tris-buffered saline
TGF β	Transforming growth factor β
TM	Thrombomodulin
VCM	<i>Vena cardiaca media</i>
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMCs	Vascular smooth muscle cells
WGA	Wheat Germ Agglutinin

1 EINLEITUNG

1.1 Koronare Herzerkrankung

In den heutigen Industrienationen gehören Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und in diesem Zusammenhang der akute Myokardinfarkt sowie die meist vorangegangene koronare Herzerkrankung (KHK) zu den häufigsten aller Todesursachen (Timmis et al., 2018). Laut dem statistischen Bundesamt verstarben allein in Deutschland im Jahre 2017 120.731 Menschen mit der Diagnose einer chronisch ischämischen Herzkrankheit oder an einem Myokardinfarkt (MI). Risikofaktoren wie z.B. Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes Mellitus, zusammengefasst als sogenanntes „Metabolisches Syndrom“, begünstigen die Entstehung dieser Pathologien (Framingham Herz Studie, Ross, 1999).

1.1.1 Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung

Bei der koronaren Herzerkrankung sind vor allem die *Vasa privata* des Herzens betroffen. Dabei handelt es sich zum einen um die linke Koronararterie, die sich wiederum in ihren Hauptstamm, den *Ramus interventricularis anterior* (RIVA; oder englisches Synonym *left anterior descending, LAD*) und den *Ramus circumflexus* (RCx) teilt sowie um die rechte Koronararterie (*right coronar artery, RCA*). Mehrere Endverzweigungen verbinden das koronare System. Kommt es jedoch zu der Gefäßverengung und im weiteren Verlauf zu einem kompletten Gefäßverschluss der Koronarien, reichen diese nicht aus, um die jeweilige Herzregion zu versorgen (Herold, 2007).

In den meisten Fällen, entsteht die koronare Herzerkrankung aus der Interaktion von Risikofaktoren und einer inflammatorischen Reaktion auf zellulärer sowie biochemischer Ebene. Durch den Einfluss von den oben genannten Risikofaktoren entstehen Endothelläsionen und im weiteren Verlauf chronisch inflammatorische sowie atherosklerotische Veränderungen; es bilden sich sogenannte artherosklerotische Plaques aus, die zunehmend das Gefäßlumen einnehmen (Libby, 2002; Libby & Theroux, 2005; Ross, 1999; Wolf & Ley, 2019). Dabei entstehen die als Arteriosklerose bezeichneten Gefäßveränderungen vornehmlich an Verzweigungen und Bifurkationen, wo es vermehrt zu verstärkten Flüssen mit ausgeprägten Scherkräften kommt (Caro, 2009).

Bei Gefäßverengungen ab 50 % besteht bereits eine signifikante Stenose, die zu Perfusionsstörungen führen kann, hier ist im chronischen Verlauf der Einfluss von ausgebildeten Kollateralgefäßen entscheidend. Verschließt sich das Lumen des Gefäßes immer weiter (> 75 %) bildet sich eine kritische Stenose aus. Dabei kommt es zur Erschöpfung der Koronarreserve (Differenz zwischen Koronardurchblutung in Ruhe und der maximal

möglichen Koronardurchblutung) und die Sauerstoffversorgung des entsprechenden Myokardareals kann nicht mehr stetig aufrechterhalten werden. Dies äußert sich meist in Form von pektanginösen Beschwerden. Kommt es zu einer Ruptur von arteriosklerotischen Plaques können Koronarthrombosen entstehen, die zu dem Bild eines akuten Myokardinfarktes führen (Herold, 2007; Ross, 1999).

1.1.2 Pathophysiologie des Herzinfarktes

Im Rahmen einer Koronarokklusion findet eine Zerstörung des Gewebes mit sukzessiver Ausbildung einer Nekrose statt. Diese entsteht durch die mangelnde Sauerstoffversorgung. Zudem führt ein intrazellulärer Abfall des pH-Wertes zur Zerstörung von Zellorganellen, Verlust von mitochondrialer Funktion, zu mikrovaskulärer Destruktion sowie zu Hämorrhagie und infiltrierenden Leukozyten (Heusch & Gersh, 2016). Molekulare Prozesse wie zelluläre Kalziumanreicherung durch ein Natrium-Überangebot sowie die oszillatorische Freisetzung und Aufnahme von Kalzium in das sarcoplasmatische Reticulum mit daraus resultierenden myofibrillären Kontraktionen führt zur vermehrten Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS verstärken die Prozesse und tragen ihrerseits zu der Ausbildung einer Nekrose bei (Heusch & Gersh, 2016; Ladilov, Siegmund & Piper, 1995; Tani & Neely, 1989). Dies wiederum führt zum Untergang von Kardiomyozyten und zu progredienten Einschränkungen in der Herzfunktion. Aus diesem Vorgang resultierend, kann eine adäquate Herzleistung langfristig nicht weiter gewährleistet werden. Die Kontraktilität des Herzmuskels wird zunehmend vermindert. Daher kommt es bei anhaltender Sauerstoffunterversorgung und Deprivation von versorgenden Stoffen durch Zelluntergang, Fibrosierung und Begrenzung der Myokardfunktion zu einer progredienten Herzinsuffizienz. Im Rahmen sogenannter Remodeling-Prozesse kommt es nicht nur zur Reduktion der Herzfunktion, sondern auch zu Herzrhythmusstörungen, welche zum Tod führen können. Eine zügige Revaskularisierung der Gefäßverschlüsse mithilfe von beispielsweise perkutaner transluminaler coronarer Angioplastie (PTCA) oder einer Bypass-Operation ist aktuell die Therapie der Wahl (Ginks et al., 1972; Keeley, Boura & Grines, 2003).

1.1.3 Therapeutisches Vorgehen bei KHK und Folgeerkrankungen

Die klinischen Symptome einer Ischämie können variieren. Dabei können sie in wenigen Fällen, wie bei der stillen Ischämie, unbemerkt bleiben, oder durch eine *Angina pectoris* stärkste Schmerzen verursachen oder gar zu tödlichen Verläufen führen, z.B. aufgrund des akuten Verlustes der kardialen Pumpfunktion oder Herzrhythmusstörungen, wie Kammerflimmern. Die Wiederversorgung des ischämischen Myokards ist essentiell für die

Versorgung von Kardiomyozyten sowie die Vermeidung von Nekrosen des Myokards. Die Zeit bis zur Wiedereröffnung der Koronargefäße, die sogenannte Ischämiezeit, ist ausschlaggebend für die Ausdehnung des Herzinfarkts.

Um die Wiedereröffnung der verschlossenen Herzkranzgefäße zu gewährleisten und die erneute Sauerstoffversorgung des ischämischen Myokards zu erreichen, stehen drei unterschiedliche Ansätze im Vordergrund: zum einen das interventionelle Kathetervorgehen mittels PCI, des Weiteren die medikamentöse Thrombolyse und zum dritten die Bypass-Chirurgie, die allerdings in der Akutphase des Myokardinfarktes obsolet ist. Zusammen mit der prophylaktischen, pharmakologischen Therapie durch Statine, Thrombozytenaggregationshemmer, Betablocker, Nitrate sowie Kalziumantagonisten tragen diese Therapiemaßnahmen zu einer verbesserten Prognose bei. Auf diese Weise kommt es perspektivisch zur vermehrten Akkumulation von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und Folgeerkrankungen der chronischen Ischämie wie z.B. der Herzinsuffizienz (Virani et al., 2020). Nach Ausschöpfung jeglicher Therapieoptionen bleibt als *ultima ratio* die Herztransplantation als lebensverlängernde Maßnahme, die jedoch sehr limitiert ist. Nicht nur der Zustand des Körpers, sondern der erhebliche Bedarf an Spenderorganen, der kaum gedeckt werden kann, limitieren hier die Heilungschancen.

Zusammengenommen sprechen diese Aspekte dafür, dass in Zukunft eine Erweiterung der vorhandenen Therapieoptionen sowie eine Verbesserung der Therapieergebnisse eine immer größere Rolle spielen werden. Hier rücken immer mehr verschiedene Tiermodelle in den Vordergrund, die es ermöglichen neue Therapieoptionen zu testen und zu optimieren.

1.2 Chronische myokardiale Ischämie

Definitionsgemäß führt die chronische myokardiale Ischämie im Rahmen einer durch Arteriosklerose hervorgerufenen KHK zu einer myokardialen Durchblutungsstörung, welche zu einer Minderversorgung des Myokards führt und sich in einer Herzmuskelschwäche manifestiert. Anders als beim Myokardinfarkt kommt es jedoch nicht zum akuten Zelluntergang, da die Struktur sowie der Stoffwechsel der Kardiomyozyten erhalten bleiben.

1935 beschrieben erstmals Tennant und Wiggers die Auswirkung von koronaren Gefäßverschlüssen auf die kardiale Kontraktionsfähigkeit am Hundeherzen. Es konnte gezeigt werden, dass kurze Perioden myokardialer Ischämie zu einer linksventrikulären Dysfunktion führten. Nach der Wiederherstellung des Koronarflusses, konnte bereits in kurzer Zeit eine adäquate Kontraktilität gemessen werden (Tennant & Wiggers, 1935). Auf dieser Entdeckung

basierend, wurden unterschiedliche Hypothesen aufgestellt, die dieses Phänomen erklären sollen (Braunwald & Kloner, 1982; Heyndrickx et al., 1978; Kloner, Przyklenk & Patel, 1989; Rahimtoola, 1989). Schnell war klar, dass das kardiale Gewebe Adaptionsmechanismen besitzt, die dazu führen, sich an Perioden der Minderfusion anzupassen. Nach Revaskularisierung und Wiederherstellung eines adäquaten Blutflusses in den Koronaren beispielsweise durch Bypass-Operationen, folgt eine Erholung der Funktionseinschränkung (Brundage, Massie & Botvinick, 1984; Ginks et al., 1972). Dabei wurden in der Vergangenheit unterschiedliche pathophysiologische Konditionen beschrieben: die myokardiale Präkonditionierung, das myokardiale Stunning sowie die hier im Fordergrundstehende myokardiale Hibernation (Braunwald & Kloner, 1982; Braunwald & Rutherford, 1986; Rahimtoola, 1989).

Der Begriff myokardiale Hibernation beschreibt die molekularen und physiologischen Anpassungsprozesse einer langanhaltenden subakuten oder chronischen Myokardischämie mit einer reversiblen kontraktile Funktionseinschränkung (Heusch & Schulz, 1996; Rahimtoola, 1989). Dieser Zustand ist vor allem aus der Zoologie bekannt und kann mit dem Begriff „Winterschlaf“ übersetzt werden. Dabei kommt es durch den Anbruch des Winters, aufgrund eines reduzierten Energieangebotes im Tierreich, zu einer adaptiven Verringerung des Energiebedarfs.

1.2.1 Die Pathophysiologie des hibernierenden Myokards

Rahimtoola beschrieb erstmals die Charakteristiken der Pathophysiologie der myokardialen Hibernation im Rahmen von koronaren Bypass-Studien. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit chronischer koronarer Herzerkrankung und der daraus resultierenden chronisch reduzierten, linksventrikulären Funktion durch eine Revaskularisierung mittels Bypass-Operation eine deutliche Besserung der Kontraktilität erfuhren. Des Weiteren erklärt Rahimtoola den Zustand myokardialer Hibernation als „einen Zustand prolongierter subakuter oder chronischer Ischämie“. Dabei erfolgt durch kontraktile Minderfunktion und eine Herabsetzung des Metabolismus, eine vorübergehende Anpassung an die herabgesetzte Perfusion der Koronarien. Auf diese Weise wird das Herzmuskelgewebe durch die Reduktion der Kontraktilität und des myokardialen Metabolismus vor Zellzerfall und der daraus resultierenden Nekrose geschützt. Eine weitere Reduktion der Perfusion sowie die Steigerung des Energiebedarfs würden zu einer kompletten Infarzierung des Gewebes führen (Heusch, Schulz & Rahimtoola, 2005; Rahimtoola, 1989).

Lange Zeit beruhte das Prinzip der myokardialen Hibernation auf klinischen Beobachtungen, doch weitere experimentelle Ansätze ergänzten den heutigen Stand der Forschung;

insbesondere in Hinblick auf die Pathophysiologie (Vanoverschelde et al., 1993). Mehrere Studien zeigten, dass vor allem der Umfang des myokardialen Defektes sowie die Reversibilität der Funktionsstörung auf der Länge der Ischämiezeit sowie des Ausmaßes der Koronarokklusion basieren (Gallagher et al., 1985; Homans, Sublett, Lindstrom, Nesbitt & Bache, 1988). Um dieses Phänomen erstmals zu beschreiben, prägte Ross (1991) die Bezeichnung Perfusions-Kontraktions-Gleichgewicht (engl.: *perfusion-contraction matching*).

Des Weiteren etablierte er, abhängig von der Dauer der Ischämiezeit, zwei verschiedene Formen der myokardialen Hibernation: Kurzzeit-Hibernation (engl.: *short-term hibernation*) und Langzeit-Hibernation (engl.: *chronic hibernation*). Während für die *short-term hibernation* eine Ischämiezeit von wenigen Stunden charakteristisch ist, beschreibt die *chronic hibernation* einen Status der Langzeit-Ischämie mit schmerzlosem Charakter und reversibler Funktionseinschränkung. Aktuellere Studien zeigten zudem, dass Episoden von repetitiver Ischämie und Reperfusion bei herabgesetzter Koronarreserve, beispielsweise durch körperliche Anstrengung (Sport, Stress etc.) bei Patienten mit KHK, zu den auslösenden Mechanismen der Hibernation zählen können (Camici and Rimoldi 1999; Kim et al., 2003).

Während die Langzeit-Hibernation mit erheblichen morphologischen Veränderungen einhergeht, wie z.B. Verlust von Myofibrillen entweder durch Degeneration oder Umbau der Kardiomyozyten, Verlust von Mitochondrien und Zunahme der Glykogenspeicher sowie Zunahme von Fibrose (Borgers et al., 1993; Chen et al., 1996), kommt es während der Kurzzeit-Hibernation zügig zur Erholung des Substrat- sowie Energiestoffwechsels (Sawyer & Loscalzo, 2002; Vanoverschelde et al., 1997). Dabei besteht zu Beginn eine Dysregulation von Laktataufnahme und -produktion. Es kommt zu einem koronarvenösen Anstieg des pCO₂ sowie einer Abnahme des pHs (intrazellulär und im Interstitium) und des Kreatinphosphatgehaltes. Diese Prozesse führen zur Herabsetzung der Muskelarbeit des Herzens. Trotz bestehender Durchblutungsminderung und eingeschränkter Kontraktilität passen sich alle Substrate nach nur kurzer Zeit wieder ihrem Ursprungsgleichgewicht an (Arai, Pantely, Anselone, Bristow & Bristow, 1991; Heusch, Rose, Skyschally, Post & Schulz, 1996; Schulz & Heusch, 1995). Vor allem die Akkumulation von anorganischen Phosphaten, aus dem Abbau von ATP und Kreatinphosphat, steht im Zusammenhang mit der frühen Phase der myokardialen Funktionseinschränkung (Martin, Schulz, Rose & Heusch, 1998). Eine weitere Charakterisierung der frühen Phase der Hibernation beschreibt die erhaltene inotropische Reserve. Dabei konnte gezeigt werden, dass es trotz des um 50 % erniedrigten Blutflusses, nach Gabe von Dobutamin, zur Steigerung der Kontraktilität in der betroffenen Region kommt.

In irreversibel geschädigtem Myokard wurde dagegen kein Erfolg verzeichnet. (Schulz, Guth, Pieper, Martin & Heusch, 1992).

Zusätzlich dazu konnten während der gesteigerten Herzarbeit in einem Modell der chronischen Ischämie eine erhöhte Laktatproduktion sowie erniedrigte Kreatinphosphatlevel gemessen werden. Die Verlängerung der regionalen Infusion von Dobutamin verursacht eine weitere Ausreizung der Koronarreserve. Es kommt zunächst zu einer Zunahme der Wandverdickung und bei weiterer Steigerung führt diese zur Verstärkung der kontraktilen Funktionseinschränkung mit Verschlechterung des metabolischen Stoffwechsels bis hin zur Ausbildung eines myokardialen Infarktes (Chen et al., 1995; Heusch et al., 1996, 2005; Schulz et al., 1992; Schulz, Rose, Martin, Brodde & Heusch, 1993).

Zur weiteren histopathologischen Beschreibung des hibernierenden Myokards entnahm Elässer (1998) während Bypass-Operationen von Patienten mit KHK transmyokardiale Biopsien aus Regionen mit hibernierendem Myokard. Die Befunde ergaben mehrere unterschiedliche Veränderungen. Neben einem vergrößerten extrazellulären Raum, konnte ein vermehrtes Vorkommen von Makrophagen, Fibroblasten sowie Kollagen aufgezeigt werden. Zudem zeigte sich neben einer Verbreiterung der Basalmembran und dem Verlust von Myofibrillen sowie Zytoskelettstrukturen, eine Reduzierung der kontraktilen Proteine Myosin, Titin und Actinin. Diese Beobachtungen lassen chronische Umbauprozesse, sogenannte Remodeling-Prozesse vermuten, die bei anhaltendem Myozytenverlust zu einer ischämischen Narbenbildung führen können. Eine zeitnahe Revaskularisierung konnte diesen Prozess aufhalten und eine zügige Verbesserung der Funktion herbeiführen (Chiariello, Perrone-Filardi & Ambrosio, 1993; Elässer et al., 1998; Hajin, Fallavollita, Hard, Kerr & Canty, 1999; Heusch & Schulz, 1996; Mari & Strauss, 2002; Page et al., 2015).

Der Mechanismus einer prolongierten Adaption der Myozyten an eine Hypoperfusion/Ischämie ist bisher nicht gänzlich geklärt, jedoch deuten experimentelle Studien daraufhin, dass eine reduzierte Verfügbarkeit intrazellulären Kalziums eine wichtige Rolle spielen könnte (Chiariello et al., 1993).

1.2.2 Tiermodelle der chronischen myokardialen Ischämie

Studien zur chronisch myokardialen Ischämie im Menschen beruhen meist auf Beobachtungen sowie nicht-invasiven Messungen (Vanoverschelde et al., 1993, 1997). Aufgrund der limitierenden, sehr kleinen humanen Biopsieproben und erschwerten gleichwertigen Experimentbedingungen (Ischämiezeit, Ausmaß der Gefäßokklusion, Alter, Multimorbidität, Risikofaktoren) sind somit experimentelle Vorgehensweisen mithilfe von Tiermodellen

unumgänglich, um die Auswirkungen und die Pathophysiologie chronischer Myokardischämie besser beschreiben zu können. Definitionsgemäß sollten Auswirkungen der chronischen myokardialen Ischämie, wie sie das hibernierende Myokard darstellt, anhand von Langzeitexperimenten evaluiert werden. Messungen des koronaren Blutflusses sowie der kardialen Kontraktilität geben hierbei wichtige Aufschlüsse über den funktionalen Status des Myokards.

Dabei sind reversible und den Zelltod vermeidende Bedingungen notwendig. Ebenso sind die erneute Wiederherstellung der Funktionsparameter sowie der biochemischen und zellulären Formation nach Revaskularisierung essentiell, um so die Adaptionsprozesse einer chronischen Ischämie adäquat beschreiben zu können. Diese Voraussetzungen können zu einer optimalen Charakterisierung eines hibernierenden Myokards führen. Zudem ist ebenso die Vorgehensweise zur Induktion einer Stenose relevant.

Am offenen Herzen wurden hydraulische Manschetten sowie Ameroidkonstriktoren angewandt, jedoch ist der Einsatz nur nach Thorakotomie und Perikarderöffnung möglich. Adhäsionen, Fibrose sowie die Unterbrechung koronarer Innervation sind nicht selten die Folge (Corday et al., 1974; Hood et al., 1970; Khouri et al., 1968; Vineberg et al., 1960). Zudem erlaubt die Induktion einer Stenose am offenen Thorax zwar das detaillierte Eruiere der regionalen Funktionsweise sowie des Metabolismus, allerdings stellen die Konsequenzen solch eines Eingriffes und die damit verbundenen Kosten, sowie langen postoperativen Erholungsphasen wichtige, limitierende Faktoren dar (Corday et al., 1974). So kam es in der weiteren Entwicklung der Modelle zur Anwendung von Herzkatheter-Techniken. Dabei kann durch perkutane Koronarintervention durch den Einsatz eines Reduktionsstent, eine komplette oder partielle Koronarstenose verursacht werden (Corday et al., 1974). Degenfeld et al. gelang es 2003 durch den Einsatz eines Reduktionsstents eine progrediente Okklusion der *LAD* hervorzurufen und dadurch ein ausführlich beschriebenes, adäquates Modell der chronischen Ischämie im Schwein zu etablieren (von Degenfeld et al., 2003).

Einer weiteren Arbeitsgruppe von Jameel et al. gelang es in einem Schweinmodell eine chronische Ischämie über insgesamt 6 Monate zu induzieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass unter Ruhebedingungen, trotz fortbestehender Hypoperfusion und Kontraktilitätseinschränkung, über 6 Monate ein konstant regulärer Energiestoffwechsel im hibernierenden Myokard herbeigeführt werden kann. Bei erhöhter Herzarbeit kommt es jedoch zum Abfall von zellulären Kreatinphosphat/ATP und weiterer kontraktile Funktionseinschränkungen im Vergleich zu gesundem Myokard (Jameel et al., 2011). Diese Erkenntnisse entsprechen bisherigen Beobachtungen, dass eine Mehrbelastung des Herzens

mit einer zunehmenden Einschränkung der Koronarreserve einhergeht und in einer Abnahme der Kontraktilität resultiert.

1.2.3 Nicht-invasive Diagnostische Verfahren zur Bestimmung der myokardialen Vitalität und Funktionseinschränkung

Die diagnostische Feststellung lebensfähigen Myokards kann anhand verschiedener Parameter evaluiert werden, zum einen durch Wandverdickung bzw. durch Wandbewegungsstörungen und die kontraktile Reserve, zum anderen durch den myokardialen Metabolismus oder das myokardiale extrazelluläre Distributionsvolumen. Diese Parameter zusammengenommen, können ebenso durch nicht-invasive Verfahren bestimmt werden (Bogaert, Gheysens, Dymarkowski & Goetschalckx, 2014).

Zur Verfügung stehen zum einen die Dobutamin-Stressechokardiographie, zum anderen die Vitalitätsdiagnostik (Perfusion und Metabolismus) mittels Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl.: *single-photon-emission-computed-tomography*, SPECT) und die Positronemissionstomographie (PET) oder zum anderen die Darstellung mittels Myokardszintigraphie (Thallium oder Technetium). Dabei kann im PET oder in der Myokardszintigraphie vitales von nekrotischen Myokard abgegrenzt werden. Dagegen wird mithilfe der Stressechokardiographie das Vorhandensein einer kontraktilen Reserve sowie anatomische Pathologien, wie linksventrikuläre Dilatation, Wandbewegungsstörungen oder eine fehlende Wandverdickung dynamisch betrachtet (Mari & Strauss, 2002; Medical Advisory Secretariat, 2005; Völler, Nixdorff & Flachskampf, 2000).

Eine weitere Darstellung des Myokards gelingt mit kardiovaskulärer Computertomographie (CT) sowie kardiovaskulärer Kernspintomographie (MRT, engl.: *magnetic resonance imaging*, MRI) (Bogaert et al., 2014). Hierbei findet vor allem die Kernspintomographie Anwendung. Mithilfe von Kontrastmittel lässt sich umgebautes, narbiges Gewebe direkt darstellen, da sich das Kontrastmittel vorwiegend im fibrotischen Anteil des Gewebes anreichert (van Assche, Kim & Kim, 2013).

Aktuell ist eine Kombination von mehreren Verfahren zu bevorzugen. Dabei ist zu Beginn der Diagnostik das am schnellsten zugängliche sowie kostengünstige Verfahren, die Echokardiographie, der aufwendigen Diagnostik vorzuziehen. Jedoch lässt sich erst durch die erweiterte bildgebende Diagnostik mittels der PET und des MRT eine ausführlichere Aussage bezüglich der Herzfunktion, Herzanatomie sowie der Lebensfähigkeit betroffener Herzregionen machen (Patel et al., 2013).

1.3 microRNAs

MicroRNAs (miRNAs, miRs) sind kleine 21–23 Nukleotide lange, nichtkodierende RNAs, die spezifisch an eine Ziel-mRNA binden und auf diese Weise post-transkriptionale Genexpression regulieren. Sie spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen zellulären Funktionen, wie zum Beispiel der Zelldifferenzierung, der Proliferation sowie dem Zellüberleben (Hinkel, Ng & Kupatt, 2014; Lucas, Bonauer & Dimmeler, 2018; Urbich, Kuehbacher & Dimmeler, 2008). Vor allem in den letzten Jahren nahmen sie als neue Therapiestrategie vermehrt an Bedeutung zu. Das menschliche Genom beinhaltet 1917 miRNA loci, die wiederum 2654 reife miRNAs codieren, wovon jede mehrere Ziel-mRNAs besitzt. Aufgrund der Koexpression und simultaner Zielregulation werden reife miRNAs in sogenannte Cluster zusammengefasst (Kozomara, Birgaoanu & Griffiths-Jones, 2019; Lytle, Yario & Steitz, 2007).

1.3.1 Wirkmechanismus von microRNAs

miRNAs werden im Zellkern synthetisiert. Es entstehen zunächst lange Primärtranskripte, die durch die RNA-Polymerase II transkribiert und unter anderem von den Enzymen Drosha sowie DGCR8 weiter prozessiert werden.

Nachdem die miRNA durch Exportin-5 im Komplex mit GTP-bindendem *RAS-related Nuclear Protein* in das Zytoplasma ausgeschleust und durch das Enzym RNase III Dicer weiter prozessiert wurde, verbindet sich Dicer mit anderen Proteinen, um den sogenannten *RNA-induced Silencing Complex* (RISC) zu formen. Dieser dient dazu, eine überwiegend komplementäre Ziel-mRNA post-transkriptional zu regulieren, indem es zu Inhibition der Translation oder des Abbaus der mRNA kommt (Bartel, 2009; Gregory et al., 2004; Hinkel et al., 2014). Zusammenfassend führt die Modulation einer einzigen miRNA zur Beeinflussung eines ganzen genetischen Netzwerkes wodurch komplexe Erkrankungen modifiziert werden können (van Rooij, Marshall & Olson, 2008).

1.3.2 Relevanz der miRNAs in der Forschung

Die Entdeckung von microRNAs erfolgte 1993. Zunächst konzentrierten sich die anfänglichen Studien auf die Auswirkungen von miRNAs bei Krebserkrankungen, viralen Infektionen sowie entwicklungsbiologischen Prozessen (Almeida, Reis & Calin, 2011; Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Jopling, Yi, Lancaster, Lemon & Sarnow, 2005; Lee, Feinbaum & Ambros, 1993). Beispielsweise zeigte He et al. 2005 erstmalig die Beteiligung von miRNAs in der Entwicklung von Krebszellen in *in vivo*-Experimenten. Dabei kam es nach der Überexpression des *miR-17-22* Clusters, welcher sich in menschlichen Lymphomen hochreguliert zeigt, zu Lymphomagenese in einem Mausmodell für das B-Zell Lymphom (He et al., 2005). Seit ca. 2006 rückte die Beteiligung von microRNAs an der Entstehung oder Progression von

kardiovaskulären Erkrankungen, wie z.B. Artherosklerose, Myokardinfarkt, Fibrose sowie Herzinsuffizienz, immer mehr in den Vordergrund (Hinkel, Boekstegers & Kupatt, 2012; Lucas et al., 2018; Mann, 2007; van Rooij et al., 2006; Small, Frost & Olson, 2010; Thum et al., 2008). Abbildung 1 fasst die miRs zusammen, die für etwaigen Prozesse verantwortlich sind.

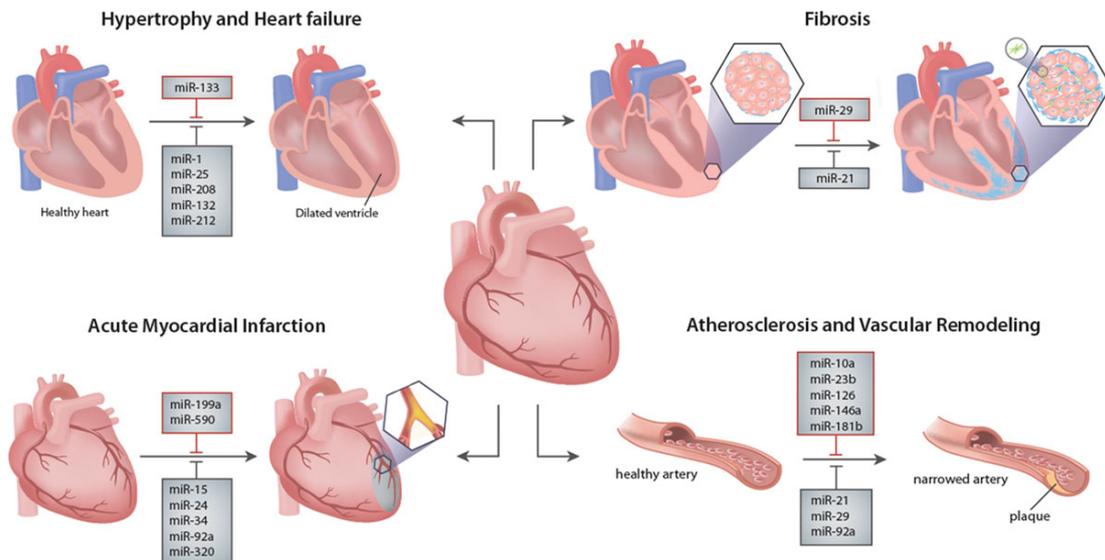


Abbildung 1 | Überblick über die Funktionen von miRNAs im kardiovaskulären System

Darstellung der Einflüsse der wichtigsten miRNAs an verschiedenen kardiovaskulären Prozessen (Lucas et al., 2018).

Schäden am Myokard in Form von Ischämien können das Vorkommen der miRNAs vor Ort verändern (van Rooij, Marshall, et al., 2008). Dies gibt wiederum Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen miRNAs und deren Auswirkung auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Darauf basierend zeigten vorangegangene Studien den Einfluss von miRs auf Remodeling-Prozesse am Herzen vornehmlich nach pathologischen, ischämischen Ereignissen. In einer Studie von Hullinger et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass miRs der miR-15 Familie, bestehend aus verschiedenen benachbarten miRs (miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-195, and miR-497), eine wichtige Rolle in der Regulierung von Hypoxie-induzierten Zelltod nach einem Myokardinfarkt spielen. Dabei kam es nach Inhibition der miR-15 in einem Modell der Ischämie und Reperfusion zur Steigerung der Resistenz von Myozyten gegenüber Zelltod (Hullinger et al., 2012). Während der Umbauprozesse nach einem Myokardinfarkt kommt es außerdem nicht nur zur Auslösung verschiedener biochemischer Prozesse, sondern ebenso zur Veränderung von zellulären Vorgängen, wie die Vermehrung von Fibrose, ein Bestandteil des kardialen Remodelings. MiR-21 zusammen mit miR-29 zählen zu den bedeutsamen Regulatoren dieses Prozesses (Lucas et al., 2018; van Rooij, Sutherland,

et al., 2008; Thum et al., 2008). Außerdem moduliert miR-21 neben dem kardialen Wachstum ebenso die fetale Genaktivierung in primären Kardiomyozyten. Zudem verändert sie die Proliferation und inhibiert Apoptose in transformierten Zellen (Cheng et al., 2007). Weiterhin, wirkt sich die Antagonisierung von miR-29 positiv auf das Remodeling von arteriosklerotischen Plaques aus, als Ansatz zur Stabilisierung instabiler Läsionen (Ulrich et al., 2016). Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Funktionen der miRs nach Infarktereignis.

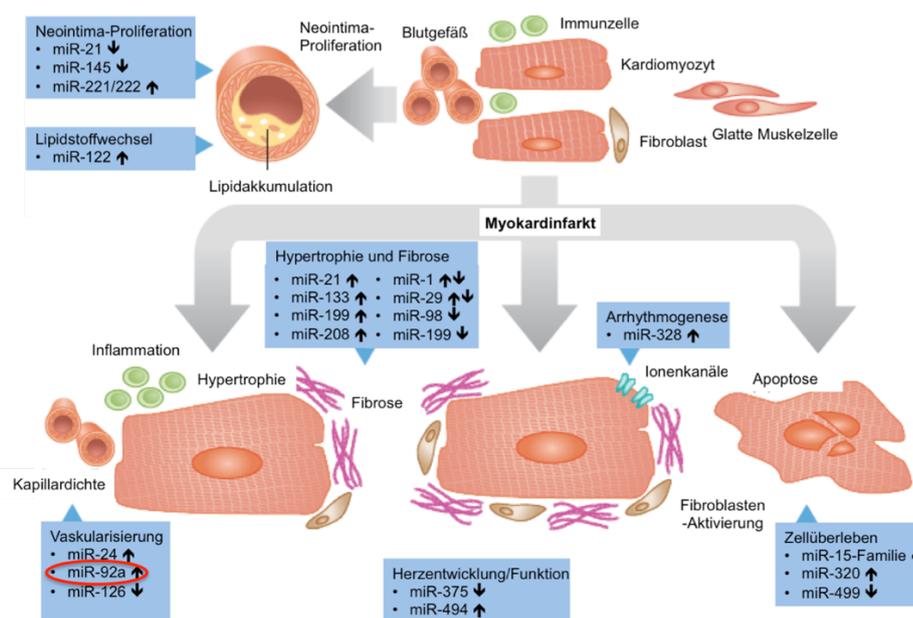


Abbildung 2 | Relevante Regulation verschiedener Prozesse nach Myokardinfarkt

Durch mehrere miRNAs werden verschiedene Optionen für neue Therapiestrategien aufgezeigt. Dabei zeigen einige miRs entgegengesetzte Wirkungen auf. (Thum, 2012)

Auch in der Ausbildung von Arteriosklerose wirken miRs als Regulatoren an unterschiedlichen Prozessen mit (Zernecke et al., 2009). In verschiedenen Studien wurden die Auswirkungen von Scherkräften auf Gefäßendothelien beobachtet (Boon, Hergenreider & Dimmeler, 2012; Holliday, Ankeny, Jo & Nerem, 2011; Wang et al., 2016; Weber, Baker, Moore & Searles, 2010). Sie führen zu Änderung der Genexpression und zur Regulation verschiedener miRs, wobei es zu morphologischen sowie funktionalen Veränderungen der Endothelzellen kommt, welche eine Arteriosklerose begünstigen können (Boon et al., 2012).

1.3.3 Die Funktion des miR-17-92a Cluster sowie Auswirkungen der miR-92a - Modulation

Die in dieser Promotionsarbeit verwendete miR-92a befindet sich auf Chromosom 13 und gehört zu dem miR-17~92a Cluster. Dieser ist ubiquitär exprimiert und besteht aus 7 maturen

miRs, miR-17-3P, miR-17-5P, miR-18, miR-19a und 19b, miR-20, und miR-92a. Knock-out Mäuse des *miR-17~92a* Clusters zeigen neben einer inadäquaten B-Zellreifung, eine Lungenhypoplasie sowie eine ventrikuläre Dysfunktion (Ventura et al., 2008). Transgene Mäuse, die miR-17 überexprimieren, zeigen ein allgemein retardiertes Wachstum mit einem reduzierten Herzgewicht sowie einen verringerten Raum zwischen den papillären Muskeln. Zudem konnte ebenfalls eine herabgesetzte Zellmigration von Endothelzellen beobachtet werden (Shan et al., 2000). Einige Studien beschrieben den Einfluss des Clusters auf weitere, spezifische Entwicklungsprozesse. Beispielsweise profitierte die Proliferation von kardialen Endothelzellen von einem hohen Expressionslevel des Clusters. Dabei kommt es durch den Einfluss des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Aktivierung der *mitogen activated protein kinase* (MAPK) sowie zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1. Ein Verlust des Clusters führt zu einer defekten Gefäßbildung (Fiedler & Thum, 2016). Anhand dieser Studien kann angenommen werden, dass diese miR-Familie eine essentielle Rolle in verschiedenen Wachstumsprozessen zu spielen scheint.

Somit ist es nicht verwunderlich, dass dieses Cluster initial als möglicher Regulator der Tumorgenese in der onkologischen Forschung beschrieben wurde. Eine konstante Überexprimierung des Clusters wurde in B-Zell-Lymphom beobachtet und förderte das Wachstum von Zellen des Bronchialkarzinoms (Hayashita et al., 2005; Ota et al., 2004). Das selektive Inhibieren von miR-17-5p und miR-20a des Clusters hingegen führte zur Apoptose von Zellen des Lungenkarzinoms (Matsubara et al., 2007). Des Weiteren konnte eine direkte Aktivierung des Clusters durch das Protoonkogen *c-myc* oder die Kombination von *c-myc* und *Ras* gezeigt werden (Dews et al., 2006; O'Donnell, Wentzel, Zeller, Dang & Mendell, 2005).

Betrachtet man die miR-92a isoliert, konnten neuere Studien ebenso die Beteiligung an der Tumorentstehung aufzeigen. Das betrifft vor allem Leukämie, Bronchial-, Lungen- sowie Ovarialkarzinome (He et al., 2005; Takakura et al., 2008). Das Auftreten der miR-92a wurde in den humanen Zelllinien HL60, Jurkat und MCF beobachtet, die entweder als leukämische Krebszellen oder als Zellen des Brustkrebses beschrieben wurden (Abasi et al., 2017; Kohram et al., 2018).

Des Weiteren konnte durch Somel et al. eine Beteiligung der miR-92a an der Gehirnentwicklung in Abgrenzung zu nicht-humanen Primaten charakterisiert werden (Somel et al., 2011).

Immer mehr rückte die miR-92a in das Visier der kardiovaskulären Forschung. Beginnend bei der Ausbildung der KHK wurde sie bereits mehrfach als pro-inflammatorischer Regulator in Endothelzellen beschrieben. Dabei aktiviert die miR-92a Prozesse zur vermehrten Bildung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und induziert auf diese Weise die monozytäre

Adhäsion bei der Bildung von Atherosklerose (Loyer et al., 2014). Zusätzlich wurde durch die Inhibition der miR-92a zum einen die Gefäßbildung im Infarktgewebe verbessert, zum anderen konnte die Re-Endothelialisierung nach vaskulärem Defekt gesteigert werden und somit die Ausbildung neointimaler Läsionen reduziert werden (Daniel et al., 2014).

In einer Studie von Bonauer et al. konnte ferner gezeigt werden, dass die Überexpression der miR-92a in humanen Endothelzellen die Ausbildung adäquater Gefäßnetzwerke inhibierte. Dabei kam es zur reduzierten Zellmigration sowie Zelladhäsion an Fibronectin. Zusätzlich führte die Hochregulation der miR-92a ebenso zu Defekten der intersegmentalen Gefäßbildung *in vitro* und im Zebrafisch. Eine Hemmung von miR-92a hingegen führt zur einer Verbesserung der Gefäßneubildung nach Ischämie im Hinterlauf-Ischämiemodell sowie im Myokardinfarkt-Modell (*LAD*-Ligation) in der Maus (Bonauer et al., 2009). Eine weitere Studie von Hinkel et al. zeigte in einem Großtiermodell der Ischämie und Reperfusion eine Reduktion der Infarktgröße sowie der eingeschränkten Herzfunktion durch eine Suppression der miR-92a. Außerdem konnte der Inhibition der miR-92a eine zellprotektive und anti-inflammatorische Wirkung zugesprochen werden (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

1.3.4 Regulierung der miRNA-Expression

Um das Wirkungsprofil der miRs beeinflussen zu können, d.h. eine Überexpression bzw. eine Runterregulierung bzw. Inhibition zu erreichen, stehen unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung. Einige vorangegangene Forschungsarbeiten konnten den Einsatz von miR-Antisense Molekülen, sogenannte AntimiRs als eine erfolgreiche Methode in diversen Tiermodellen aufzeigen (Bonauer et al., 2009; van Rooij, Marshall, et al., 2008; Thum, 2012). Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte, einzelsträngige sowie gegenläufig komplementäre Oligonukleotide, die an mature miRNA binden und daraus resultierend eine kompetitive Inhibition auslösen. Zudem können sie ebenso an eine prä-miRNA binden und eine weitere Prozessierung hemmen oder das Verlassen der prä-mRNA aus dem Zellkern erschweren (van Rooij, Marshall, et al., 2008).

Basierend auf dem Pathomechanismus der miR, führt eine Inhibition der miRNA zur Aktivierung der Genexpression wohingegen die Überexpression der miRNA eine Suppression der entsprechenden Genexpression verursacht (van Rooij & Olson, 2007). Die älteste Form der Inhibition erfolgt über die sogenannten Antagomirs. Antagomirs sind Cholesterin-konjugierte 2'-O-methyl-phosphothioat Antisense Oligonukleotide. Die Bindung an Cholesterin erleichtert eine Aufnahme in die Zelle und verbessert zudem die Stabilität.

2005 konnten Krützfeldt et al. den ersten Antagomir zur Inhibition der leberspezifischen miR-122 *in vivo* beschreiben. Dabei konnten, verglichen zur Kontrolle, nach intravenöser Injektion der Antagomire erniedrigte miRNA Level gemessen werden (Krützfeldt et al., 2005).

Seither konnten zum einen die Stabilität gegenüber Nukleasen verbessert und zum anderen mehrere chemische Modifikationen etabliert werden, die die Bindungsaffinität der Zielstrukturen stärkten und somit die *in vivo* Transfektion begünstigten. Des Weiteren stellten Sharp und Kollegen 2007 sogenannte miRNA Sponges vor, welche eine Technik darstellen, die es erlaubt, ganze miRNA Familien zu inhibieren (Ebert, Neilson & Sharp, 2007).

Eine weitere Alternative zur Inhibition der miR Expression sind *Locked-nucleic acid* (LNA) Moleküle. Dabei handelt es sich um modifizierte antisense RNAs zur Inhibition von miRNAs mit enger struktureller Ähnlichkeit zu Nukleinsäureanalogons, wodurch eine verbesserte Wasserlöslichkeit entsteht (Petersen & Wengel, 2003). LNAs sind komplett phosphosulfurierte Oligonukleotide mit einer Länge von 16 Nukleotiden. Sie zeichnen sich durch eine vermehrte Stabilität aufgrund einer zusätzlichen 2'-O-, 4'-C Methyl-Bindung zum C5-Atom des Ribosegerüsts aus. Dadurch kann die Affinität zur komplementären RNA erhöht sowie eine höhere Schmelztemperatur erreicht werden (Bonauer et al., 2009; van Rooij & Olson, 2007, 2012; Stenvang, Petri, Lindow, Obad & Kauppinen, 2012; Wahlestedt et al., 2000).

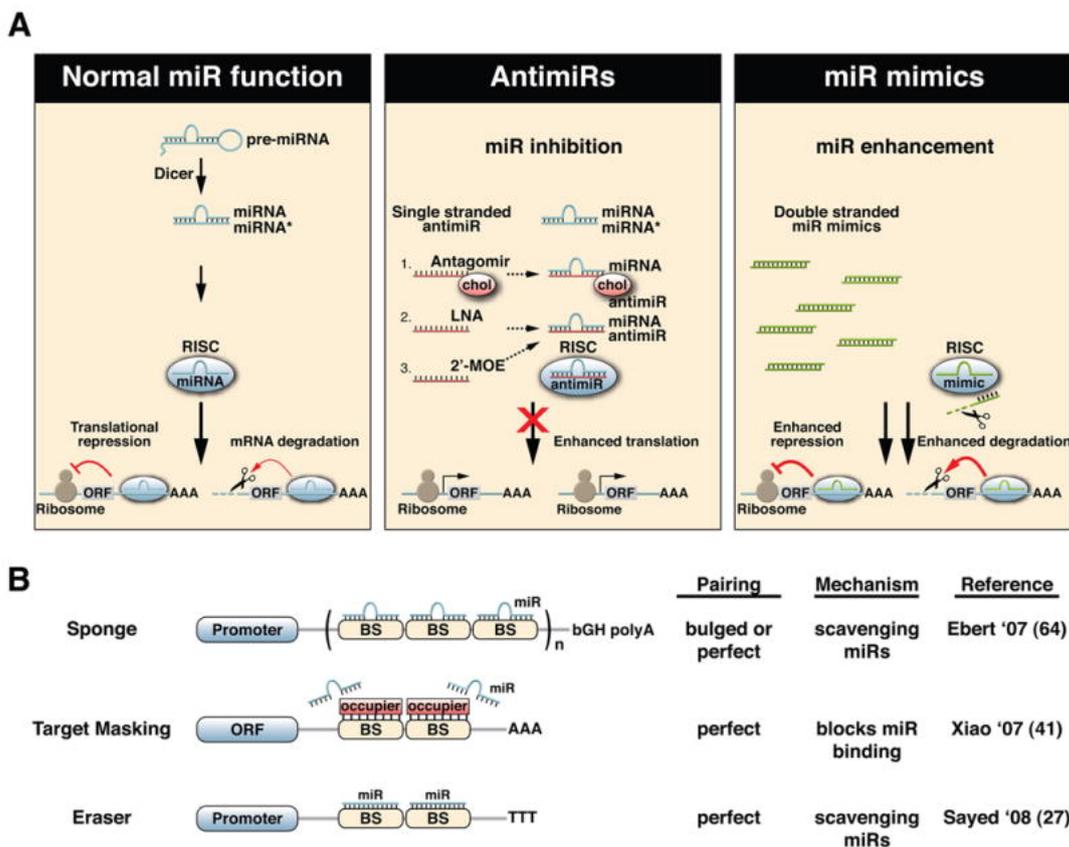


Abbildung 3 | Darstellung verschiedener AntimiRs

Darstellung von Antagomir im Vergleich zur LNA und 2'MOE sowie die Inhibition der Translation. (van Rooij, Marshall, et al., 2008).

2 ZIEL DER ARBEIT

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen der Suppression der miRNA-92a in der Zellkultur sowie im Klein- und Großtiermodellen, ergaben sich bereits deutliche Verbesserungen im Hinblick auf Neovaskularisierung und Verminderung von Apoptose und Infarktgröße (Bonauer et al., 2009; Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

In bisherigen Studien wurde der Einfluss der miR-92a Inhibition in der akuten myokardialen Ischämie oder in Infarkt-Modellen untersucht. Dahingegen sind die Auswirkungen der miR-92a Inhibition für die chronische Ischämie am Herzen bisher unklar.

In dieser Arbeit sollen die Auswirkungen der Inhibition der miR-92a im Rahmen einer chronischen Myokardischämie untersucht werden. Dazu werden LNA-92a zur Inhibition von miR-92a, sowie Reduktionsstents verwendet, die mit der Zeit zu einer sukzessiven Totalokklusion von Gefäßen führen. Als Modell wurde im Schwein die Okklusion im *Ramus circumflexus* des Herzens verwendet, um die Ausbildung eines hibernierenden Myokards zu induzieren. In diesem Modell wurde der Einfluss der LNA-92a auf die Herzfunktion, das Kollateralwachstum sowie die Kapillarisation untersucht.

Daraus resultierend, ist das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen der miR-92a -Inhibition auf die chronische Myokardischämie in einem Großtiermodell zu untersuchen, wobei die Zielparameter Myokardfunktion und -perfusion im Zentrum der Untersuchung standen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchsablauf

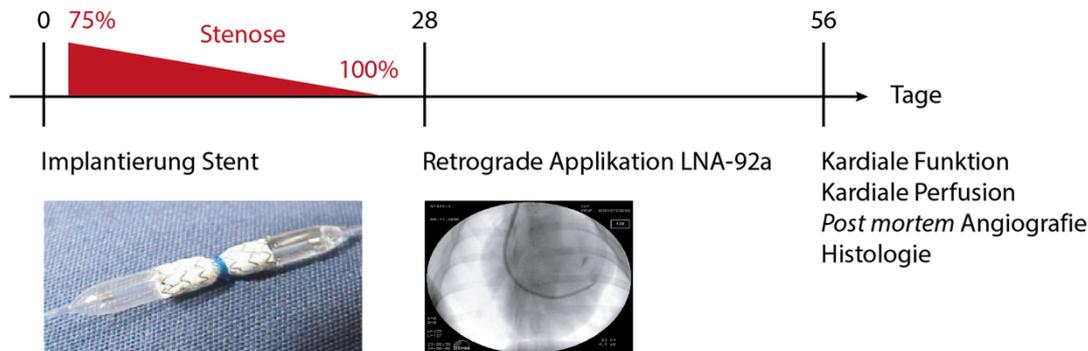


Abbildung 4 | Detaillierte Darstellung des Versuchsablaufs

An Tag 0 erfolgt die Implantation des abgebildeten Reduktionsstents. Diese Maßnahme führte bereits zu einer Stenose von 75%. Im weiteren Verlauf kam es zu einem sukzessiven Verschluss des Gefäßes mit einer Totalokklusion an Tag 28 (100% Stenose), welche mit Herzkathetertechnik in Durchleuchtung bestätigt werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt (Tag 28) erfolgte ebenso die Applikation der LNA-92a mithilfe eines Katheters zur Selektiven druckregulierten Retroinfusion in der Therapiegruppe. An Tag 56 wurden die kardiale Funktion (global und regional) sowie die Perfusion in beiden Gruppen ermittelt. Außerdem wurde eine *post mortem* Angiographie (Kollateralausbildung) sowie die Entnahme der Herzen aus dem Thorax durchgeführt, um histologische Untersuchung vorzunehmen (Abbildung 4).

3.2 Versuchstiere

In dem Versuchsablauf wurden Versuchstiere der Rasse *Deutsches Landschwein* (Kontrollgruppe n = 5; LNA-92a- Gruppe n = 4) verwendet, deren Haltung, angepasst an die gegebenen Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes, mit Genehmigung der Regierung Oberbayerns durchgeführt wurde. Die Haltung erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum, in München. Es handelte sich um männliche, kastrierte Schweine im Alter von ca. drei bis vier Monaten mit einem Gewicht zwischen 25 ± 3 kg.

3.3 Modell myokardialer Hibernation mittels perkutaner Implantation eines Reduktionsstents

Zu Untersuchung der Auswirkungen der Inhibition von miR-92a auf eine chronische myokardiale Ischämie verwendeten wir ein bereits in ausführlichen Vorarbeiten etabliertes Modell (von Degenfeld et al., 2003). Dabei führte die Implantation eines sogenannten Reduktionsstent in die *LAD* zu einem hibernierenden Myokard in einem präklinischen Großtiermodell am Schwein. Untersucht wurden die funktionelle Auswirkung des Stents vor, nach und ohne Applikation von LNA-92a. Im Folgenden werden die genauen Abläufe sowie die verwendete Apparatur beschrieben.

Zunächst wurde der Stent zentral ligiert, dass bereits eine 75 % Stenose vorgegeben wird (Abbildung 4). Eine äußere Kunststoffschicht, die sogenannte Polytetrafluorethylen-Membran (PTFE-Membran) schützt vor einem Blutfluss zwischen den bestehenden Maschen nach dem Einsatz in einem Gefäß. Dabei wurde der Stent auf eine 17 G Kanüle aufgefädelt und mit einem Faden ligiert, sodass der Durchmesser dem der Kanüle entsprach. Für den präzisen Einsatz des Stents in die RCX, wurde dieser auf einem PTCA (perkutane transluminale koronare Angioplastie) Ballon, fixiert. Nach 28 Tagen kam es allmählich zur Totalokklusion des Gefäßes durch den kompletten Verschluss des Stents (Ausbildung einer 100 % Stenose des betroffenen Gefäßes) ohne Ausbildung eines Infarktareals. Auf diese Weise entstand ein hibernierendes Myokard. Ein Nachweis dessen gelang mithilfe eines ^{14}C -Glucose- und $\text{NH}_4\text{-PET}$ in dem distal des Reduktionsstents gelegenen Myokards (siehe Abbildung 5, (von Degenfeld et al., 2003)). Dies resultierte in einer Verschlechterung der globalen und regionalen Herzfunktion. Zudem konnte nach vier Wochen ein Anstieg der LVEDP und eine Reduktion der Ejektionsfraktion gezeigt werden. Eine weitere Verschlechterung konnte ebenso am Tag 56 gemessen (von Degenfeld et al., 2003).

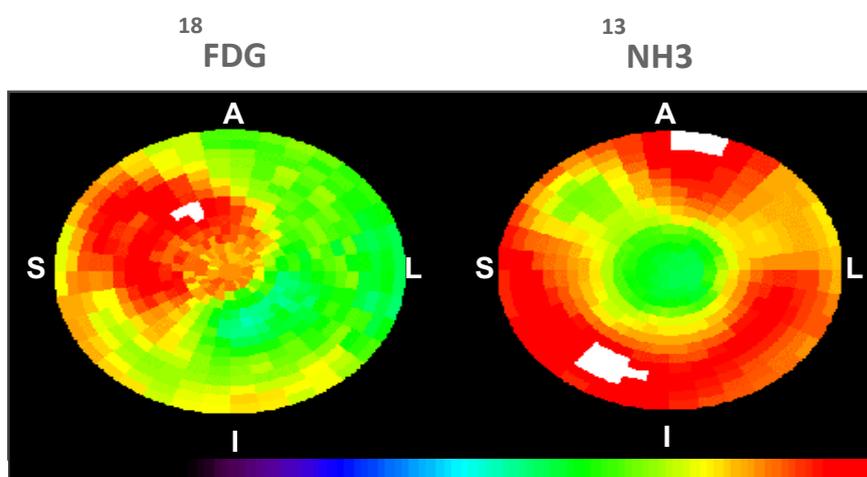


Abbildung 5 | Darstellung eines hibernierenden Myokards mittels PET

Den Versuchstieren wurde am Tag 0 ein Reduktionsstent (Abbildung 4) in die proximale RCx implantiert, welcher initial zu einer 75 %igen Lumenreduktion führt. Im weiteren Verlauf kam es zu einem kompletten Verschluss des Gefäßes (nach 28 Tagen). Es kam nicht zu einer Ausbildung einer Infarkt Narbe, sondern ein so genanntes hibernierendes Myokard entstand. Mithilfe von ^{14}C Glucose- (Hypermetabolismus) und $\text{NH}_4\text{-PET}$ (Hypoperfusion) kann in dem distal des Reduktionsstents gelegenen Myokard ein Hibernieren definiert werden. (von Degenfeld et al., 2003)

3.4 Versuchsablauf der Tierversuche

3.4.1 medikamentöse Versorgung und Überwachung

Prämedikation und antibiotische Prophylaxe

300 mg Clopidogrel (Plavix 75 mg, Bristol-Myers Squibb, New York, USA) als Loading Dose während des gesamten Versuchszeitraums eine Erhaltungsdosis von 75 mg täglich.

Am Ende der Intervention an Versuchstag 1 und 28 jeweils 500 mg Cefuroxim (Cefuroxim Hikma, Hikma Farmaceutica, Terrugem, Portugal) i.v.

Narkoseeinleitung

Azaperone (10mg/kg KG, Stresnil[®], Janssen - Cilag, Neuss, Deutschland)

Atropinsulfat (0,5 mg, Atropinsulfat Braun[®], B. Braun, Melsungen, Deutschland)

Ketamin (20 mg/kg KG, Ketavet[®] 100 mg/ml, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland)

Narkosevertiefung

Midazolam (0,2 mg/kg/KG, Dormicum[®], Hoffmann La Roche, Grenzach Wyhlen, Schweiz)

Fentanyl (0,002 mg/kg/KG, Fentanyl[®] Janssen, Cilag GmbH, Neuss, Deutschland)

Propofol (10 mg/kg/KG/h, Recofol 20 mg/ml, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Supportive intraoperative Infusionen

Hydroxyethylstärke 6 % (Volumenersatz bei Blutverlust)

Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) 500 ml Infusionsflasche zur Protektion von Herzrhythmusstörungen:

1 Ampulle Magnesium (1000mg) (Magnesiocard[®] 3 mmol Injektionslösung, Verla Pharm Arzneimittel, Tutzing, Deutschland) / 500ml NaCl 0,9 %

1 Ampulle Amiodaronhydrochlorid (Amiodaronhydrochlorid Hexal[®] 150 mg/3 ml, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) / 500ml NaCl 0,9 %

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer separierten Einleitungs- sowie Aufwachbox im Tierstall des Walter-Brendel-Instituts. Mittels intramuskulärer (i.m.) Injektion in die Nackenmuskulatur wurde die Narkose eingeleitet. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe der Tiere erreicht werden konnte, erfolgte die Anlage einer peripheren Verweilkanüle (22G

(0,9 x 25 mm) Introcan Safety W ®, B. Braun AG Melsungen, Deutschland) möglichst an einer randständigen Ohrvene. Zur Vertiefung der Narkose wurden des Weiteren Midazolam und Fentanyl (s.o.) verwendet gefolgt von einer zügigen endotrachealen Intubation der Schweine, da eine selbstständige Atmung aufgrund der muskulären Relaxation nicht mehr möglich ist. Im Anschluss darauf wurden die intubierten Versuchstiere mit einem Beatmungsbeutel bis zur Versorgung mit einem Beatmungsgerät im Operationssaal per Hand rhythmisch ventiliert. Im OP-Saal erfolgte eine Platzierung der Tiere mit der Rückseite auf den OP-Tisch gefolgt von einer Fixierung an den Vordergliedmaßen. Anschließend wurden die Beatmungsschläuche angebracht, die das Tier mit Raumluft und Sauerstoff (Servo Ventilator 900C, Siemens-Eléma, Schweden) versorgten. Eine Verlaufskontrolle der Sauerstoffsättigung im Blut wurde durch einen Pulsoxymeter (Ohmeda Biox 3700e Puls-Oximeter, Chalfont St Giles, Großbritannien) sichergestellt. Zur weiteren Sicherung der Narkose wurde eine Injektionsnarkose mit Propofol-Dauerinfusion durchgeführt. Als weitere Überwachungsmethode wurde die Anlage eines EKGs (Sirecust 304 D, Siemens, München, Deutschland) mit drei Klebeelektroden ventral an den Schultern, sowie am linken Hinterlauf, durchgeführt.

3.4.2 Anlage von arteriellen und venösen Katheterschleusen

Durch Anwendung eines Herzkatheters konnte der Zugang zum Herzen geschaffen werden, um dort den Einsatz der geplanten LNA-92a möglich zu machen. Dafür mussten die Versuchstiere mit Katheterschleusen versorgt werden. Zunächst erfolgte die Präparation der rechtsseitigen *Arteria carotis* und *Vena jugularis externa* mit chirurgischen Präzisionsinstrumenten (Wundhaken, Skalpell, Pinzette, Spatel, Schere, Faden). Hierfür erfolgte ein ca. 3 cm großer Schnitt mit dem Skalpell im Zentrum des Dreiecks gebildet von: Schultergelenk, oberes Sternumende und Kieferwinkel. Nach adäquater Detektion und Präparation der Gefäße (Inzision von subkutanem Fett- und Muskelgewebe), konnte nach Antikoagulation mithilfe eines Heparin-Bolus (10.000IE des Heparin-Natrium; 25000 I.E./5 ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) die externe *Vena jugularis* mit einer 11 French Katheterschleuse und die *A. carotis* mit einer 8F French Katheterschleuse (beide Radiofocus Introducer II, Terumo, Tokyo, Japan) kanüliert und aufgefädelt werden (Abbildung 6). Zur Orientierung dient stets der *M. strenocleidomastoideus*. Dabei befindet sich medial die Arterie und lateral die Vene.

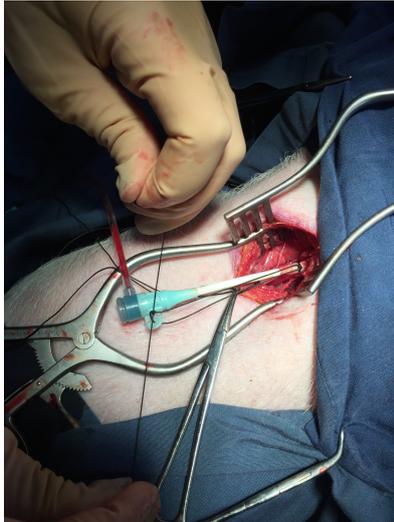


Abbildung 6 | Chirurgische Anlage einer Katheterschleuse

Implantation einer Katheterschleuse in die *Vena jugularis externa*. Zwei Wundhaken erlauben uneingeschränkte Sicht.

Nach Abschluss der Messungen an Tag 0 und Tag 28 wurden die Katheterschleusen (Tag 0 nur Arterielle Schleuse, Tag 28 und 56 venöse zusätzlich) entfernt und die Gefäße ligiert zusätzlich wurde eine subkutane sowie eine kutane Naht (Supolene 3.5/0, Resorba, Nürnberg, Deutschland) zum Wundverschluss durchgeführt. Ein ausgeprägter thorakaler bis subskapulärer Kollateralkreislauf mit großzügiger Verbindung zum Gehirn sowie Rückenmark erlaubt eine uneingeschränkte Durchblutung des Gehirns trotz Ligatur der entsprechenden Gefäße (Strauch, Lauten, Zhang, Wahlers & Griep, 2007). Für die Narkoseausleitung wurden die Tiere wieder in die vorgesehenen Tierställe gebracht.

3.4.3 Häodynamische Messungen (Tag 0, 28 und 56)

Zur Detektion der Auswirkungen der eingesetzten LNA-92a erfolgte die Messung häodynamischer Parameter: Zum einen erfolgte die Messung des arteriellen Drucks (AP) zur Darstellung der systemischen Zirkulation, außerdem wurden der linksventrikuläre Druck (LVP) und die Ejektionsfraktion (EF) zur Ermittlung der Pumpfunktion des linken Ventrikels sowie die subendotheliale Segmentverkürzung (SES) als Maß für die regionale Kontraktilität des Herzens bestimmt (nur an Tag 56 nach Thoraxeröffnung). Die globalen Funktionsmessungen fanden an allen drei Versuchstagen statt. Am ersten Versuchstag (Tag 1) wurden vor und nach Stentimplantation Baseline-Messungen erstellt, danach folgten weitere Messungen der Häodynamik an Tag 28 und 56 jeweils nach Präparation der Versuchstiere nach oben beschrieben Vorgehen (Präparation der Gefäße Einsatz von Katheterschleusen, Einsatz von Herzkathetern). Alle Aufzeichnungen von Messwerten wurden mithilfe des

Programms CardioSOFT (3.1.5, Sonometrics Corporation, London, Ontario, Kanada) durchgeführt.

3.4.3.1 Arterielle Druckmessung

Die Messung der Aortendruckkurve als Maß des systemischen Perfusionsdrucks erfolgte mithilfe einer arteriellen Schleuse, die durch einen Dreiweghahn zusammen mit einem Druckabnehmer (CardioSOFT 3.1.5, SonoMetrics, Ontario, Kanada) verbunden wurde. Die Kalibrierung des Systems erfolgte durch Bespülung des Systems mit NaCl 0,9 % (Natriumchlorid 0,9%, B. Braun, Melsungen, Deutschland; frei von Luftblasen) sowie Eichung dieses mithilfe des Umgebungsluftdruck als Referenz auf 0mmHg.

3.4.3.2 Messung des linksventrikulären Drucks (LVP) und des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP)

Ein wichtiger Parameter der globalen Herzfunktion ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP). Hierbei handelt es sich um den Druck der entsteht nach Füllung des Ventrikels, somit der gemessene Druck am Ende der Diastole, er lässt sich wie die zuvor beschriebenen Parameter ebenso mit der Herzkatheter-Technik bestimmen. Kommt es zu einer Mehrbelastung des Herzens und einer zunehmenden Einschränkung der Dehnbarkeit und somit Bewegung des Herzens/linken Ventrikels im Rahmen einer beispielsweise chronischen Insuffizienz des Herzens, induziert durch eine chronische Ischämie, steigt dieser Druck (Carroll, Hess, Hirzel, Turina & Krayenbuehl, 1985). Durch die Stent-induzierte Ischämie kommt es auch in diesem Experiment zum Zelluntergang und einer eingeschränkten Kontraktilität, es verbleibt mehr Blut nach der Systole im Ventrikel wodurch eine Volumenbelastung und Druckerhöhung (LVEDP) entsteht.

Die Messung des linksventrikulären Drucks (LVP) erfolgte durch Einlage eines Pigtail-Messkatheters (7.0 F VSL Pigtail, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada) über die arterielle Schleuse in den linken Ventrikel. Dabei wurden Aufnahmen unter Ruhebedingungen (Baseline) und unter Funktionsreservebedingungen (Pacing, Herzfrequenz 120/min, 150/min) erstellt. Für die Funktionsreservebedingungen wurde zusätzlich eine Schrittmacherelektrode an der Wand des rechten Herzhohls platziert und die Herzfrequenz mithilfe eines EKG kontrolliert.

Die sichere Lage des Katheters konnte unter Durchleuchtung (Exposcop 8000, Instrumentarium Imaging Ziehm GmbH, Nürnberg, Deutschland) sowie mithilfe der Aufzeichnung einer adäquaten Druckkurve über das angebrachte System (ADV500 PV System, Transsonic Scisense Inc., Ontario, Kanada) verifiziert werden.

Zur Messung des LVEDP wurde die linksventrikuläre Druckkurve nach der Zeit abgeleitet ($dLVP/dt$). In dem neu zusammengeführten Kurvenverlauf entspricht das diastolische Maximum dem LVEDP, entsprechend dem maximalen R-Zackenausschlag im EKG. Mithilfe des $dLVP/dt$ können Aussagen über die linksventrikuläre Druckentwicklung und Kontraktionsgeschwindigkeit (Zeit für Kontraktilität und Relaxation) getroffen werden; dabei erfolgen folgende Messungen: maximaler Druckanstieg ($dp/dt \max$) in der Anspannungsphase des Ventrikels und die Druckabfallgeschwindigkeit ($dp/dt \min$) während der Entspannung des Herzens.

3.4.3.3 Ejektionsfraktion (EF)

Die Ejektionsfraktion entspricht der Auswurfleistung des Herzens und kann mittels Ermittlung des Schlagvolumens berechnet werden. Zur Bestimmung der EF wurde eine linksventrikuläre Angiographie mit Zugabe von Kontrastmittel durchgeführt. Die Darstellung erfolgte erneut zum einen unter Ruhebedingungen und zum anderen unter Reservebedingungen (Pacing: HF 120/min sowie 150/min). Die EF wird in Prozent angegeben, dabei wird das Schlagvolumen durch das enddiastolische Volumen des linken Ventrikels geteilt und mit 100 multipliziert. Die Ermittlung des Schlagvolumens und des enddiastolischen linksventrikulären Volumens erfolgt nach der LV-Angiografie mithilfe der Software ImageJ (Version 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

3.4.3.4 Regionale Herzfunktion (Sonomikrometrie)

Die regionale myokardiale Funktionsbestimmung erfolgte mittels Sonomikrometrie (SonoMetrics, Ontario, Kanada) an Tag 56. Die Messung erfolgt über die Bestimmung der subendothelialen Segmentverkürzung (SES) (Heimisch, 1989). Dies beruht auf einer Veränderung der myokardialen Kontraktilität in vitalem gegenüber narbig umgebautem, ischämischen Gewebe (Heimisch, 1989; Ross & Franklin, 1976). Dafür erfolgte nach suffizienter Relaxation mittels intravenöser Verabreichung von Pancuronium (Pancuronium Inresa 4 mg/2 ml, Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland), sowie durch eine verstärkte Analgesie mit Fentanyl und unter tiefer Narkose eine Sternotomie. Des Weiteren wurde mithilfe von einer Pinzette und einem Skalpell die Eröffnung des Perikards durchgeführt, um einen direkten Zugang zum Herzen zu schaffen.

Nachdem mit einem Skalpell kleine Schnitte bis in das Endokard vorgenommen wurden, konnten dort zwei piezoelektrische Kristalle bis in das Endokard platziert werden. Dabei erfolgte die Platzierung der Kristalle paarweise im chronisch ischämischen Myokardgewebe, das RCx-Areal und in einem Kontrollareal, LAD-Areal (Abbildung 7). Dadurch konnte eine Differenzierung von vitalem und geschädigtem Gewebe stattfinden.

Die Feststellung der regionalen Herzfunktion mittels Sonomikrometrie erfolgte durch die Messung von Ultraschalllaufzeiten im Herzmuskel. Dabei sendet ein Kristall Ultraschallimpulse, während das andere diese als Empfänger aufnimmt. Diese Impulse werden an ein Sonomikrometriegerät weitergeleitet, wobei die Differenz der Laufzeit der Signale gemessen wird. Die dabei entstehenden Kurven dienen zur Bestimmung der lokalen Kontraktilität beruhend auf der Messung des Abstandes (Segmentlänge während Enddiastole und Endsystole). Zudem erfolgten die Messungen entsprechend der zuvor genannten Aufnahmen erneut unter Baseline- sowie Funktionsreserve-/Pacing-Bedingungen. Zur weiteren Bestimmung der regionalen Kontraktilität wurde die Verkürzung des Segmentes als prozentuale Veränderung der Segmentlänge (engl.: *segment shortening*, SS) verwendet. Die verwendete Formel lautet wie folgt:

$$SS = \left(\frac{EDL - ESL}{EDL} \right) \times 100 \%$$

SS: Veränderung der Segmentlänge in %; EDL: enddiastolische Länge; ESL: endsystolische Länge.

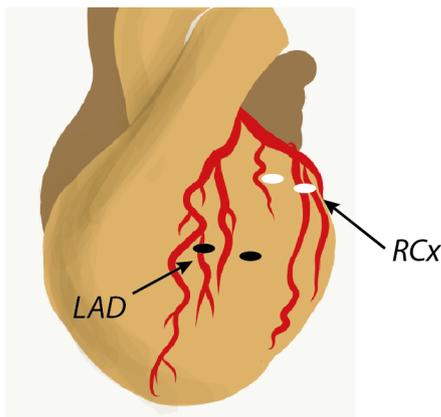


Abbildung 7 | Lokalisation des Einsatzes piezoelektrischer Kristalle in das Endokard

3.4.4 Quantifizierung und Einteilung angiographisch sichtbarer Kollateralen nach Rentrop

Zur Beurteilung der Ausbildung von Kollateralen und ihrer Perfusion nach Behandlung mit LNA-92a erfolgte nicht nur eine Quantifizierung der Kollateralen, sondern auch eine angiographische Einteilung nach Rentrop (Rentrop, Cohen, Blanke & Phillips, 1985). Zur Einteilung wurden die angiographisch sichtbaren Kollateralen von einem erfahrenen Untersucher nach der mehrstufigen Rentrop-Klassifikation eingeteilt, wobei Grad 0 keine Füllung von sichtbaren Kollateralen zeigt. Eine Füllung kleiner Seitenäste über Kollateralen entspricht Grad 1. Kommt es zu einer partiellen retrograden Füllung der stenosierten Koronararterie durch Füllung großer Seitenäste mit epikardialen Anteilen erfolgt die

Einteilung nach Grad 2. Die vollständige Füllung des Gefäßes über das Kollateralgefäßsystem entspricht Grad 3.

3.4.5 LNA Applikation

Neben der systemischen, intravenösen Gabe der LNA- 92a wurden ebenso regionale Applikationen untersucht (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

Da der anterograde Applikationsweg über das okkludierte Koronargefäß nicht offen stand, wählten wir in diesem Projekt die retrograde Applikation mithilfe eines Katheters zur Selektiven druckregulierten Retroinfusion (*selective pressure-regulated retroinfusion*, SSR; für SSR Katheter siehe Abbildung 8) (Boekstegers, Diebold & Weiss, 1990; von Degenfeld et al., 2003; Hinkel, Leberherz, et al., 2013; Hinkel et al., 2012; Hinkel & Kupatt, 2017).

Die verwendete LNAs wurde von Miragen bereitgestellt. Kontrolltiere erhielten eine PBS-Lösung von 2 ml ohne LNA. Die Therapiegruppe wurde mit 5 mg LNA-92a/kg Herzgewicht retrograd via 7 French SSR Katheter (4-lumig) (Myoprotect SSR, PTC, Mödling, Österreich) appliziert.

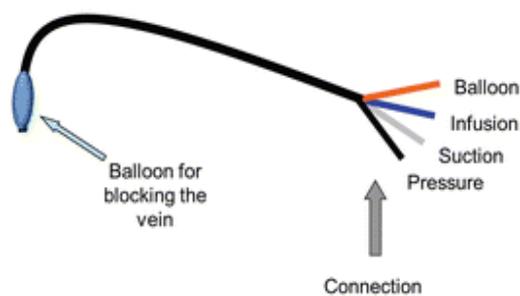


Abbildung 8 | Darstellung eines Katheters zur selektiven druckregulierten Retroinfusion

Der Katheter besteht aus 4 verschiedenen Zugängen: rot- Verbindung zum Katheter-Ballon für den Verschluss von Gefäßen, blau- erlaubt die Infusion der gewünschte Agenzien, grau- stellt einen Zugang zum Absaugen dar, schwarz- erlaubt die kontinuierliche Druckmessung in der Vene, wodurch eine druckregulierte Verabreichung von Agenzien möglich ist. Abb. modifiziert nach (Hinkel & Kupatt, 2017)

In Abbildung 9 ist der Vorgang der retrograden Applikation mit SSR Katheter dargestellt. Dabei wurde der SSR Katheter (Abbildung 9B) in die Vene platziert, die das ischämische Gebiet der betroffenen Koronararterie versorgt, in diesem Fall ist es die *Vena cardiaca mediana* (mittlere Herzvene). Solange wurde das distale Ende der Vene blockiert (Abbildung 9B, „Occlusion“). Der selektive retrograde Fluss durch die *Vena cardiaca media* (VCM) wurde durch das proximale Blocken (mittels PTCA Ballon) der *Vena intraventricularis anterior* (AIV) gewährleistet. Die Kontrastdarstellung entspricht dabei dem Verlauf der LNA-92a Lösung. Um eine adäquate Verteilung der Lösung und somit eine effektive Versorgung des RCx-Zielgebietes

zu garantieren, wurde über den SSR Katheter eine EKG getriggerte, druckregulierte Infusionseinheit angebaut. Zum Zeitpunkt der Diastole wurde die LNA-92a-Lösung durch Druckerhöhung und Flussumkehr kontrolliert bis in das Kapillarbett retroinfundiert, zum Zeitpunkt der Systole hingegen konnte ein Absaugen durch den SSR Katheter erfolgen (Hinkel & Kupatt, 2017; Vachenaer, 2009).

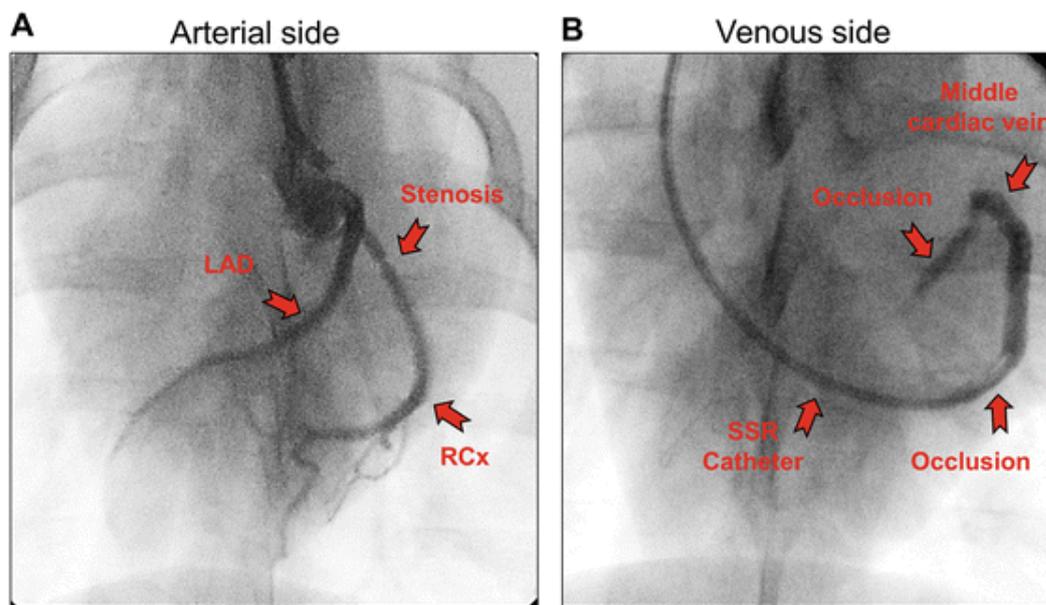


Abbildung 9 | Angiographische Darstellung zur Selektiven druckregulierten Retroinfusion (SSR) in die mittlere Herzvene

(A) Angiographie der *LAD* und des *RCx* (rote Pfeile). Zudem mit einem roten Pfeil markiert ein Reduktionsstent im *RCx* nach Implantation an Tag 0. (B) Die rechte Abbildung zeigt die angiographische Darstellung der mittleren Herzvene (*Vena cardiaca media*). Abb. nach (Hinkel & Kupatt, 2017)

3.5 Molekulare Experimente

Für alle histologischen Färbungen wurden 5µm dicke Kryoschnitte des gewonnen hibernierenden Myokards angefertigt und pro Objektträger (Thermo Scientific Superfrost® Plus Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland) ca. 3–4 Schnitte aufgezogen. Zur Lagerung vor Verarbeitung wurden die Objektträger mit Material bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.1 Kapillar- und Perizyten-Färbung

Verwendete Materialien

PBS		
NaCl	8 g	B. Braun MelsungenAG, Melsungen Deutschland
KCl	0,2 g	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	0,24 g	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	1000 ml	

Zusätze		
Aceton	4° C	Merck, Whitehouse Station, USA
Hydrophober Stift (Dako Pen)		Dako, Hamburg, Deutschland
Vectashield Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Vector Laboratories, Burlingame, USA

Blocking Solution (gelöst in PBS)		
Bovine Serum Albumine (BSA)	2 %	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Triton-x-100	0,2 %	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

Antikörper		
CD31/Pecam-1/Rabbit IgG in Blocking Solution (Primärantikörper)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-Goat IgG-R (Donkey) in Antibody Diluent (Sekundärantikörper)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-NG2, Rabbit IgG (Primärantikörper)	1:200	Chemicon GmbH, Nürnberg, Deutschland
Anti-rabbit IgG, Alexa 488 (Sekundärantikörper)	1:200	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Mit einer weiteren histologischen Methode erfolgte die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Kapillaren und Perizyten, sogenannte Stützzellen der Kapillaren, wodurch Aussagen über die Neubildung sowie Reifung und Festigkeit der entstandenen Gefäße getroffen werden konnten. Mithilfe einer Antikörperdoppelfärbung, wofür Fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet wurden, konnten durch eine Antikörper-Antigen-Bindung Kapillaren/Endothel (CD31 positive Zellen; PECAM positive Zellen: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) sowie Perizyten (NG2 positive Zellen: Neural/ Glial Antigen 2) sichtbar gemacht werden. Verwendet wurde ein in unserem Labor bereits etabliertes Protokoll für Kryoschnitte von Schweineherzgewebe. Die PECAM-NG2 Doppelfärbung bot eine Möglichkeit sowohl Endothelzellen als auch Perizyten parallel zu beurteilen, um somit nicht nur eine Aussage über die Neuentstehung von Kapillaren zu treffen, sondern auch über deren Reifung durch Anlagerung von Perizyten.

Zuerst erfolgte die Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger bei 4 °C mithilfe von Aceton für ca. 15 min. Anschließend folgten drei Waschgänge für je 5 min mittels PBS, das nach dem letzten Waschgang vorsichtig abgeklopft wurde. Danach wurden die einzelnen Schnitte auf dem Objektträger mit einem hydrophoben Stift markiert, sodass geringere Mengen an Substrat zur Färbung verwendet werden konnten und ein Auslaufen vom Objektträger verhindert wurde. Vor dem Färbeschritt wurden die Schnitte mit einer „Blocking solution“ (Antibody diluent) versehen, die unspezifische Bindungen verhindern sollte. Die Inkubationszeit betrug 20 min, gefolgt von drei fünfminütigen PBS-Waschgängen zur Entfernung der Lösung. Daraufhin konnte die Färbung mittels Primärantikörper angeschlossen werden. Dabei wurde der CD31 -AK in 2 % BSA gelöst und die Schnitte damit beträufelt. Die Inkubation erstreckte sich über Nacht unter gekühlten Bedingungen (4 °C). Am darauffolgenden Tag konnte der Antikörper mit erneuten drei fünfminütigen PBS-Waschgängen entfernt werden, anschließend wurde der Sekundärantikörper für zwei Stunden aufgetragen und bei Raumtemperatur belassen. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS und der zweite Antikörper (NG2-AK) konnte aufgetragen werden mit anschließender Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach dem Abwaschen des Antikörpers mit reinem PBS (3x) konnte ein passender Sekundärantikörper zur Fluoreszenzdarstellung aufgetragen werden. Schließlich wurde auch dieser abgewaschen und in einem letzten Schritt erfolgte das Versiegeln der Objektträger mit Deckglas und einem Medium (Vectashield Mounting Medium) das ebenso DAPI zur Zellkernfärbung enthielt.

Anschließend erfolgte die Betrachtung der bearbeiteten Gewebeproben unter einem Fluoreszenzmikroskop. Zur weiteren Quantifizierung wurden mikroskopische Bilder mit *high-power field* Vergrößerung (40-fach) aufgenommen und 5 unabhängige Aufnahmen pro Region und Tier quantifiziert

3.5.2 Kardiomyozytengröße: Wheat Germ Agglutinin Färbung

Zur Beurteilung einer Auswirkung der LNA-92a auf die Zellgröße bzw. Zellzunahme erfolgte eine Wheat Germ Agglutinin (WGA) Fluoreszenzfärbung des Zytoskeletts der Kardiomyozyten. Anschließend wurden die Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt und fotografiert. Für die Auswertung wurde die standardisierte Fläche der Zellen pro definierten Rahmen (5x5 µm) gemessen, dazu wurde das Programm ImageJ (Version 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) verwendet.

Verwendete Chemikalien		
Aceton		Merck, Whitehouse Station, USA
Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor® 488 Conjugate	100 µg/ml	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂	1 mM	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Vectashield Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) PBS		Vector Laboratories, Burlingame, USA siehe oben

Initial wurden die frischen Kryoschnitte über 5–10min aufgetaut und anschließend 10 min mit Aceton (4 °C) vorsichtig fixiert. Daraufhin wurde das Aceton drei Mal je fünf Minuten mit PBS abgewaschen. Nach dem Waschen folgte die WGA Färbung mit dem WGA Antikörper gelöst in 1 mM Calciumchlorid und PBS über 1 Stunde. Anschließend konnte der Antikörper erneut in drei Waschrunden jeweils fünf Minuten mit PBS abgewaschen werden. Zuletzt wurden die eingefärbten Schnitte mit DAPI-Medium (Vectashield Mounting Medium) und einem Deckglas versiegelt und kurzzeitig bei 4 °C gelagert. Eine zügige Auswertung ermöglichte ein besseres Darstellen der Fluoreszenzfärbung, welche mit der Zeit verblasste.

3.5.3 Quantifizierung von Gewebsfibrose mittels *Sirius Red* Färbung

Vorangegangene Arbeiten zeigten eine Zunahme von Fibrose in Ischämie-bedingt geschädigtem Myokard (Creemers & Van Rooij, 2016; Krenning, Zeisberg & Kalluri, 2010; Zeisberg & Kalluri, 2010). Für das mikroskopische Sichtbarmachen der Fibrose wurde eine *Sirius Red* Färbung verwendet. Mithilfe dieser Färbung konnte eine Quantifizierung der Fibrose erfolgen. Dabei wurden die Teile des Herzens verwendet, die das RCX-Areal repräsentierten.

Verwendete Chemikalien		
Sirius Red		Polysciences Inc., Warrington, USA
HCl		Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Hämalaun		Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol		Merck, KGaA Darmstadt, Deutschland
Entellan		Euromex, Bratislava, Slowakei
Bouin-Lösung		
Gesättigte wässrige Pikrinsäurelösung	15 ml	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Eisessig	1 ml	Merck, Whitehouse Station, USA
Formol	5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland

In der *Sirius Red* Färbung wird Kollagen rot gefärbt als Kontrast zu dem gelb gefärbten Zellstroma. Zellkerne werden durch Hämalaunfärbung blau dargestellt. Die Färbeschritte verliefen wie folgt: Zunächst erfolgte für eine Stunde eine Inkubation der Gewebeschnitte in Bouin-Lösung bei 37 °C; gefolgt von einer Stunde Inkubation in 0,1 % Sirius Red/Pikrinsäure Lösung. Daraufhin wurden die Gewebeproben kurz in 0,01 N HCl Lösung eingetaucht, damit Überfärbungen vermieden werden. Die Salzsäure wurde in einem Waschgang in *Aqua dest.* entfernt. Nach dem Waschgang konnte für 5 min die Kernfärbung mit Hämalaun vorgenommen werden. Danach wurden die Proben 5 min gewaschen. Zur Dehydrierung wurde das Eintauchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe benötigt: EtOH 70 % kurz, EtOH 96 % für 3 m, EtOH 100 % für 3 m, EtOH 100 % für 3 m, EtOH 100 % für 2 m, Xylol für 10 m. Zum Schluss erfolgte die Einbettung mittels Entellan.

Nach Abschluss der Färbung wurden die Gewebeproben unter einem Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 10-fach Vergrößerung (*low power field*). Rote fibrotische Areale wurden prozentual mittels ImageJ (Version 1.43u, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) in 5 unabhängigen Aufnahmen quantifiziert.

3.6 Statistik

Soweit nicht anders gekennzeichnet sind Resultate als Mittelwert \pm Standardfehler (engl.: standard error of the mean, SEM) dargestellt. Signifikante Differenzen wurden mithilfe des ungepaarter t-tests oder eine ANOVA-Analyse mit anschließendem Bonferroni-Test berechnet. Zur Berechnung wurde die Software GraphPad Prisma (version 8.2.0 für macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) verwendet.

Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert < 0.05 festgelegt. Signifikante Resultate wurden mit einem Stern (*), hochsignifikante Ergebnisse hingegen mit zwei (**; $p < 0.01$) bzw. drei (***; $p < 0.001$) Sternen gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Versuchsablauf

Zur Untersuchung des Einflusses von LNA-92a während einer chronischen Myokardischämie wurde LNA-92a behandelte Schweine mit Kontrolltieren verglichen. Um eine chronischen Myokardischämie zu simulieren erfolgte der Einsatz von Reduktionsstents in den *Ramus circumflexum* des Herzens. Der gesamte zeitlich Versuchsablauf ist in Abbildung 4 dargestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Einzelexperimente beschrieben.

4.2 Verbesserung der globalen myokardialen Funktion bei chronischer myokardialer Ischämie nach LNA-92a Applikation

Die Bestimmung der globalen myokardialen Funktion erfolgte anhand von linksventrikulären Druckmessungen sowie einer Messung der Auswurffraktion mit Hilfe von linksventrikulären Angiographien (Abbildung 10). Dabei zeigte sich in beiden Gruppen bis Tag 28 nach Implantation des Reduktionsstents ein Anstieg des LVEDP (Kontrolle: 16 ± 1 mmHg; LNA-92a: 15 ± 1 mmHg) entsprechend einer Schädigung des Myokards mit konsekutiver eingeschränkter linksventrikulärer Herzfunktion. Nach Applikation der LNA-92a an Tag 28, konnte im weiteren Verlauf in der Therapiegruppe eine deutliche Reduktion des LVEDP an Tag 56 gemessen werden (Kontrolle: 17 ± 1 mmHg; LNA-92a: 11 ± 1 mmHg).

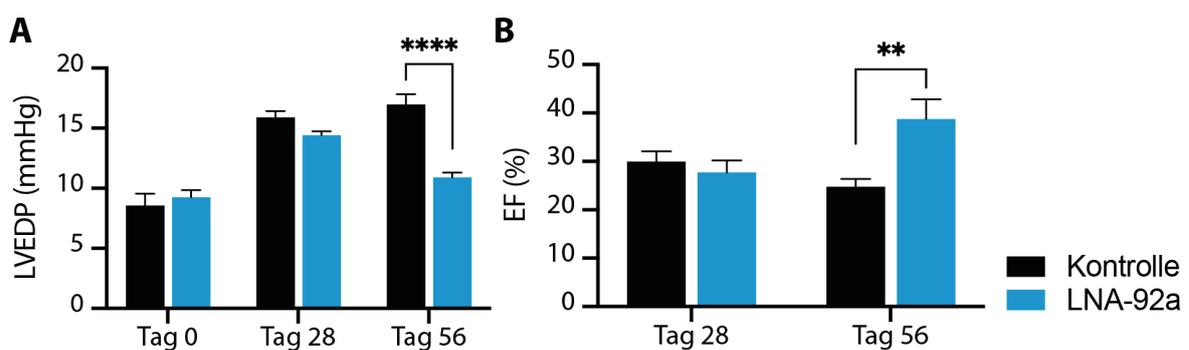


Abbildung 10 | LNA-92a Applikation verbessert die globale Funktion bei chronischer myokardialer Ischämie

(A) Der Linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) ist zunächst bei beiden Gruppen an Tag 28 erhöht wohingegen an Tag 56 eine Reduktion des LVEDP nach regionaler Applikation der LNA-92a (n= 4 Tiere), nicht aber in der Kontrollgruppe (n=5 Tiere) beobachtet werden konnte ($p < 0,0001$). (B) Im Gegensatz zur Kontrollgruppe (n=4 Tiere) konnte in der LNA-92a-behandelten Therapiegruppe (n=4 Tiere) eine Erholung der linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) zwischen Tag 28 und Tag 56 verzeichnet werden ($p = 0,0072$). Mittelwert \pm SEM.

Die Bestimmung der Ejektionsfraktion (EF) erfolgte ebenso am Tag 28 und Tag 56. Die Abbildung 10 zeigt eine eingeschränkte EF in beiden Gruppen an Tag 28 nach Implantation des Reduktionsstents als Folge von chronisch ischämischen Schäden (Kontrolle: 30 ± 2 mmHg; LNA-92a: $28 \pm 2,5$ mmHg). Es zeigt sich hingegen eine deutliche Erholung der linksventrikulären EF nach Applikation von LNA-92a im Verlauf von Tag 28 zu Tag 56 und eine weitere Verschlechterung der EF in der unbehandelten Kontrollgruppe (Kontrolle: $25 \pm 1,5$ mmHg; LNA-92a: 39 ± 4 mmHg).

Die Messung der Druckentwicklung über die Zeit (dP/dt) erbrachte hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen (nicht gezeigt).

4.3 Verbesserung der regionalen myokardialen Funktion durch den Einsatz von LNA-92a

Aufgrund der Notwendigkeit des Zugangs am offenen Herzen erfolgte die Analyse der regionalen Myokardfunktion ausschließlich am Tag 56. Mittels Sonomikrometrie wurde die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) des ischämischen Areals ermittelt und mit der SES eines normal perfundierten, nicht ischämischen *LAD* Areals verglichen. Dies erfolgte unter Ruhe- und Funktionsreserve-Bedingungen mittels rechtsatrialem Pacing auf 120–150 Schläge pro Minute. Die Abbildung 11 zeigt, dass es bereits in Ruhe zu einer tendenziellen Verbesserung der Kontraktilität bei LNA-92a behandelten Tieren im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren kommt (Kontrolle: Baseline 35 ± 13 %; LNA-92a: Baseline: 68 ± 16 %).

Zur Analyse der Funktionsreserve wurden rechtsatriales Pacing auf 120 bzw. 150 Herzschläge pro Minute induziert. Dadurch konnte eine deutliche Verschlechterung der regionalen Herzfunktion in den nicht behandelten Versuchstieren aufgezeigt werden (Abbildung 11B; Kontrolle: HF 120 25 ± 9 %; HF 150 8 ± 3 %), während die mit LNA-92a behandelten Tiere eine gleichbleibende Kontraktilität bei 120 und 150 Herzschlägen pro Minute zeigten (Abbildung 11B; LNA-92a: HF 120: 74 ± 19 %, $p < 0,05$; HF 150 70 ± 11 %, $p < 0,01$).

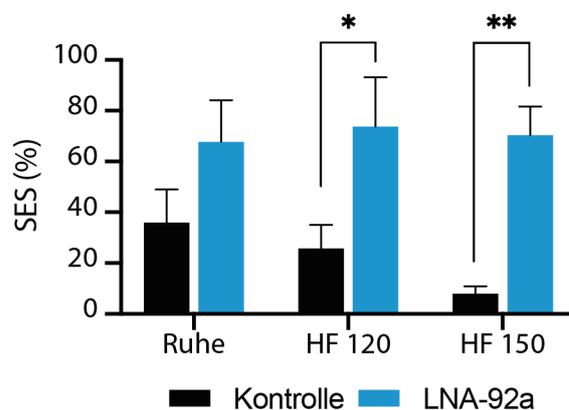


Abbildung 11 | Der Einsatz von LNA-92a verbessert die regionale myokardiale Funktion

Die Subendotheliale Segmentverkürzung bei Ruhe sowie unter funktioneller Reserve (120 und 150 Herzschläge pro min) dargestellt als Quotient (in %) der ischämischen Region im Vergleich zu einem nicht ischämischen Areal (*LAD*). Die Behandlung mit LNA-92a (n=4 Tiere) führte zu einer Verbesserung der regionalen myokardialen Funktionreserve im Vergleich zu nicht behandelten Versuchstieren (n=5 Tiere; HF 120: p=0,0393; HF 150: p=0,0059). Mittelwert \pm SEM.

4.4 Beeinflussung der Angiogenese durch LNA-92a in chronischer myokardialer Ischämie

Der Einfluss der LNA-92a auf die Angiogenese wurde durch eine Untersuchung der neu ausgebildeten Kapillaren bestimmt. Dazu wurden Endothelzellen der Kapillaren und deren Stützzellen, die sogenannten Perizyten, quantifiziert. Es erfolgte eine PECAM-1 Färbung zur Darstellung der Endothelzellen in der betroffenen, hibernierenden Region des Herzens (Abbildung 12A). Eine Auszählung der PECAM-1 positiven Zellen zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl von Endothelzellen in der LNA-92a-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12B; LNA-92a: 680 ± 25 , Kapillaren pro Gesichtsfeld; Kontrolle: 440 ± 28 Kapillaren pro Gesichtsfeld).

Mittels einer NG-2 Färbung konnten die Perizyten quantifiziert werden. Auch hier konnte im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: 328 ± 25 Perizyten pro Gesichtsfeld) ein signifikanter Anstieg von Perizyten nach verabreichter LNA-92a in der Therapiegruppe gezeigt werden (Abbildung 12B; LNA-92a: 479 ± 26 , Perizyten pro Gesichtsfeld).

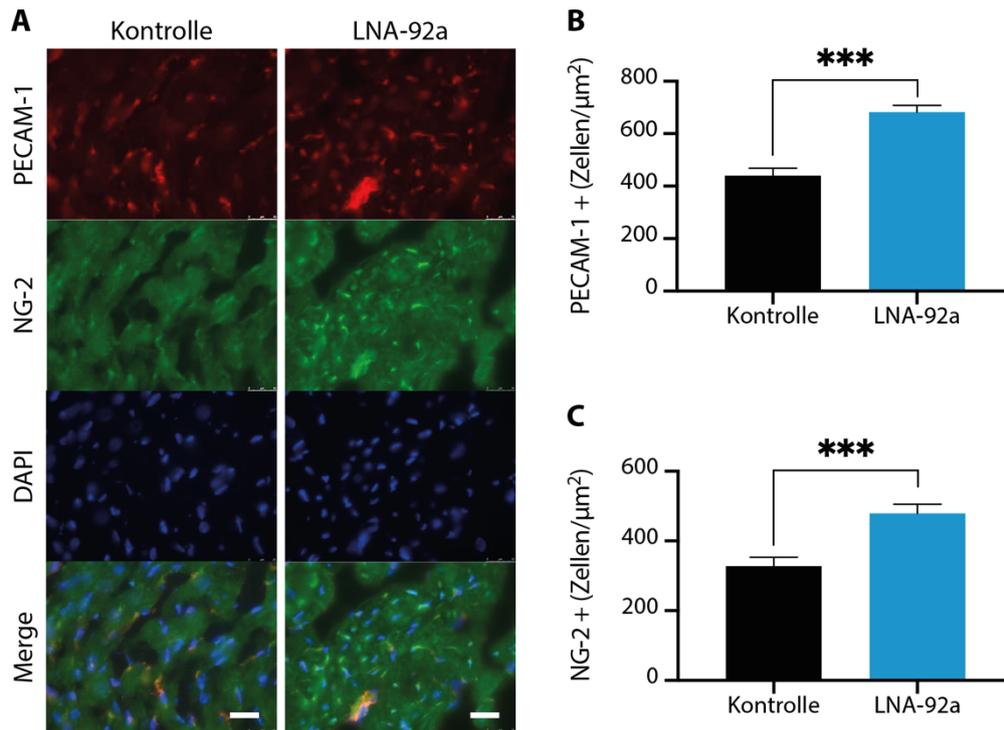


Abbildung 12 | LNA-92a vermittelt Angiogenese

(A) Fluoreszenzaufnahmen von kardialen, ischämischen Muskelgewebe nach PECAM-1 (rot)/NG-2 (grün)/DAPI (blau) Fluoreszenz-Färbung, Balken = 25 μm . Quantifizierung der PECAM-1 positiven Kapillaren (B, $p = < 0,0001$) sowie NG-2 positiven Perizyten (C, $p = 0,0004$) in der Kontrollgruppe ($n=5$ Tiere) gegenüber LNA-92a behandelte Versuchstiere ($n=4$ Tiere). Mittelwert \pm SEM.

4.5 Auswirkungen der miRNA-92a Inhibition auf die Arteriogenese

Die Auswirkungen der LNA-92a auf die Arteriogenese, die eine Kollateralausbildung aus bereits existierenden arteriolären Anastomosen beschreibt, wurden an Tag 56 untersucht. Die Ausbildung der Kollateralen, war in der Gruppe der Kontrolltiere deutlich eingeschränkt ($2,1 \pm 0,5$ sichtbare Kollateralen pro Herz; Abbildung 13B). Im Vergleich dazu zeigte die mit LNA-92a behandelte Großtiergruppe am Tag 56 eine vermehrte Kollateralausbildung infolge der chronischen Totalokklusion des RCx ($6,0 \pm 0,5$ sichtbare Kollateralen / Herz; Abbildung 13B).

Auch die Einteilung der distalen Gefäßfüllung der okkludierten Gefäße nach Rentrop (*engl.: Rentrop score*) erreichte höhere Level in den LNA-92a behandelten ($2,4 \pm 0,2$; Abbildung 13C) gegenüber unbehandelten Schweinen ($1,3 \pm 0,2$ Abbildung 13C).

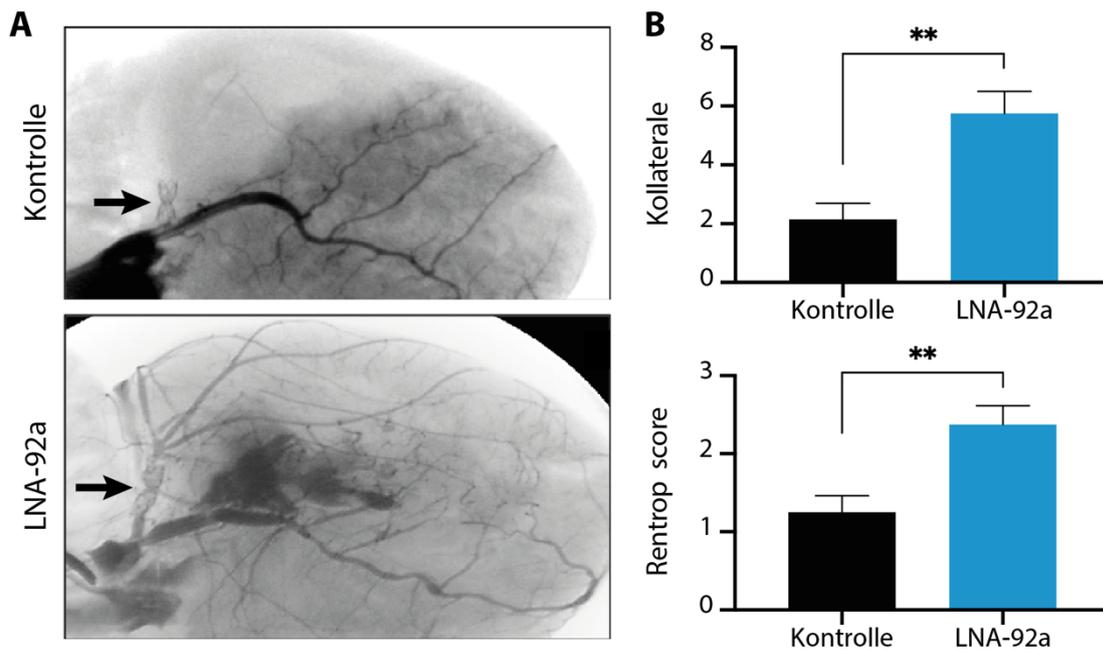


Abbildung 13 | LNA-92a fördert Kollateralausbildung

(A) Kollateralwachstum bestimmt an Tag 56; die Pfeile zeigen den Sitz des Reduktionsstanz im RCx des Koronarsystems. (B) Quantifizierung des Kollateralwachstums: LNA-92a behandelte Versuchstiere (n=4 Tiere) zeigten eine signifikant höhere Anzahl ($p=0,0036$) von Kollateralen im Vergleich zu Kontrolltieren (n=6 Tiere). (C) Die Einteilung des distalen Füllungsgrades der Kollateralen nach dem Rentrop Score zeigte signifikant höhere Level ($p=0,0089$) nach LNA-92a (n=4 Tiere) Applikation gegenüber Kontrolltieren (n=6 Tiere). Mittelwert \pm SEM.

4.6 Reduzierung der myokardiale Fibrose durch LNA-92a

Die Quantifizierung der fibrotischen Anteile des Ventrikels gibt Auskunft über den Myozytenverlust durch die chronische Ischämie und der daraus resultierenden Fibroseausbildung. Die Darstellung von Fibrose im Gewebe erfolgte durch eine *Sirius Red* Färbung (Abbildung 14A).

Die Ergebnisse der Quantifizierung zeigten an Tag 56 eine geringere Fibroseausbildung im linken Ventrikel von mit LNA-92a behandelten Versuchstieren ($12,5 \pm 0,5$ %) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ($18,0 \pm 0,3$ %) (Abbildung 14B).

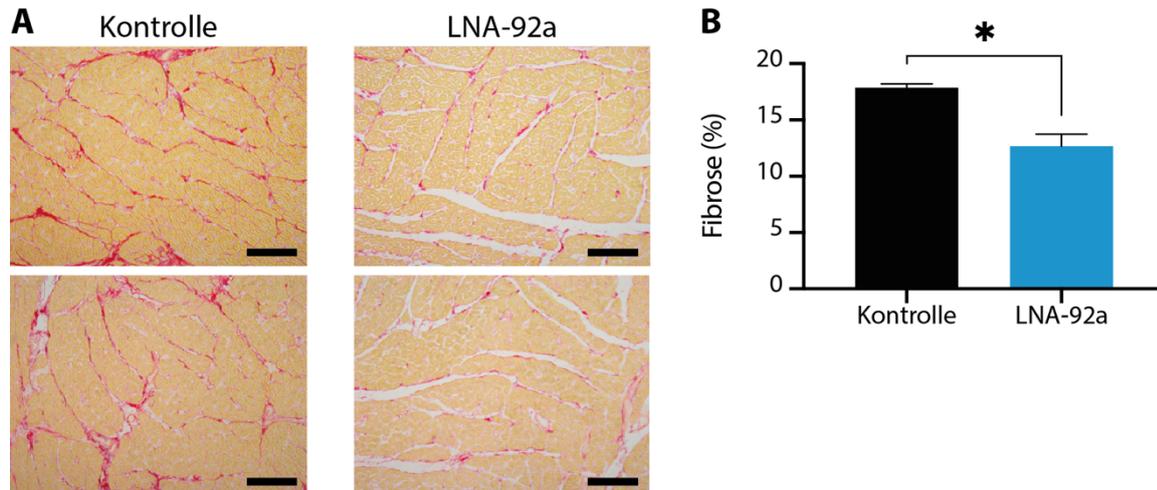


Abbildung 14 | LNA-92a reduziert die Ausbildung myokardialer Fibrose

(A) Fluoreszenzaufnahmen von kardialen, ischämischen Muskelgewebe nach *Sirius Red* Färbung zur Darstellung von Gewebsfibrose. Zellstroma zeichnet sich in Gelb ab, wohingegen die fibrotischen Zellanteile rot gefärbt sind. Balken = 100 μm . (B) Quantifizierung der Fibrose in LNA-92a-behandelten gegenüber nicht-behandelten Tieren; Der Fibrosegehalt wird angegeben in Prozent Flächenanteil am linken Ventrikel. Im Vergleich mit der Kontrolle (n=5 Tiere) zeigt die Applikation von LNA-92a (n=4 Tiere) eine quantitativ verminderte Fibroseausbildung ($p=0,0121$, Welch's t test). Mittelwert \pm SEM.

4.7 Verhinderung der Myozytenhypertrophie nach LNA-92a Applikation in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie

Beobachtungen zeigten, dass es durch den Einsatz des Reduktionsstents zu einer progredienten Druckbelastung des linken Ventrikels kommt. Dies wird am ehesten induziert durch die Einschränkung der Herzfunktion bei fehlender Durchblutung des betroffenen Areals und der daraus resultierender Sauerstoffminderversorgung des Gewebes nach Implantation eines Reduktionsstents in die *RCx* (von Degenfeld et al., 2003). Aufgrund dieser pathologischen Remodeling-Prozesse wurden in der vorliegenden Arbeit Hypertrophie-Zeichen des betroffenen, hibernierenden Gewebes untersucht. Dabei wurde zur Analyse der Zellgröße eine histologische WGA-Färbung durchgeführt. In der optischen Betrachtung der Ergebnisse in Abbildung 15A ist bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den LNA-92a-behandelten Tieren festzustellen. Die Quantifizierung der Kardiomyozytenfläche in beiden Gruppen zeigte, dass die unbehandelten Kontrolltiere mit einer mittleren Kardiomyozytenfläche von $269 \pm 10 \mu\text{m}^2$ deutlich größere, hypertrophierte Zellen aufwiesen als die LNA-92a-behandelten Versuchstiere mit $187 \pm 4 \mu\text{m}^2$ (Abbildung 15B).

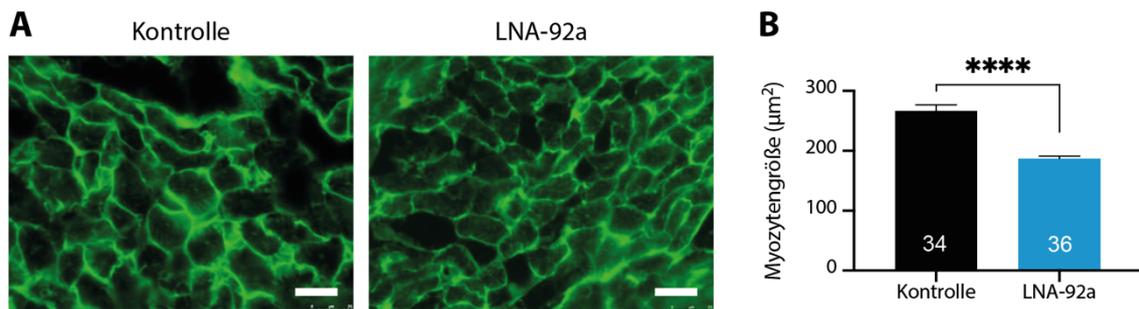


Abbildung 15 | LNA-92a verhindert Myozytenhypertrophie in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie

Darstellung von Kardiomyozyten mittels WGA Färbung (s.o.) nach Herzexplantation an Tag 56; (A) Fluoreszenzfärbung (WGA) und optische Darstellung der Kardiomyozyten. Balken = 25 µm. (B) Die Quantifizierung der Kardiomyozytenfläche zeigt deutlich mehr vergrößerte Zellen in der Kontrollgruppe (n=5 Tiere) als bei LNA-92a-behandelten Versuchstieren (n=4 Tiere). Mittelwert ± SEM. Zahlen in den Balken stellen die Anzahl der quantifizierten Zellen dar.

5 DISKUSSION

5.1 Kardioprotektives Potential der regionalen miR-92a Inhibition

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen die Auswirkungen der regionalen retrograden LNA-92a Therapie in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie, nach Induktion eines hibernierenden Myokards. Dabei konnte an Tag 56 nach Einsatz eines Reduktionsstents sowie 28 Tage nach Applikation der LNA-92a ein positiver Einfluss auf die Kapillarisierung und Remodeling-Prozesse des Myokards sowie eine daraus resultierende Verbesserung der hämodynamischen Herzfunktion (EF) beobachtet werden.

In einigen wichtigen Vorarbeiten der letzten Jahre wurden bereits mehrfach die pathophysiologischen Auswirkungen der miR-92a Inhibition beschrieben (Bonauer et al., 2009; Daniel et al., 2014; Fiedler & Thum, 2016; Hinkel, Penzkofer, et al., 2013). Auf diese Weise rückte die miR-92a immer mehr in den Fokus als Agens zur Verstärkung kardioprotektiver Mechanismen, bisher allerdings nur in Modellen eines akuten Myokardinfarktes.

Darin zeigte die Arbeitsgruppe von Prof. Dimmeler und Kollegen, dass eine miR-92a Inhibition nicht nur die Gefäßneubildung nach peripherer sowie kardialer Ischämie in einem Mausmodell induziert, sondern auch zu einer Verbesserung der regionalen und globalen Herzfunktion führt (Bonauer et al., 2009). Zusätzlich dazu konnten mithilfe vorangegangener Experimente unserer Arbeitsgruppe einige für diese Arbeit wichtige Aussagen bezüglich der Wirksamkeit und Dosierung der LNA-92a getroffen werden. Dabei wurde das therapeutische Potenzial der LNA-92a in einem Modell des akuten Ischämie-/Reperfusionsschaden untersucht. Die LNA-92a Applikation erfolgte nach 60 min LAD Okklusion mit darauffolgender 72 h Reperfusion. Die LNA-92a wurde entweder systemisch oder regional (antegrad oder retrograd) verabreicht (Dosis: 5 mg/kg Herzgewicht), eine weitere Gruppe wurde mit der 5-fachen Dosis behandelt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die systemische als auch die regionale Applikation die Ziel microRNA im Herzen reduzieren konnten. Betrachtet man jedoch die Ausdehnung der Infarktgröße, ergab nur die regionale Infusion eine verminderte Ausprägung eines Infarktareals. Der Einsatz einer 5-fach höheren LNA-Dosis erbrachte keinen weiteren Vorteil. Des Weiteren zeigten ausgedehntere Untersuchungen, dass die LNA-92a die postischämische Inflammation und Apoptose reduziert. Dabei konnte in einem *in vivo* Modell eine gesteigerten Kapillarzahl in dem ischämischen Areal beschrieben werden. Außerdem führte die miR-92a Inhibition zu einer verbesserten globalen und regionalen Herzfunktion nach akutem Myokardinfarkt und darauffolgender Reperfusion (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

Zusätzlich dazu ergab die Inhibition von miR-92a (-3p) mittels antimiR-92a Applikation eine verstärkte Autophagie von Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt und zeigt auf diese Weise einen Einfluss auf die Regulierung von metabolischen Prozessen der Kardiomyozyten. Der hier beschriebene Verdauungsprozess der Organellen von Endothelzellen ist ein wichtiger Prozess zur Bereitstellung von lebensnotwendigen Substraten während und nach einer Ischämie (Rogg et al., 2018).

Diese Ergebnisse zusammengenommen ergeben bereits wichtige Hinweise bezüglich der kardioprotektiven Rolle der Suppression der miR-92a beim Herzinfarkt. Jedoch bleibt die Bedeutung für Langzeitfolgen im Rahmen einer chronischen Ischämie, als wichtiger Indikator einer progredienten Entwicklung einer Herzinsuffizienz, bis dato unklar.

5.1.1 Einfluss der Inhibition der miR-92a auf die regionale und globale myokardiale Funktion in einem Modell der chronischen myokardialen Ischämie

In der Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit führten die Auswirkungen der Inhibition der miRNA-92a mittels LNA-92a zu einer kardioprotektiven Auswirkung am Herzen in einem Modell der chronisch myokardialen Ischämie. Dies äußerte sich durch eine Verbesserung der Hämodynamik sowie der Funktion des Herzens.

Nach retrograder Applikation der LNA-92a konnte eine regionale und globale Funktionssteigerung beobachtet werden (Abbildung 10 und Abbildung 11). Die Messung der regionalen Myokardfunktion erfolgte anhand der subendothelialen Segmentverkürzung, welche als Maß der regionalen Kontraktilität genommen werden kann. Unter Ruhefrequenz zeigte sich eine leichte und unter Funktionsreservebedingungen eine deutlich signifikante Verbesserung der Kontraktilität nach Therapie mit LNA-92a. Zusätzlich dazu ergaben die hämodynamischen Messungen nach Applikation der LNA-92a an Tag 56 eine signifikante Steigerung der globalen Herzfunktion, die durch einen Abfall des LVEDP sowie eine gesteigerte Ejektionsfraktion in der Therapiegruppe gezeigt werden konnte.

Beides, der LVEDP als auch die EF, stellen wichtige Parameter zur Einstufung der Herzinsuffizienz dar. Dabei korreliert die Ejektionsfraktion mit der linksventrikulären Pumpfunktion des Herzens, wodurch frühe Anzeichen einer kontraktilen Dysfunktion diagnostiziert werden können. Mit dieser Erkenntnis ist es vorstellbar, dass der Einsatz von LNA-92a bei chronischer Ischämie, durch die Verbesserung der Herzfunktion eine Progredienz der Herzinsuffizienz stoppt bzw. eine Verbesserung herbeiführt. Zudem zeigt sich die Ermittlung der EF als vorteilhafter und reproduzierbarer Parameter, der auch durch Echokardiographie ermittelt werden kann. Diese Methode ist eine einfach anzuwendende und gut zugängliche Methode in der Herzdiagnostik und erlaubt so schnelle Aussagen und dient als wichtige Methode zur regelmäßigen Verlaufskontrolle (Dickstein et al., 2008).

Die hier zum ersten Mal dargestellte Verbesserung der Herzfunktion durch die Applikation von LNA-92a in einem Modell der chronischen Ischämie lässt sich mit beispielsweise zuvor beschriebenen Resultaten der Arbeitsgruppe von Prof. Dimmeler und Kollegen vergleichen, wobei hierbei stets akute Ischämie Modelle betrachtet wurden. Hier führte die miR-92a Inhibition nicht nur zur Verbesserung der Gefäßneubildung nach peripherer sowie kardialer Ischämie in einem Mausmodell, sondern auch zu einer Verbesserung der regionalen und globalen Herzfunktion (Bonauer et al., 2009).

Eine Verbesserung der hier beschriebenen Funktionsparameter nach LNA-92a Applikation in unserem Modell ließe sich zum einen auf die bereits zuvor beschriebene Reversibilität der Funktion nach Hibernation zurückführen. Hierbei ist es wichtig zu betonen, dass es im Rahmen einer chronischen Ischämie, wie sie das hibernierende Myokard darstellt, zu Funktionseinschränkungen sowie morphologischen Veränderungen kommt, die definitionsgemäß eine Reversibilität nach Auflösung bzw. Verbesserung der chronischen Ischämie aufzeigen (siehe Einleitung)(Borgers et al., 1993; Chen et al., 1996; Heusch et al., 2005; Rahimtoola, 1989). Da in dieser Arbeit eine verbesserte Ausbildung von Kollateralen sowie eine gesteigerte Kapillarisation durch die LNA-92a Applikation erreicht werden konnte, ist die daraus resultierende Verbesserung der Versorgung des chronisch ischämischen Areals vermutlich verantwortlich für eine Steigerung der regionalen sowie globalen Herzfunktion. Es fehlen jedoch weitere molekulare Untersuchungen, die eine spezifischere Aussage auf zellulärer Ebene bezüglich der verbesserten Funktion erlauben.

Zusammengefasst könnten die regionale und globale Funktionssteigerung nach LNA-92a Behandlung eine potentielle neue Therapiemöglichkeit bieten, um die Entwicklung einer chronisch andauernden Beeinträchtigung des Herzens in einem hibernierenden Myokard und die damit verbundenen Langzeitfolgen aufzuhalten. LNA-92a kann daher eine potentiell wichtige klinische Relevanz zugesprochen werden kann.

5.1.2 Auswirkungen der LNA-92a auf Angiogenese

Die metabolische Aktivität des Herzens bedarf einer adäquaten Versorgung mit Sauerstoff, welche nur mittels ausreichenden Blutflusses erfolgen kann. Dabei spielt die Angiogenese, definiert als das Wachstum neuer Kapillaren, eine wichtige Rolle (Boon & Dimmeler, 2015; Cooley & Bikfalvi, 2018; Small & Olson, 2011). Wie bereits einleitend erläutert ist das gesamte *miR-17~92a* Clusters als wichtiger Faktor für Wachstumsprozesse bekannt (Bonauer & Dimmeler, 2009; Fiedler & Thum, 2016; Gu, Liu & Zhou, 2017; Shan et al., 2009; Ventura et al., 2008). Besonders die Auswirkungen auf das Endothelium spielen hierbei eine wichtige Rolle in der Entstehung des vaskulären Wachstums. Unter den Mitgliedern des Clusters sind bisher neben der miR-92a auch zusätzlich die miR-17/20 als wichtige Beteiligte am Wachstum von

Endothelzellen *in vitro* als auch *in vivo* beschrieben worden (Doebele et al., 2010). Des Weiteren wird auch die Proliferation von kardialen Endothelzellen von einem hohen Level an miRs des Clusters stimuliert. Dabei kommt es durch den Einfluss des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zur Aktivierung der *mitogen activated protein kinase* (MAPK) sowie zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Elk-1. Ein Verlust des Clusters hingegen führt zu einer defekten Gefäßbildung (Fiedler & Thum, 2016).

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, erfolgte in der vorliegenden Forschungsarbeit die Quantifizierung der neuausgebildeten Kapillaren sowie deren Stützzellen (Perizyten) mittels immunhistochemischer Färbung. Darin zeigte sich neben einer signifikant erhöhten Endotheldichte ebenso eine erhöhte Perizyten-dichte in der mit LNA-92a behandelten Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 12).

Neben Ausbildung und Wachstum der Kapillaren, ist deren Stützung mittels Perizyten und vaskulären Muskelzellen (engl.: vascular smooth muscle cells, VSMCs) wichtig für die Stabilität und Kontrolle der Perfusion (Carmeliet & Jain, 2011; Hinkel, Trenkwald & Kupatt, 2011).

Zusätzlich zur Stabilisierung durch Perizyten, kontrollieren diese ebenso das Wachstum von Endothelzellen sowie Kapillaren (Ribatti, Nico & Crivellato, 2011). Durch verschiedene Moleküle wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor beta* (TGF- β), VEGF, Angiopoetin sowie verschiedene Signalwege, die Notch und Ephrine enthalten wird die Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten beeinflusst und so die Gefäßmaturierung gefördert (Ribatti et al., 2011; Von Tell, Armulik & Betsholtz, 2006).

Die genauen Auswirkungen von LNA-92a auf das Gefäßwachstum und die Ausbildung der Stützzellen ist bis dato nicht gänzlich geklärt.

Zuvor durchgeführte Studien zeigten die Beeinflussung von Proliferation und Migration von Perizyten durch VEGF (Darland et al., 2003; Ribatti et al., 2011). Dabei zeigte eine Arbeit von Darland et. al, dass die Produktion von VEGF durch Perizyten, gefördert von TGF- β , zum einen als Stabilisator die Zellen stützt und zum anderen das Überleben von Endothelzellen fördert (Darland et al., 2003). Die Forschungsgruppe von Iaconetti et. al zeigte ergänzend dazu keinen direkten Nachweis für Perizyten, sie untersuchte jedoch den Einfluss von miR92-a auf Endothelzellen und betrachtete dabei ebenso die Auswirkungen auf VEGF. Dabei ergab die Überexpression von miR-92a in Endothelzellen eine Inhibition der VEGF-induzierten Proliferation der Zellen (Iaconetti et al., 2012). Detailliertere molekulare Experimente könnten den Einfluss von miR92a auf das Vorkommen/ Wachstum von Perizyten besser beleuchten.

Betrachtet man weitere Untersuchungen der miR-92a Expression, ergaben vorangegangene Studien ein vorwiegendes Vorkommen in vaskulären Zellen mit nur geringer Ausprägung in

SMCs. Hieraus ergibt sich ein weiterer Punkt der darauf hinweist, dass miR-92a eine wichtige Rolle in der endothelialen Zellfunktion spielt (Bonauer et al., 2009; Iaconetti et al., 2012).

So führte eine Überexpression der miR-92a in humanen Endothelzellen, in einem dreidimensionalen Zellkulturmodell der Angiogenese, zum einen zur Inhibition der Aussprossung und zum anderen zu einer reduzierten Ausbildung vaskulärer Netzwerke. Zu erklären ist dies mit einer Herabsetzung der Endothelzellmigration sowie einer gehemmten Adhäsion an Fibronectin (Bonauer et al., 2009). Eine Charakterisierung der *in vivo* Auswirkungen einer miR-92a Hemmung gelang vorwiegend mittels Anwendung von Antagomirs. Darin zeigte die Inhibition der miR-92a eine verbesserte Gefäßneubildung und Perfusion nach Ischämie im Hinterlauf-Ischämie-Modell und im Herzinfarkt-Modell in der Maus (Bonauer et al., 2009). Eine weitere Arbeit in einem Ratten-Ischämie-Modell zeigte eine durch Inhibition der miR-92 induzierte, signifikant erhöhte Re-Endothelialisierung sowie reduzierte neointimale Hyperplasie in Carotis-Arterien nach Ballonischämie oder arteriellem *Stenting* (Iaconetti et al., 2012).

Auch auf molekularer Ebene, auf der Suche nach verschiedenen Zielkomponenten, wodurch die hier betrachtete miR-92 ihre Wirkung entfaltet, konnten in einer weiteren Forschungsarbeit mit dem *Target-Scan* mehrere Zielstrukturen festgestellt werden. Dazu gehören Integrine, insbesondere das Integrin alpha-5 (ITGA5) welches Endothelzellen vor Apoptose schützt und einen wichtiger Faktor in der Gefäßentwicklung darstellt (Bonauer et al., 2009; Urbich et al., 2002).

Ferner werden durch die miR-92a Gene supprimiert, die für vaskuloprotektive Proteine wie Krüppel-Like Factor 2 (KLF2) und SIRT1 (*NAD-dependent protein deacetylase* Sirtuin-1) codieren (Bonauer et al., 2009; Gracia-Sancho, Villarreal, Zhang & García-Cardena, 2010; Wu et al., 2011). Beispielsweise unterdrückt die Hochregulation der miR-92a Expression in humanen Umbilikalvenen (engl.: *human umbilical vein ECs*, HUVECs) die Expression einiger durch KLF2 regulierte Gene wie die *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) und Thrombomodulin (TM). Beide stellen wichtige Modulatoren der Gefäßneubildung dar (Bonauer et al., 2009).

Die Aktivierung vaskuloprotektiver Gene nach miR-92a Inhibition unterstreicht die wichtige Funktion der miR-92a in Wachstumsprozessen, insbesondere der Angiogenese.

5.1.3 Auswirkungen der LNA-92a auf die Arteriogenese

Um die bereits im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Angiogenese von der Arteriogenese zu unterscheiden, ist es wichtig die verschiedenen Mechanismen zu erläutern. Die Angiogenese beschreibt das Wachstum bzw. die Aussprossung von Kapillaren aus

vorbestehenden Gefäßästen. Auslöser ist beispielsweise eine Hypoxie im Rahmen von chronischer Ischämie, wodurch die Entstehung eines neuen Kapillarnetzwerkes angetrieben wird (Heil, Eitenmüller, Schmitz-Rixen & Schaper, 2006).

Die Arteriogenese hingegen, kann als Wachstum von Arterien aus einem bereits bestehenden Netz kleiner arterieller Verbindungen (arterio-arteriolaren Anastomosen) beschrieben werden, wodurch erneut funktionsfähige Gefäße (Kollateralen) entstehen. Insbesondere mechanische Scherkräfte, die auf Gefäße wirken, sind bekannt dafür diesen Mechanismus zu induzieren (Hoefler, Den Adel & Daemen, 2013; Hollander, Horrevoets & Royen, 2014).

Die Ausbildung von Kollateralen zeigte sich nach beschriebener chronischer Totalokklusion der RCx (durch den Einsatz eines Reduktionsstents) im hibernierenden Myokard deutlich eingeschränkt. In der vorliegenden Forschungsarbeit führte die lokale, retrograde Applikation von LNA-92a 28 Tage nach Totalokklusion der RCx zu einer vermehrten Kollateralausbildung (Messungen am Tag 56 nach Stenteinsatz). Nach Rentrop (*Rentrop score*) erreichten die LNA-92a therapierten Versuchstiere signifikant höhere Scores im Vergleich zu den unbehandelten Schweinen (Abbildung 13).

Vorangegangene Forschungsarbeiten in einem Hinterlauf-Modell von Kaninchen und Maus zeigten, dass der Verschluss der *Arteria femoralis* zu einer solchen Kollateralausbildung führt. Dabei beschleunigt die Inhibition von miR-92a die Angiogenese und fördert die Durchblutung des betroffenen Gewebes. Außerdem wurde mit Studien im Zebrafrisch gezeigt, dass es nach einer Überexpression der miR-92a vor allem zu Defekten in der Ausbildung von Gefäßen kommt (Bonauer et al., 2009).

Durch die Schubspannung verursacht durch den Druckgradient im Rahmen einer Ischämie, kommt es zur Aktivierung des Endothels, wodurch weitere Substanzen wie das Monozyten-Chemotaktische-Protein-1 (MCP-1) exprimiert werden. Durch die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche des Endothels kommt es des Weiteren zur Rekrutierung inflammatorisch-wirksamer Zellen (z.B. Monozyten). Eine fortschreitende Differenzierung der Zellen und die weitere Stimulation von wachstumsfördernden Substanzen führt zum Prozess der beschriebenen Arteriogenese (Bergmann et al., 2006; Bonauer et al., 2009; Schaper, König, Franz & Schaper, 1976; Scholz et al., 2000, 2002). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den positiven Einfluss auf die Arteriogenese durch die Inhibition der miR-92a darstellen. Eine ausführliche Erforschung aller beteiligten Mechanismen zur Entstehung neuer Kapillaren nach Anwendung von LNA-92a bedarf jedoch weiterer Experimente.

In der Zusammenschau der bisherigen *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse, kann geschlussfolgert werden, dass LNA-92a sowohl Angiogenese als auch Arteriogenese in einem Modell der

chronischen myokardialen Ischämie beträchtlich verbessern konnte. Dies könnte von besonderer Bedeutung sein, da bisher in verschiedenen Patientenstudien gezeigt werden konnte, dass ein adäquat ausgeprägtes Kollateralsystem, nach Entstehung eines Koronarverschlusses, eine Reduktion der Mortalität um 25-36 % bewirkt (Hollander et al., 2014; Meier et al., 2007, 2012).

5.1.4 Beeinflussung der pathologischen Kardiomyozytenhypertrophie durch microRNAs

Die Myozytenhypertrophie des Herzens wird durch unterschiedliche Mechanismen begünstigt. Sie kann physiologischer Natur sein oder auch pathologisch auftreten in Kombination mit kardialer Dysfunktion. Dabei kommt es durch die Mehrarbeit, die das Herz leisten muss, zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten (Hill & Olson, 2008).

Eine physiologische Hypertrophie entsteht unter verschiedenen Bedingungen, insbesondere während des Wachstums direkt postnatal, aber auch durch extremes Körpertraining bei Sportlern, sowie vorübergehend in der Schwangerschaft. Dabei wachsen die Zellen in Länge und Breite, eine reversible Zunahme von 10–20 % der Ausgangsmaße des Herzens ist in diesem physiologischen Prozess zu verzeichnen. Bei der Myozytenhypertrophie handelt es sich um einen langsamen Prozess, bei dem ebenso eine physiologische Anpassung des Herzens insbesondere des Kapillarsystem erfolgt. Auf diese Weise kann eine stets ausreichende Versorgung des Herzens mit Sauerstoff gewährleistet werden. Es werden weder die kardiale Funktion, noch auf zellulärer Ebene der fibrotische Umbau oder die Apoptose von Kardiomyozyten beeinflusst (Hill & Olson, 2008; Nakamura & Sadoshima, 2018).

Faktoren wie eine hämodynamische Belastung des Herzens und die daraus resultierende kardiale Dysfunktion, führen zu metabolischen, strukturellen und funktionalen Veränderungen. Hieraus resultieren verschiedene Remodeling-Prozesse, die wiederum zu einer pathologischen Hypertrophie führen können (Dorn, Robbins & Sugden, 2003; Frey & Olson, 2003; Hill & Olson, 2008; Nakamura & Sadoshima, 2018; van Rooij et al., 2006; Shimizu & Minamino, 2016).

Beim Remodeling kommt es zu einer Veränderung der metabolischen Abläufe. Die Aktivierung verschiedener Signalwege und entsprechender Zielgene führt zu einer Zunahme der Proteinbiosynthese sowie einer Akkumulation von Sarkomeren. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Glykolyse, um zunächst die kardiale Funktion und Kontraktilität aufrecht zu erhalten. Diese wird jedoch im weiteren Verlauf beeinträchtigt, wodurch die systolische sowie diastolische Funktion des Herzes eingeschränkt wird. Anatomisch kommt es initial zu einer Reduktion des ventrikulären Volumens mit Zunahme der Wanddicke, was als „Konzentrische Hypertrophie“ bezeichnet wird. Zusätzlich dazu führt ein paralleler Prozess von progredienten fibrotischen Umbau mit Verlust von Kardiomyozyten zur Ausbildung einer

Herzinsuffizienz, welche als langfristige Folgeerkrankung betrachtet wird. Abschließend kommt es im weiteren Ablauf zu einer vermehrten Ventrikeldilatation durch Ausdünnung der Ventrikelwand und eine Verlängerung der betroffenen Kardiomyozyten, wodurch die kardiale Kontraktilität beeinträchtigt wird. Hierbei spricht man von der „Exzentrischen Hypertrophie“ (Nakamura & Sadoshima, 2018; Schiattarella & Hill, 2015).

Langzeitstudien wie die Framingham Studie zeigten, dass vor allem die linksventrikuläre Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz und zu Herzrhythmusstörungen führen kann, was langfristig mit einer verkürzten Lebenszeit einhergeht (Levy, Garrison, Savage, Kannel & Castelli, 1990).

Bereits vorangegangene Forschungsarbeiten konnten eine Korrelation von microRNA-Expression in Zusammenhang mit der Ausbildung von Hypertrophie zeigen. Dabei steht deren modulatorische Funktion im Vordergrund. Nach Induktion von Hypertrophie in Mäusen, zum einen durch die Konstriktion der thorakalen Aorta und zum anderen in transgenen Mäusen mit Überexpression von Calcineurin A, konnte eine vermehrte bzw. reduzierte Expression von verschiedenen microRNAs dargestellt werden. Bei diesen Versuchen kam es zu einer Überexpression von miR-21, miR-23, miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a und miR-214, und einer reduzierten Expression von miR-29c, miR-93, miR-150 sowie miR-181 (van Rooij et al., 2006). Eine weitere Studie beschrieb miR-1 als einen wichtigen Zielregulator in der kardialen Hypertrophie. Dabei entfaltet diese microRNA ihre Funktion indem sie mehrere Signalmoleküle ansteuert. Es kommt zur Hemmung der Translation von Molekülen, wie Calmodulin, Mef2a, und Gata4, welche in der Ausbildung der kardialen Hypertrophie eine wichtige Rolle spielen. Basierend auf diesen Daten kann der miR-1 eine protektive Rolle zugesprochen werden (Ikeda et al., 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenso eine positive Auswirkung der Inhibition von miR-92a auf die Ausbildung der kardialen Hypertrophie nach Induktion einer chronischen Ischämie gezeigt werden. Die Quantifizierung der Kardiomyozytenfläche ergab, dass die unbehandelten Kontrolltiere deutlich größere, hypertrophierte Zellen aufwiesen als die LNA-92a-behandelten Versuchstiere (Abbildung 15). Dies stellt einen weiteren Hinweis auf die kardioprotektiven Eigenschaften der miR-92a dar, unter anderem weil Prozesse, die zur Einschränkung der Ventrikelfunktion führen, verhindert werden. Von weiteren Untersuchungen bezüglich der molekularen Zusammenhänge und Auswirkungen der Überexpression oder Gegenregulation wurde in der Literatur bisher nicht berichtet. Bereits beschriebene vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe von Kupatt und Kollegen zeigten eine hemmende Auswirkung der LNA-92a auf die Apoptose von Kardiomyozyten (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013). Auch hier könnte angenommen werden, dass durch das kardioprotektive Potenzial der miR-92a Inhibition

mehrere verschiedene Mechanismen angestoßen werden, die das Herz vor pathologischen Remodeling-Prozessen schützen.

5.1.5 Kardiale Fibrose als Resultat pathologischer Remodeling-Prozesse

Als kardiales Remodeling bezeichnet man verschiedene strukturelle, aber auch funktionelle Anpassungsprozesse, die durch Stress auf das Herz entstehen können. Neben bereits erwähnten Prozessen wie der Hypertrophie von Kardiomyozyten ist auch die Fibrose ein wichtiger Aspekt, der auf zellulärer Ebene beobachtet werden und zu funktionellen Beeinträchtigungen, wie der linksventrikulären Dysfunktion des Herzens führen kann (Rockey, Darwin Bell & Hill, 2015; Schiattarella & Hill, 2015). Akute Ereignisse, beispielsweise ein Myokardinfarkt, aber auch chronische Ereignisse, wie chronisch ischämische Gefäßverschlüsse oder arterielle Hypertonie, üben extremen Stress auf das Myokard und seine zellulären Bestandteile aus. Dieser Stress führt, wie bereits im Vorkapitel beschrieben, zur Induktion von kardialer Hypertrophie und im weiteren Verlauf zur vermehrten Akkumulation und Überexpression von extrazellulärer Matrix (engl.: *extracellular matrix*, ECM), der sogenannten Fibrose (Rockey et al., 2015; Zeisberg et al., 2007).

Es werden zwei verschiedene Formen der Fibrose beschrieben. Zum einen gibt es die reaktive Fibrose, die vornehmlich perivaskulär oder interstitiell Stütz- oder Füllmaterial produziert. Zum anderen dient Fibrose als Ersatz von apoptotischen Gewebe dort, wo Myozyten sterben (Rockey et al., 2015). Fibrose entsteht durch eine Transformation von Zellen, die die Bildung und Sekretion von weiteren Substanzen wie Kollagen I, Kollagen III sowie Fibronectin induzieren (Schiattarella & Hill, 2015; Spinale, 2007). Kommt es also zu einer akuten oder chronischen kardialen Belastung, werden bereits vorhandene myokardständige Fibroblasten durch Zytokine sowie mechanische und neurohumorale Prozesse mobilisiert und im Weiteren zu muskelähnlichen Myofibroblasten transformiert. Diese Myofibroblasten bilden wiederum vermehrt ECM. Zusätzlich dazu zeigen verschiedene Studien alternative zelluläre Strukturen, die durch eine mesenchymale Transformation zu Myofibroblasten umstrukturiert werden können. Dabei handelt es sich neben Endothel- sowie Epithelzellen auch um vaskuläre Perizyten und glatte Muskelzellen (Davis & Molkentin, 2014; Krenning et al., 2010; Zeisberg et al., 2007; Zeisberg & Kalluri, 2010).

Im physiologischen Sinne fügt sich die gebildete extrazelluläre Matrix mit den Kardiomyozyten und dem vaskulären System zusammen und unterstützt als Einheit das gesamte kardiale System. Unter Normalbedingungen ist besonders eine Balance zwischen Bildung und Abbau von ECM, je nach aktuellem Bedarf, sehr wichtig (Creemers & Van Rooij, 2016; Weber, Sun, Tyagi & Cleutjens, 1994). Zudem beinhaltet die ECM weitere wichtige Strukturen wie Proteine und Wachstumsfaktoren, die für die Proliferation, Differenzierung sowie Migration aller Zellen

verantwortlich sind (Creemers & Van Rooij, 2016). Diverse, zuvor genannte, auf das Myokard wirkende Stressfaktoren (Myokardinfarkt, arterieller Hypertonus, chronische Ischämie, unterschiedliche Kardiomyopathien) führen zu einer Störung der Balance, wodurch eine exzessive Vermehrung von ECM begünstigt wird. Dies wiederum führt zu einer Ausprägung von kardialer Fibrose, was zu einer Versteifung der Ventrikel führt. Im Weiteren Verlauf kommt es ebenso zu einer Herzinsuffizienz mit möglichen Arrhythmien und daraus resultierenden plötzlichen Herztod (Creemers & Van Rooij, 2016; Weber et al., 1994).

Die genauen molekularen Abläufe, welche die Bildung von Myofibroblasten initiieren, unterliegen einem komplexen Konstrukt von Signalwegen und Wachstumsfaktoren sowie Chemokinen und Zytokinen wie Angiotensin II (AngII), Connective tissue growth factor (CTGF), Endothelin-1 sowie Transforming growth factor β (TGF β), wobei TGF β eine zentrale Rolle in der Transformation von Myofibroblasten und der Ausbildung von ECM spielt (Creemers & Van Rooij, 2016; Leask, 2010).

5.1.5.1 Reduktion der Ausbildung von kardialer Fibrose durch den Einfluss von microRNAs

Die Hemmung der übermäßigen Fibroseausbildung ist eine wichtige Komponente in der Kardioprotektion und Erhaltung der Herzfunktion. Der Einfluss von miRs auf die kardiale Fibrose ist bis dato nicht ausreichend untersucht. In aktuellen Arbeiten steht vor allem die microRNA-21 im Fokus. Thum et al. zeigten in ihrer Forschungsarbeit erhöhte miR-21 Level in Fibroblasten in durch Herzinsuffizienz beeinträchtigtem Myokard. MiR-21 verstärkt den ERK-MAP Kinase Signalweg in kardialen Fibroblasten. Dabei kommt es durch eine vermehrte Ausbildung von Fibrose zu einer beeinträchtigten kardialen Struktur und Funktion. Die Inhibition der miR-21 mittels Antagomir führte dementsprechend zu einer Reduktion von Fibrose sowie zu einer verbesserten Herzleistung in einem Modell der kardialen Druckbelastung (Thum et al., 2008).

Zudem zeigte eine weitere aktuelle Studie von Hinkel und Kollegen, dass die Inhibition von miR-21 mittels LNA-21 in einem Ischämie-/Reperfusion-Modell im Großtier ebenso zu einer Reduktion von Fibrose sowie zusätzlich zur geringeren Kardiomyozytenhypertrophie führte, wodurch die Herzfunktion deutlich verbessert werden konnte (Hinkel et al., 2020).

In dieser Arbeit wurde hingegen die Auswirkungen der Inhibition der miR-92a in einem Modell des chronisch ischämischen Myokards untersucht. Die molekularen Prozesse des hier angewandten Großtiermodells der Hibernation, mittels Platzierung eines Reduktionsstents in den Koronargefäßen, wurden bereits mehrfach beschrieben. Transmyokardiale Biopsien aus Regionen mit hibernierendem Myokard von Patienten mit KHK, gewonnen durch Bypass-Operationen, zeigten diverse pathologische Veränderungen. Neben einem vergrößerten extrazellulären Raum durch Anreicherung von ECM konnte ein vermehrtes Vorkommen von

Makrophagen, Fibroblasten sowie Kollagen aufgezeigt werden. Ferner konnte eine Verbreiterung der Basalmembran und ein Verlust von Myofibrillen und kontraktilen Proteinen wie Myosin, Titin und Actinin aufgezeigt werden (Elsässer et al., 2002). Die Inhibition des Voranschreitens der beschriebenen pathologischen Prozesse in diesem Modell dient wichtigen Untersuchungen und kann zu einer verbesserten Protektion des Myokards auf molekularer Ebene dienen.

In dieser Arbeit werden nicht nur die Auswirkungen von LNA-92a auf hämodynamische Funktionen des Herzens gezeigt, sondern ebenso die zellulären Veränderungen. Die Inhibition von miR-92a durch Anwendung von LNA-92a nach Induktion einer chronischen Ischämie führt zu einer herabgesetzten Fibroseausbildung (Abbildung 14). Diese kann auch mit einer verbesserten Mikrozirkulation nach LNA-92a zusammenhängen, da der Übergang von physiologischer zu pathologischer Herzfunktion gerade von der Kapillardichte, z.B. in Hypertrophie-Modellen abhängt (Shiojima et al., 2005).

Diese Erkenntnis, zusammen mit der verbesserten hämodynamischen Funktion des Herzens nach Applikation von LNA-92a unterstützen die These, dass die Inhibition der miR-92a durch die verbesserte hämodynamische Perfusion des Herzens einen kardioprotektiven Einfluss auf pathologische Prozesse im Myokard hat.

5.2 Vorteile der Applikation von LNA-92a mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion

Aufgrund einer möglichen Auswirkung der LNA-92a auf andere Organe, als das Zielorgan Herz, ist eine regionale Applikation der systemischen vorzuziehen, trotz der einfacheren Verabreichung über einen peripheren intravenösen Zugang (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013; Hinkel et al., 2011). Jedoch erschwert der verminderte Blutfluss während eines Verschlusses von Koronaren die Ausbreitung des systemisch verabreichten Agens und setzt daher eine Erhöhung der Dosis voraus. Im Gegensatz dazu kann bei einer regionalen Applikation eine genauere Konzentration des Agens im Zielorgan erreicht werden. Eine Ausbreitung im restlichen Körper findet nur geringfügig statt. (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

Vorangegangene Experimente zeigten, dass nicht nur die Menge an zu infundierender Lösung, sondern auch die Verweilzeit der Therapie eine wichtige Rolle bei der Wirkung auf das Myokard haben. (Hinkel & Kupatt, 2017).

Aus vorherigen Arbeiten in einem Großtiermodell des Ischämie-/Reperfusionsschadens konnten Hinkel et al. aufzeigen, dass eine 60-minütige *LAD* Okklusion und 72 h Reperfusion mit einer retrograden Applikation der LNA-92a in einer Konzentration von 5 mg/kg Herzgewicht sowohl systemisch als auch regional die Ziel miRNA im Herzen deutlich reduzieren konnten. Ferner zeigten Untersuchungen der globalen und regionalen Herzfunktion eine deutliche Verbesserung nach retrograder Applikation der LNA-92a (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013). Aufgrund dessen, wurde für diese Arbeit die etablierte Methode mit retrograder Applikation durch einen Katheter zur Selektiven druckregulierten Retroinfusion gewählt.

5.3 Großtiermodelle der chronisch ischämischen Kardiomyopathie

Viele der bekannten Tierexperimente zur Beschreibung der physiologischen sowie pathologischen myokardialen Prozesse begannen traditionsgemäß im Hundemodell (Tennant & Wiggers, 1935). Aufgrund der Kosten und des sozialen Stellenwertes der Tiere sowie der teilweise eingeschränkten Übereinstimmung der pathophysiologischen Prozesse, verlor dieses Tiermodell in der Herzforschung zunehmend an Bedeutung. Trotz einer insgesamt sehr ähnlichen anatomischen Übereinstimmung zeigt das Hundemodell beispielsweise ein komplex ausgeprägtes Kollateralsystem im Vergleich zu humanen Herzen, wodurch einige Fragestellungen, wie z.B. ischämische Infarkte, andere, möglicherweise weniger stark ausgeprägte Auswirkungen aufzeigen können. Eine Translation der Ergebnisse auf den Menschen scheint dann nur noch eingeschränkt möglich (Camacho, Fan, Liu & He, 2016).

Angesichts der dem humanen Herzen äußerst ähnlichen Anatomie und Physiologie des kardiovaskulären Systems, gilt das Schwein als etabliertes Standard-Großtiermodell in der Forschung kardiovaskulärer Erkrankungen (Camacho et al., 2016; Hughes, Post, Simons & Annex, 2003). Wie das Herzgewicht des Menschen, entspricht das relative Herzgewicht beim Schwein ca. 0,3–0,4 % des Körpergewichts, abhängig von der Spezies und Zielgröße des Schweins. Neben der Pathophysiologie und Histologie sind ebenso Hämodynamik sowie Funktionsweise des kardialen Systems miteinander vergleichbar. Ferner verlaufen Infarktmuster und Arrhythmien nach einer Reperfusion mit darauffolgenden Wundheilungsprozessen am Myokard überwiegend homolog (Swindel and Smith, 2000; White et al., 1986). Ergänzend dazu, konnten White und Kollegen in ihren Experimenten am Schwein zeigen, dass die maximale koronare Kapazität der des Menschen stark ähnelt. Dabei ergab die Induktion einer langsamen Okklusion der *RCx* in einem Schweinemodell für chronische Ischämie eine limitierte Ausbildung von Kollateralen zusammen mit einer geringen Ausbildung eines Infarktes. Dies konnte zuvor in vergleichbaren Ausmaß analog zu humanen Beobachtungen gezeigt werden (Milani-Nejad & Janssen, 2014; White et al., 1986).

5.4 Bedeutung von microRNAs für die klinische Anwendung: eine mögliche neue Perspektive

Wie bereits einleitend beschrieben sind miRs vor allem in der Regulation der Genexpression involviert und beeinflussen die posttranskriptionellen Prozesse. Bisher konnten verschiedene Therapiestrategien erarbeitet werden. Ihre Bedeutung für die Forschung wurde in verschiedenen Modellen beschrieben. Einige aktuelle Studien nutzen das Vorkommen von miRs im zirkulierenden Blut als sogenannte *Biomarker* für eine prognostische Einschätzung eines Krankheitsverlaufs verschiedener Krankheitsbilder (Fichtlscherer et al., 2010; Leistner et al., 2016; Mitchell et al., 2008; Skog et al., 2008; Weiland, Gao, Zhou & Mi, 2012). Dabei spielen sie nicht nur eine wichtige Rolle in der bereits erwähnten onkologischen Forschung, sondern konnten auch als wichtige prognostische Marker kardialer Erkrankungen dienen (Fichtlscherer et al., 2010; Ji et al., 2009; Kukreja, Yin & Salloum, 2011). Im Hinblick auf diese Erkenntnis, konnten die Arbeitsgruppen von Tuschl und Schulze in einer weiteren aktuellen Studie zeigen, dass Herzmuskel-spezifische, zirkulierende miRNAs, sogenannte *myomirs*, in Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz, bis zu 140-fach erhöht sind, vergleichbar mit ebenso erhöhten Werten des bekannten und etablierten kardialen Markers Troponin (Akat et al., 2014).

Betrachtet man die verschiedenen Studien, ergeben sich neue Perspektiven für die klinische Anwendung von microRNAs. Diese können als Biomarker zur Diagnose, Prognose und Verlauf einer Erkrankung genutzt werden und bieten als geringinvasive Methode einen neuen Weg für

die Evaluation von Therapiestrategien. Es zeigen sich mehrere Vorteile in der Anwendung dieser als Biomarker. Die Messungen sind zuverlässig und reproduzierbar und zudem kann durch die wenig invasive Abnahme von Blut ein großes Patientenkollektiv gesammelt und verglichen werden. Hinzu kommt das Vorkommen von organspezifischen miRs, das eine adäquate Unterscheidung der Systeme erlaubt und es somit eine Möglichkeit für Organ- sowie Krankheitsspezifische Therapien mit speziellen Angriffspunkten schafft (Fichtlscherer et al., 2010; Guo et al., 2013; Lucas et al., 2018; Weiland et al., 2012).

5.5 Vergleich ausgewählter gentherapeutischer Ansätze

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit eines der größten Probleme des Gesundheitssystems dar. Dabei sind sie als führende Ursache für eine erhöhte Mortalität und Morbidität verantwortlich (Mozaffarian et al., 2015). Des Weiteren können die bisherigen zugelassenen Therapiemöglichkeiten (s.o.) aufgrund der Komplexität der diffusen chronischen Ischämie sowie der beträchtlichen Komorbiditäten nicht jedem Patienten eine adäquate Therapie bieten. Neue Therapieansätze würden somit einen großen Beitrag zur Verbesserung des bisherigen Outcomes leisten. Dabei sollen nicht nur die Symptome sondern die zellulären Prozesse die zu der Pathologie führen behandelt werden (Ylä-Herttuala, Bridges, Katz & Korpisalo, 2017). In den letzten Jahren sind einige vielversprechende Herangehensweisen in Form von Gentherapie untersucht worden. Die Beeinflussung der Angiogenese und des Kollateralwachstums im ischämischen Myokard steht als wichtige Therapiestrategie zur Verbesserung des bisherigen Outcomes vorhandener, zugelassener Therapiemöglichkeiten im Vordergrund.

Neben der Inhibition von microRNAs durch Antimirs ergab der Einsatz von Wachstumsfaktoren, wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor* (FGF) sowie *Thymosin β 4* (T β 4) vielversprechende Resultate (Hinkel et al., 2017, 2011; Kupatt et al., 2010; Lavu, Gundewar & Lefer, 2011; Ylä-Herttuala & Baker, 2017).

Beispielsweise, untersuchte eine aktuelle Phase I/IIa Studie die Auswirkungen von VEGF-D Applikation mittels Adenoviren in Patienten mit Koronarer Herzerkrankung mit einem Jahr Verlaufskontrolle. Hierbei kam es zu einer verbesserten myokardialen Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Hartikainen et al., 2017). Jedoch birgt diese Form der Gentherapie durch Anwendungen von viralen Vektoren auch einige unerwünschte Nebenwirkungen. Bei der invasiven intrakardialen, kathetergesteuerten Applikation kam es zu Erhöhungen der Troponinwerte, als Zeichen des kardialen Stresses. Außerdem bildeten 50% der Patienten adenoviruspezifische Antikörper, was dazu führte, dass eine Fortsetzung der Gabe des

Therapeutikums aufgrund einer erhöhte Immunreaktion nur eine eingeschränkte Wirksamkeit zeigen konnte (Calcedo & Wilson, 2013; Hartikainen et al., 2017).

In den letzten Jahren kam es vermehrt zum Einsatz von viralen Vektoren (z.B. auch Retroviren, Lentiviren und Adeno-assoziierten Viren) als Gentherapie. Diese können je nach gewünschter Anwendung entsprechend modifiziert werden. Allerdings würde man von einem idealen viralen Vektor erwarten, dass er eine besonders hohe Transfektionsrate aufzeigt mit dem Potenzial besonders große Genkonstrukte in einem ausgewählten Organsystem übertragen zu können. Zudem ist eine geringe Toxizität im Körpersystem wichtig. Dabei sollte es idealerweise zu keiner Immunreaktion oder Ausbildung von malignen Erkrankungen kommen. Ein Vektor, der all diese idealen Eigenschaften vereint, gibt es bisher noch (Gaffney, Hynes, Barry & O'Brien, 2007; Markkanen, Rissanen, Kivelä & Ylä-Herttuala, 2005). Allerdings sind kardiotrope AAV (Adeno-assoziierte Viren) sehr effektiv und durch die Optimierung der Applikationswege können die Nebenwirkungen bereits deutlich gesenkt werden (Hinkel & Kupatt, 2017; Hinkel et al., 2011).

Daneben ist ebenso die Dosierungen der applizierten Substanzen von wichtiger Bedeutung. Je nach Konzentration eines Wachstumsfaktors können unterschiedliche Effekte entstehen. So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Dosierungen von VEGF zu einer fehlenden (zu niedrig dosiert) oder abnormen Angiogenese (zu hoch dosiert) führten (Kupatt et al., 2010; Ozawa et al., 2004). Für die Findung der idealen Dosis bedarf es somit stets mehrerer Versuche.

In der aktuellen Arbeit wird durch die Anwendung der LNA-92a eine Alternative zu den bisherigen Gentherapie-Formen aufgezeigt. Hierbei handelt es sich um chemisch modifizierte, einzelsträngige, gegenläufig komplementäre Oligonukleotide, die an eine Ziel- miRNA binden und zu einer Inhibition führen (s.o.). Wie auch hier in dieser Arbeit ausführlich vorgestellt, zeigte sich der Einsatz der LNA als eine wirkungsreiche Strategie zur Suppression von Ziel-miRNAs (Bonauer et al., 2009; Hinkel, Penzkofer, et al., 2013). Eine miRNA Inhibition mithilfe von Antimirs benötigt optimale Bedingungen. Dabei muss neben einer adäquaten Bindungsaffinität, eine verbesserte Resistenz gegenüber Nukleasen und eine suffiziente *in vivo* Applikation ermöglicht werden.

LNAs, verglichen zu anderen Antagomirs (siehe Einleitung, Abschnitt 1.3.4.), zeigen eine höhere Resistenz gegenüber Nukleasen. Außerdem besitzen sie unter den AntimiRs die stärkste Affinität, wodurch niedrigere Konzentrationen bei gleicher Effektivität appliziert werden können. Dies führt dazu, dass auch weniger Nebeneffekte erwartet werden (Petersen & Wengel, 2003; van Rooij & Olson, 2007, 2012). Bisher konnten nur wenige humane Studien eine erfolgreiche Anwendung der LNAs belegen. Dabei konnte in einer ersten klinischen Phase IIa Studie die Anwendung von LNA-modifizierten antisense RNAs gegen miR-122 eine

suffiziente Reduktion der Hepatitis Virus C (HCV) RNA Levels im Serum aufzeigen ohne Evidenz einer viralen Resistenzbildung oder klinisch relevanten Nebenwirkungen im Patienten (Janssen et al., 2013).

Im Hinblick auf die hier angewandte LNA-92a zeigten vorangegangene Untersuchungen im Großtiermodell der Ischämie und Reperfusion der Arbeitsgruppe von Hinkel et al., dass die systemische Applikation von LNA-92a zur Hemmung der miR-92a nicht nur im Herzen, sondern ebenso in anderen Organen wie Leber, Lunge und Niere führte. Eine histopathologische Auswirkung auf die Organfunktion wurde nach 3-7 Tagen nicht festgestellt, jedoch wurde eine langfristige Untersuchung nicht durchgeführt (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013). Zusätzlich zur systemischen Applikation untersuchte die Arbeitsgruppe ebenso eine lokale Verabreichung der LNA. Die mittels Herzkatheter intrakoronar oder auch retrograd, somit lokal applizierte LNA-92a, führte zu einer deutlich gesteigerten Inhibition im ischämischen Myokard im Vergleich zu dem intravenösen, systemischen Einsatz, wodurch eine weitaus niedrigere Dosierung angewandt werden konnte. Zudem zeigte die lokale Gabe der LNA-92a neben einem verminderten Infarktareal im Vergleich zu den Kontrollen, einen stärkeren positiven Effekt auf die Herzfunktion. Trotz des positiven Outcomes durch lokale Applikation, mit einer Reduktion der systemischen Auswirkungen, konnten weiterhin in Leber und Niere eine Inhibition der miR-92a festgestellt werden (Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

Diese Effekte zusammengenommen zeigen eine vielversprechende, perspektivische Therapieoption mit variablen Modalitäten, die es ermöglichen die individuellen Organsysteme anzusteuern, um dort pathologische Prozesse zu supprimieren. Die Einschränkungen im Wirkungsprofil mit Auswirkungen auf weitere Organsysteme jedoch fordern erweiterte Untersuchungen in Langzeitstudien.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen der Suppression der mirRNA-92a konnte bereits mehrfach eine kardioprotektive Rolle dieser Inhibition beschrieben werden, allerdings erfolgten die Untersuchungen bis dato in Modellen eines akuten Infarktes. Hierbei wurde die Rolle der miR-92a Inhibition vornehmlich in einem kurzzeitigen, akuten Zeitraum beschrieben ohne langfristige Folgen zu beachten (Bonauer et al., 2009; Daniel et al., 2014; Doebele et al., 2010; Hinkel, Penzkofer, et al., 2013).

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die Auswirkungen der lokalen, retrograden Applikation von LNA-92a am Herzen in einem Großtiermodell der chronischen myokardialen Ischämie. Nach Einsatz eines Reduktionsstents im *Ramus circumflexus* des Herzens wurden die Auswirkungen einer lokalen Applikation von LNA-92a evaluiert. Messungen der globalen sowie regionalen

Herzfunktion zeigten eine verbesserte globale Herzfunktion mit einer verbesserten regionalen Kontraktilität unter Funktionsreservebedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnte anhand weiterer Untersuchungen der vaskuloprotektive Effekt der miR-92a Suppression durch eine verbesserte Kollateralausbildung und Kapillarisation beschrieben werden. Weitere histopathologische Analysen ergaben eine herabgesetzte Ausbildung von Kardiomyozytenhypertrophie und Fibrose nach Applikation von LNA-92a gegenüber Kontrolltieren (zusammengefasst in Abbildung 16).

Lokale Verabreichung von LNA-92a:

- Verbesserte Angiogenese und Arteriogenese ↑
- Ausbildung von Kollateralen und verbesserte Perfusion ↑
- Verbesserte regionale und globale Herzfunktion ↑
- Herabsetzung von zellulärer Fibrose ↓
- Herabsetzung von Myozytenhypertrophie ↓

Abbildung 16 | Effekte nach lokaler Verabreichung von LNA-92a

Daraus resultierend könnte die miR-92a-Inhibition durch den zuvor beschriebenen kardio- und vaskuloprotektiven Effekt bei gleichzeitiger chronischer Myokardischämie eine neue therapeutische Perspektive für die Erhaltung einer adäquaten Herzfunktion in einem hibernierenden Myokard darstellen.

Betrachtet man die limitierenden Faktoren des ausgewählten Modells, ist hier unter anderem die Auswahl des Modells im Fokus. In diesem Projekt wurden Jungtiere verwendet, mit jungen Organen, die eine deutlich bessere Regenerationsfähigkeit aufzeigen, da keine chronischen Erkrankungen vorlagen. Bei Patienten, die an einer chronischen myokardialen Ischämie leiden, handelt es sich oft um ältere, multimorbide Patienten, die in häufigen Fällen mehrere erkrankte Organsystemen aufweisen. Es spielen mehrere Risikofaktoren eine Rolle bei der Ausbildung einer chronischen Ischämie, die unter anderen unter dem Synonym „metabolisches Syndrom“ zusammengefasst werden. Die heutige Zielgruppe des höheren Alters ist nicht nur durch eine KHK belastet, sondern leidet oftmals beispielsweise unter den Komplikationen eines Diabetes Mellitus. Diese Faktoren werden in dem vorliegenden Projekt nicht inkludiert und limitieren so den Vergleich von Präklinik und Klinik. Zukünftige Studien könnten sich mit neuartigen Modellen befassen, die mittels einer Kombination von Risikofaktoren eine noch bessere Kongruenz und Vergleichbarkeit ermöglichen. Auf diese Weise könnte auf unvorhergesehene Komplikationen neuer Therapieoptionen besser reagiert werden kann.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abasi, M., Kohram, F., Fallah, P., Arashkia, A., Soleimani, M., Zarghami, N. et al. (2017). Differential Maturation of miR-17 ~ 92 Cluster Members in Human Cancer Cell Lines. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(4), 1540–1547.
- Akat, K. M., Moore-McGriff, D., Morozov, P., Brown, M., Gogakos, T., Da Rosa, J. C. et al. (2014). Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(30), 11151–11156. National Academy of Sciences.
- Almeida, M. I., Reis, R. M. & Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1–2), 1–8.
- Arai, A. E., Pantely, G. A., Anselone, C. G., Bristow, J. & Bristow, J. D. (1991). Active downregulation of myocardial energy requirements during prolonged moderate ischemia in swine. *Circulation research*, 69(6), 1458–69.
- van Assche, L. M. R., Kim, H. W. & Kim, R. J. (2013). Cardiac MR for the assessment of myocardial viability. *Methodist DeBakey cardiovascular journal*, 9(3), 163–8. Methodist DeBakey Heart & Vascular Center.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
- Bergmann, C. E., Hoefer, I. E., Meder, B., Roth, H., van Royen, N., Breit, S. M. et al. (2006). Arteriogenesis depends on circulating monocytes and macrophage accumulation and is severely depressed in op/op mice. *Journal of Leukocyte Biology*, 80(1), 59–65. Wiley.
- Boekstegers, P., Diebold, J. & Weiss, C. (1990). Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. *Cardiovascular Research*, 24(6), 456–464.
- Bogaert, J., Gheysens, O., Dymarkowski, S. & Goetschalckx, K. (2014). Comprehensive Evaluation of Hibernating Myocardium. *Journal of Thoracic Imaging*, 29(3), 134–146.
- Bonauer, A., Carmona, G., Iwasaki, M., Mione, M., Koyanagi, M., Fischer, A. et al. (2009). MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice. *Science*, 324(5935), 1710–1713. American Association for the Advancement of Science.
- Bonauer, A. & Dimmeler, S. (2009). The microRNA-17~92 cluster: Still a miRacle? *Cell Cycle*, 8(23), 3866–3873.
- Boon, R. A. & Dimmeler, S. (2015, März 25). MicroRNAs in myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group.
- Boon, R. A., Hergenreider, E. & Dimmeler, S. (2012). Atheroprotective mechanisms of shear stress-regulated microRNAs. *Thrombosis and Haemostasis*, 108(4), 616–620.
- Borgers, M., Thoné, F., Wouters, L., Ausma, J., Shivalkar, B. & Flameng, W. (1993). Structural correlates of regional myocardial dysfunction in patients with critical coronary artery stenosis: Chronic hibernation? *Cardiovascular Pathology*, 2(4), 237–245. Elsevier.
- Braunwald, E. & Kloner, R. A. (1982). The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66(6), 1146–9.
- Braunwald, E. & Rutherford, J. D. (1986). Reversible ischemic left ventricular dysfunction: evidence for the „hibernating myocardium“. *Journal of the American College of Cardiology*, 8(6), 1467–70.
- Brundage, B. H., Massie, B. M. & Botvinick, E. H. (1984). Improved regional ventricular function after successful surgical revascularization. *Journal of the American College of Cardiology*, 3(4), 902–8.
- Calcedo, R. & Wilson, J. M. (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Frontiers in Immunology*, 4, 341. Frontiers Media SA.
- Camacho, P., Fan, H., Liu, Z. & He, J. Q. (2016). Small mammalian animal models of heart disease. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 6(3), 70–80. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

- Camici, P. G. & Rimoldi, O. (1999). Myocardial hibernation vs repetitive stunning in patients. *Cardiology in review*, 7(1), 39–43.
- Carmeliet, P. & Jain, R. K. (2011, Mai 19). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*.
- Caro, G. G. (2009). Discovery of the role of wall shear in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(2), 158–161.
- Carroll, J. D., Hess, O. M., Hirzel, H. O., Turina, M. & Krayenbuehl, H. P. (1985). Left ventricular systolic and diastolic function in coronary artery disease: Effects of revascularization on exercise-induced ischemia. *Circulation*, 72(1), 119–129.
- Chen, C., Chen, L., Fallon, J. T., Ma, L., Li, L., Bow, L. et al. (1996). Functional and Structural Alterations With 24-Hour Myocardial Hibernation and Recovery After Reperfusion. *Circulation*, 94(3), 507–516.
- Chen, C., Li, L., Chen, L. L., Prada, J. V., Chen, M. H., Fallon, J. T. et al. (1995). Incremental doses of dobutamine induce a biphasic response in dysfunctional left ventricular regions subtending coronary stenoses. *Circulation*, 92(4), 756–66.
- Cheng, Y., Ji, R., Yue, J., Yang, J., Liu, X., Chen, H. et al. (2007). MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: Do they play a role in cardiac hypertrophy? *American Journal of Pathology*, 170(6), 1831–1840.
- Chiariello, M., Perrone-Filardi, P. & Ambrosio, G. (1993). Hibernating and stunned myocardium. *Cardioscience*, 4(2), 63–8.
- Cooley, L. S. & Bikfalvi, A. (2018). Angiogenesis. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 267(16), 722–732.
- Corday, E., Lang, T. W., Meerbaum, S., Gold, H., Hirose, S., Rubins, S. et al. (1974). Closed chest model of intracoronary occlusion for study of regional cardiac function. *The American journal of cardiology*, 33(1), 49–59.
- Creemers, E. E. & Van Rooij, E. (2016, Januar 8). Function and Therapeutic Potential of Noncoding RNAs in Cardiac Fibrosis. *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Daniel, J.-M., Penzkofer, D., Teske, R., Dutzmann, J., Koch, A., Bielenberg, W. et al. (2014). Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury. *Cardiovascular research*, 103(4), 564–72. Oxford University Press.
- Darland, D. C., Massingham, L. J., Smith, S. R., Piek, E., Saint-Geniez, M. & D'Amore, P. A. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental Biology*, 264(1), 275–288. Academic Press Inc.
- Davis, J. & Molkenin, J. D. (2014). Myofibroblasts: Trust your heart and let fate decide. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press.
- von Degenfeld, G., Raake, P., Kupatt, C., Lebherz, C., Hinkel, R., Gildehaus, F. J. et al. (2003). Selective Pressure-Regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(6), 1120–1128. Journal of the American College of Cardiology.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevnigani, C., Wentzel, E. et al. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature Genetics*, 38(9), 1060–1065.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J. J. V., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P. A. et al. (2008). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008. *European Heart Journal*, 29(19), 2388–2442. Narnia.
- Doebele, C., Bonauer, A., Fischer, A., Scholz, A., Reiss, Y., Urbich, C. et al. (2010). Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood*, 115(23), 4944–4950.
- Dorn, G. W., Robbins, J. & Sugden, P. H. (2003). Phenotyping hypertrophy: Eschew obfuscation. *Circulation Research*, 92(11), 1171–1175.
- Ebert, M. S., Neilson, J. R. & Sharp, P. A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs

- in mammalian cells. *Nature Methods*, 4(9), 721–726.
- Elässer, A., Schlepper, M., Zimmermann, R., Müller, K.-D., Strasser, R., Klövekorn, W.-P. et al. (1998). The extracellular matrix in hibernating myocardium - a significant factor causing structural defects and cardiac dysfunction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 186(1/2), 147–158. Kluwer Academic Publishers.
- Elsässer, A., Müller, K.-D., Skwara, W., Bode, C., Kübler, W. & Vogt, A. M. (2002). Severe energy deprivation of human hibernating myocardium as possible common pathomechanism of contractile dysfunction, structural degeneration and cell death. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(7), 1189–1198.
- Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. (2006). Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259–269.
- Fichtlscherer, S., De Rosa, S., Fox, H., Schwietz, T., Fischer, A., Liebetrau, C. et al. (2010). Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation Research*, 107(5), 677–684. Lippincott Williams & Wilkins/Hagerstown, MD.
- Fiedler, J. & Thum, T. (2016). New Insights Into miR-17-92 Cluster Regulation and Angiogenesis. *Circulation Research*, 118(1), 9–11.
- Frey, N. & Olson, E. N. (2003). Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annual Review of Physiology*, 65(1), 45–79. Annual Reviews.
- Gaffney, M. M., Hynes, S. O., Barry, F. & O'Brien, T. (2007, September). Cardiovascular gene therapy: Current status and therapeutic potential. *British Journal of Pharmacology*. Wiley-Blackwell.
- Gallagher, K. P., Osakada, G., Matsuzaki, M., Miller, M., Kemper, W. S. & Ross, J. (1985). Nonuniformity of inner and outer systolic wall thickening in conscious dogs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 249(2), H241–H248.
- Ginks, W. R., Sybers, H. D., Maroko, P. R., Covell, J. W., Sobel, B. E. & Ross, J. (1972). Coronary Artery Reperfusion. *Journal of Clinical Investigation*, 51(10), 2717–2723.
- Gracia-Sancho, J., Villarreal, G., Zhang, Y. & García-Cardeña, G. (2010). Activation of SIRT1 by resveratrol induces KLF2 expression conferring an endothelial vasoprotective phenotype. *Cardiovascular Research*, 85(3), 514–519.
- Gregory, R. I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. et al. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), 235–40.
- Gu, H., Liu, Z. & Zhou, L. (2017). Roles of MIR-17-92 Cluster in Cardiovascular Development and Common Diseases. *BioMed Research International*, 2017, 1–6. Hindawi Limited.
- Guo, F., Tian, J., Lin, Y., Jin, Y., Wang, L. & Cui, M. (2013). Serum microRNA-92 expression in patients with ovarian epithelial carcinoma. *Journal of International Medical Research*, 41(5), 1456–1461.
- Hajin, L., Fallavollita, J. A., Hard, R., Kerr, C. W. & Canty, J. M. (1999). Profound apoptosis-mediated regional myocyte loss and compensatory hypertrophy in pigs with hibernating myocardium. *Circulation*, 100(23), 2380–2386.
- Hartikainen, J., Hassinen, I., Hedman, A., Kivelä, A., Saraste, A., Knuuti, J. et al. (2017). Adenoviral intramyocardial VEGF-DDNDC gene transfer increases myocardial perfusion reserve in refractory angina patients: A phase I/IIa study with 1-year follow-up. *European Heart Journal*, 38(33), 2547–2555. Oxford University Press.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S. et al. (2005). A polycistronic MicroRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Research*, 65(21), 9628–9632. American Association for Cancer Research.
- He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S. et al. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828–833.
- Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T. & Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: Similarities and differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.
- Heimisch, W. (1989). Die Sonomikrometrie in der Herz- und Kreislaufforschung: physikalisch-technische Grundlagen und Ergebnisse zur Myokard-Mechanik und Ventrikel.

- Herold, G. (2007). *Innere Medizin. Aromatherapie* (2018. Auflage). Herold, Gerd.
- Heusch, G. & Gersh, B. J. (2016). The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *European Heart Journal*, 38(11), ehw224.
- Heusch, G., Rose, J., Skyschally, A., Post, H. & Schulz, R. (1996). Calcium responsiveness in regional myocardial short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. Inotropic responses to postextrasystolic potentiation and intracoronary calcium. *Circulation*, 93(8), 1556–66.
- Heusch, G. & Schulz, R. (1996). Hibernating Myocardium: A Review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28(12), 2359–2372.
- Heusch, G., Schulz, R. & Rahimtoola, S. H. (2005). Myocardial hibernation: a delicate balance. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 288(3), H984–H999.
- Heyndrickx, G. R., Baig, H., Nellens, P., Leusen, I., Fishbein, M. C. & Vatner, S. F. (1978). Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 234(6), H653–H659.
- Hill, J. A. & Olson, E. N. (2008). Cardiac plasticity. *New England Journal of Medicine*, 358(13), 1370. Massachusetts Medical Society.
- Hinkel, R., Boekstegers, P. & Kupatt, C. (2012). Adjuvant early and late cardioprotective therapy: access to the heart. *Cardiovascular Research*, 94(2), 226–236.
- Hinkel, R., Howe, A., Renner, S., Ng, J., Lee, S., Klett, K. et al. (2017). Diabetes Mellitus-Induced Microvascular Destabilization in the Myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(2), 131–143. Elsevier.
- Hinkel, R. & Kupatt, C. (2017). Selective Pressure-Regulated Retroinfusion for Gene Therapy Application in Ischemic Heart Disease. In Ishikawa K (Hrsg.), *Cardiac Gene Therapy. Methods in Molecular Biology* (Band 1521, S. 249–260). Humana Press, New York, NY.
- Hinkel, R., Lebherz, C., Fydanaki, M., Wuchrer, A., El-Aouni, C., Thormann, M. et al. (2013). Angiogenetic potential of Ad2/Hif-1 α /VP16 after regional application in a preclinical pig model of chronic ischemia. *Current vascular pharmacology*, 11(1), 29–37.
- Hinkel, R., Ng, J. K. M. & Kupatt, C. (2014). Targeting microRNAs for cardiovascular therapeutics in coronary artery disease. *Current Opinion in Cardiology*, 29(6), 586–594.
- Hinkel, R., Penzkofer, D., Zühlke, S., Fischer, A., Husada, W., Xu, Q.-F. et al. (2013). Inhibition of MicroRNA-92a Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in a Large-Animal Model. *Circulation*, 128(10), 1066–1075.
- Hinkel, R., Ramanujam, D., Kaczmarek, V., Howe, A., Klett, K., Beck, C. et al. (2020). AntimiR-21 Prevents Myocardial Dysfunction in a Pig Model of Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(15), 1788–1800. Elsevier USA.
- Hinkel, R., Trenkwalder, T. & Kupatt, C. (2011). Gene therapy for ischemic heart disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11(6), 723–737.
- Hofer, I. E., Den Adel, B. & Daemen, M. J. A. P. (2013, Juli 15). Biomechanical factors as triggers of vascular growth. *Cardiovascular Research*.
- Hollander, M., Horrevoets, A. & Royen, N. (2014). Cellular and Pharmacological Targets to Induce Coronary Arteriogenesis. *Current Cardiology Reviews*, 10(1), 29–37. Bentham Science Publishers Ltd.
- Holliday, C. J., Ankeny, R. F., Jo, H. & Nerem, R. M. (2011). Discovery of shear- and side-specific mRNAs and miRNAs in human aortic valvular endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 301(3), H856–H867.
- Homans, D. C., Sublett, E., Lindstrom, P., Nesbitt, T. & Bache, R. J. (1988). Subendocardial and subepicardial wall thickening during ischemia in exercising dogs. *Circulation*, 78(5 Pt 1), 1267–76.
- Hood, W. B., Joison, J., Kumar, R., Katayama, I., Neiman, R. S. & Norman, J. C. (1970). Experimental myocardial infarction. I. Production of left ventricular failure by gradual coronary occlusion in intact conscious dogs. *Cardiovascular research*, 4(1), 73–83.

- Hughes, G. C., Post, M. J., Simons, M. & Annex, B. H. (2003, Mai 1). Translational physiology: Porcine models of human coronary artery disease: Implications for preclinical trials of therapeutic angiogenesis. *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society.
- Hullinger, T. G., Montgomery, R. L., Seto, A. G., Dickinson, B. A., Semus, H. M., Lynch, J. M. et al. (2012). Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circulation Research*, *110*(1), 71–81. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD.
- Iaconetti, C., Polimeni, A., Sorrentino, S., Sabatino, J., Pironti, G., Esposito, G. et al. (2012). Inhibition of miR-92a increases endothelial proliferation and migration in vitro as well as reduces neointimal proliferation in vivo after vascular injury. *Basic Research in Cardiology*, *107*(5).
- Ikeda, S., He, A., Kong, S. W., Lu, J., Bejar, R., Bodyak, N. et al. (2009). MicroRNA-1 Negatively Regulates Expression of the Hypertrophy-Associated Calmodulin and Mef2a Genes. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(8), 2193–2204. American Society for Microbiology.
- Jameel, M. N., Li, Q., Mansoor, A., Xiong, Q., Swingen, C. & Zhang, J. (2011). Long-term preservation of myocardial energetic in chronic hibernating myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *300*(3), H836–H844.
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K. et al. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *New England Journal of Medicine*, *368*(18), 1685–1694.
- Ji, X., Takahashi, R., Hiura, Y., Hirokawa, G., Fukushima, Y. & Iwai, N. (2009). Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clinical Chemistry*, *55*(11), 1944–1949. Oxford Academic.
- Jopling, C. L., Yi, M., Lancaster, A. M., Lemon, S. M. & Sarnow, P. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science*, *309*(5740), 1577–1581.
- Keeley, E. C., Boura, J. A. & Grines, C. L. (2003). Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *The Lancet*, *361*(9351), 13–20.
- Khoury, E. M., Gregg, D. E. & Lowensohn, H. S. (1968). Flow in the major branches of the left coronary artery during experimental coronary insufficiency in the unanesthetized dog. *Circulation research*, *23*(1), 99–109.
- Kim, S.-J., Peppas, A., Hong, S.-K., Yang, G., Huang, Y., Diaz, G. et al. (2003). Persistent Stunning Induces Myocardial Hibernation and Protection. *Circulation Research*, *92*(11), 1233–1239.
- Kloner, R. A., Przyklenk, K. & Patel, B. (1989). Altered myocardial states. The stunned and hibernating myocardium. *The American journal of medicine*, *86*(1A), 14–22.
- Kohram, F., Fallah, P., Shamsara, M., Bolandi, Z., Rassoulzadegan, M., Soleimani, M. et al. (2018). Cell type-dependent functions of microRNA-92a. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(7), 5798–5804.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, *47*(D1), D155–D162. Oxford University Press.
- Krenning, G., Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. (2010, Dezember). The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M. et al. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, *438*(7068), 685–689.
- Kukreja, R. C., Yin, C. & Salloum, F. N. (2011). MicroRNAs: New Players in Cardiac Injury and Protection. *Molecular Pharmacology*, *80*(4), 558–564.
- Kupatt, C., Hinkel, R., Pfosser, A., El-Aouni, C., Wuchrer, A., Fritz, A. et al. (2010). 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. *Journal of the American College of Cardiology*, *56*(5), 414–422. Elsevier.
- Ladilov, Y. V., Siegmund, B. & Piper, H. M. (1995). Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *268*(4), H1531–H1539.
- Lavu, M., Gundewar, S. & Lefer, D. J. (2011). Gene therapy for ischemic heart disease. *Journal of Molecular*

- and *Cellular Cardiology*, 50(5), 742–750.
- Leask, A. (2010, Juni 11). Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circulation Research*.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–54.
- Leistner, D. M., Boeckel, J.-N., Reis, S. M., Thome, C. E., De Rosa, R., Keller, T. et al. (2016). Transcoronary gradients of vascular miRNAs and coronary atherosclerotic plaque characteristics. *European Heart Journal*, 37(22), 1738–1749.
- Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B. & Castelli, W. P. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *New England Journal of Medicine*, 322(22), 1561–1566.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868–874.
- Libby, P. & Theroux, P. (2005). Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation*, 111(25), 3481–3488.
- Loyer, X., Potteaux, S., Vion, A.-C. C., Guérin, C. L., Boulkroun, S., Rautou, P.-E. E. et al. (2014). Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circulation Research*, 114(3), 434–443.
- Lucas, T., Bonauer, A. & Dimmeler, S. (2018). RNA therapeutics in cardiovascular disease. *Circulation Research*, 123(2), 205–220. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD.
- Lytle, J. R., Yario, T. A. & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9667–9672.
- Mann, D. L. (2007). MicroRNAs and the failing heart. *New England Journal of Medicine*, 356(25), 2644–2645.
- Mari, C. & Strauss, W. (2002). Detection and characterization of hibernating myocardium. *Nuclear Medicine Communications*, 23(4), 311–322.
- Markkanen, J. E., Rissanen, T. T., Kivelä, A. & Ylä-Herttua, S. (2005, Februar 15). Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart - Gene therapy. *Cardiovascular Research*. Oxford Academic.
- Martin, C., Schulz, R., Rose, J. & Heusch, G. (1998). Inorganic phosphate content and free energy change of ATP hydrolysis in regional short-term hibernating myocardium. *Cardiovascular research*, 39(2), 318–26.
- Matsubara, H., Takeuchi, T., Nishikawa, E., Yanagisawa, K., Hayashita, Y., Ebi, H. et al. (2007). Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene*, 26(41), 6099–6105.
- Medical Advisory Secretariat. (2005). Positron emission tomography for the assessment of myocardial viability: an evidence-based analysis. *Ontario health technology assessment series*, 5(16), 1–167.
- Meier, P., Gloekler, S., Zbinden, R., Beckh, S., De Marchi, S. F., Zbinden, S. et al. (2007). Beneficial effect of recruitable collaterals: A 10-year follow-up study in patients with stable coronary artery disease undergoing quantitative collateral measurements. *Circulation*, 116(9), 975–983.
- Meier, P., Hemingway, H., Lansky, A. J., Knapp, G., Pitt, B. & Seiler, C. (2012). The impact of the coronary collateral circulation on mortality: A meta-analysis. *European Heart Journal*, 33(5), 614–621.
- Milani-Nejad, N. & Janssen, P. M. L. (2014). Small and large animal models in cardiac contraction research: Advantages and disadvantages. *Pharmacology and Therapeutics*, 141(3), 235–249.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L. et al. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–10518. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M. et al. (2015). Heart disease

- and stroke statistics-2015 update : A report from the American Heart Association. *Circulation*, 131(4), e29–e39. Lippincott Williams and Wilkins.
- Nakamura, M. & Sadoshima, J. (2018, Juli 1). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*. Nature Publishing Group.
- O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V. & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), 839–843.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S. et al. (2004). Identification and Characterization of a Novel Gene, C13orf25, as a Target for 13q31-q32 Amplification in Malignant Lymphoma. *Cancer Research*, 64(9), 3087–3095.
- Ozawa, C. R., Banfi, A., Glazer, N. L., Thurston, G., Springer, M. L., Kraft, P. E. et al. (2004). Microenvironmental VEGF concentration, not total dose, determines a threshold between normal and aberrant angiogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4), 516–527. The American Society for Clinical Investigation.
- Page, B. J., Banas, M. D., Suzuki, G., Weil, B. R., Young, R. F., Fallavollita, J. A. et al. (2015). Revascularization of Chronic Hibernating Myocardium Stimulates Myocyte Proliferation and Partially Reverses Chronic Adaptations to Ischemia. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(7), 684–697. NIH Public Access.
- Patel, M. R., White, R. D., Abbara, S., Bluemke, D. A., Herfkens, R. J., Picard, M. et al. (2013). 2013 ACCF/ACR/ASE/ASNC/SCCT/SCMR appropriate utilization of cardiovascular imaging in heart failure: a joint report of the American College of Radiology Appropriateness Criteria Committee and the American College of Cardiology Foundation Appropriate Use C. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(21), 2207–31.
- Petersen, M. & Wengel, J. (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in Biotechnology*, 21(2), 74–81.
- Rahimtoola, S. H. (1989). The hibernating myocardium. *American heart journal*, 117(1), 211–21.
- Rentrop, K. P., Cohen, M., Blanke, H. & Phillips, R. A. (1985). Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *Journal of the American College of Cardiology*, 5(3), 587–92.
- Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(3), 261–268. UPV/EHU Press.
- Rockey, D. C., Darwin Bell, P. & Hill, J. A. (2015). Fibrosis-a common pathway to organ injury and failure. (D.L. Longo, Hrsg.) *New England Journal of Medicine*, 372(12), 1138–1149. Massachusetts Medical Society.
- Rogg, E. M., Abplanalp, W. T., Bischof, C., John, D., Schulz, M. H., Krishnan, J. et al. (2018). Analysis of Cell Type-Specific Effects of MicroRNA-92a Provides Novel Insights into Target Regulation and Mechanism of Action. *Circulation*, 138(22), 2545–2558. Lippincott Williams and Wilkins.
- van Rooij, E., Marshall, W. S. & Olson, E. N. (2008). Toward MicroRNA-Based Therapeutics for Heart Disease. *Circulation Research*, 103(9), 919–928. NIH Public Access.
- van Rooij, E. & Olson, E. N. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *Journal of Clinical Investigation*, 117(9), 2369–2376.
- van Rooij, E. & Olson, E. N. (2012). MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nature reviews. Drug discovery*, 11(11), 860–72. Nature Publishing Group.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Liu, N., Williams, A. H., McAnally, J., Gerard, R. D. et al. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18255–60. National Academy of Sciences.
- van Rooij, E., Sutherland, L. B., Thatcher, J. E., DiMaio, J. M., Naseem, R. H., Marshall, W. S. et al. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(35), 13027–32. National Academy of Sciences.

- Ross, J. (1991). Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation*, 83(3), 1076–83.
- Ross, J. & Franklin, D. (1976). Analysis of regional myocardial function, dimensions, and wall thickness in the characterization of myocardial ischemia and infarction. *Circulation*, 53(3 Suppl), 188–92.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. (F.H. Epstein, Hrsg.) *New England Journal of Medicine*, 340(2), 115–126.
- Sawyer, D. B. & Loscalzo, J. (2002). Myocardial hibernation: restorative or preterminal sleep? *Circulation*, 105(13), 1517–9.
- Schaper, J., König, R., Franz, D. & Schaper, W. (1976). The endothelial surface of growing coronary collateral arteries. Intimal margination and diapedesis of monocytes - A combined SEM and TEM study. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology*, 370(3), 193–205.
- Schiattarella, G. G. & Hill, J. A. (2015). Is inhibition of hypertrophy a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload? *Circulation*, 131(16), 1435–1447. Lippincott Williams and Wilkins.
- Scholz, D., Ito, W., Fleming, I., Deindl, E., Sauer, A., Wiesnet, M. et al. (2000). Ultrastructure and molecular histology of rabbit hind-limb collateral artery growth (arteriogenesis). *Virchows Archiv*, 436(3), 257–270. Springer Verlag.
- Scholz, D., Ziegelhoeffer, T., Helisch, A., Wagner, S., Friedrich, C., Podzuweit, T. et al. (2002). Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34(7), 775–787. Academic Press.
- Schulz, R., Guth, B. D., Pieper, K., Martin, C. & Heusch, G. (1992). Recruitment of an inotropic reserve in moderately ischemic myocardium at the expense of metabolic recovery. A model of short-term hibernation. *Circulation Research*, 70(6), 1282–1295.
- Schulz, R. & Heusch, G. (1995). [Pathophysiology of the „hibernating“ myocardium]. *Zeitschrift für Kardiologie*, 84 Suppl 4, 91–100.
- Schulz, R., Rose, J., Martin, C., Brodde, O. E. & Heusch, G. (1993). Development of short-term myocardial hibernation. Its limitation by the severity of ischemia and inotropic stimulation. *Circulation*, 88(2), 684–95.
- Shan, K., Bick, R. J., Poindexter, B. J., Nagueh, S. F., Shimoni, S., Verani, M. S. et al. (2000). Altered adrenergic receptor density in myocardial hibernation in humans: A possible mechanism of depressed myocardial function. *Circulation*, 102(21), 2599–606.
- Shan, S. W., Lee, D. Y., Deng, Z., Shatseva, T., Jeyapalan, Z., Du, W. W. et al. (2009). MicroRNA MiR-17 retards tissue growth and represses fibronectin expression. *Nature Cell Biology*, 11(8), 1031–1038.
- Shimizu, I. & Minamino, T. (2016, August 1). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press.
- Shiojima, I., Sato, K., Izumiya, Y., Schiekofer, S., Ito, M., Liao, R. et al. (2005). Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, 115(8), 2108–2118. American Society for Clinical Investigation.
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T. et al. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476. Nat Cell Biol.
- Small, E. M., Frost, R. J. A. & Olson, E. N. (2010). MicroRNAs Add a New Dimension to Cardiovascular Disease. *Circulation*, 121(8), 1022–1032.
- Small, E. M. & Olson, E. N. (2011). Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, 469(7330), 336–342.
- Somel, M., Liu, X., Tang, L., Yan, Z., Hu, H., Guo, S. et al. (2011). MicroRNA-Driven Developmental Remodeling in the Brain Distinguishes Humans from Other Primates. (D. Penny, Hrsg.) *PLoS Biology*, 9(12), e1001214.
- Spinale, F. G. (2007, Oktober). Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiological Reviews*. American Physiological Society.

- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S. & Kauppinen, S. (2012, Januar 9). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence*. BioMed Central.
- Strauch, J. T., Lauten, A., Zhang, N., Wahlers, T. & Griep, R. B. (2007). Anatomy of Spinal Cord Blood Supply in the Pig. *Annals of Thoracic Surgery*, 83(6), 2130–2134.
- Swindel, M. & Smith, A. C. (o. J.). Information Resources on Swine in Biomedical Research, 2000.
- Takakura, S., Mitsutake, N., Nakashima, M., Namba, H., Saenko, V. A., Rogounovitch, T. I. et al. (2008). Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells. *Cancer Science*, 99(6), 1147–1154.
- Tani, M. & Neely, J. R. (1989). Role of intracellular Na⁺ in Ca²⁺ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H⁺-Na⁺ and Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Circulation research*, 65(4), 1045–56.
- Von Tell, D., Armulik, A. & Betsholtz, C. (2006, März 10). Pericytes and vascular stability. *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.
- Tennant, R. & Wiggers, C. J. (1935). THE EFFECT OF CORONARY OCCLUSION ON MYOCARDIAL CONTRACTION. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 112(2), 351–361. American Physiological Society.
- Thum, T. (2012). MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. *EMBO Molecular Medicine*, 4(1), 3–14. Wiley-Blackwell.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M. et al. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456(7224), 980–984. Nature Publishing Group.
- Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N., Flather, M. et al. (2018). European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *European Heart Journal*, 39(7), 508–579.
- Ulrich, V., Rotllan, N., Araldi, E., Luciano, A., Skroblin, P., Abonnenc, M. et al. (2016). Chronic miR-29 antagonism promotes favorable plaque remodeling in atherosclerotic mice. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 643–653. Wiley-Blackwell.
- Urbich, C., Dernbach, E., Reissner, A., Vasa, M., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2002). Shear Stress-Induced Endothelial Cell Migration Involves Integrin Signaling Via the Fibronectin Receptor Subunits α 5 and β 1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(1), 69–75. Cary, NC: SAS Institute.
- Urbich, C., Kuehbach, A. & Dimmeler, S. (2008). Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovascular Research*, 79(4), 581–588.
- Vachenaer, R. (2009). *Reduktion des Reperfusionsschadens am Schweineherz durch retrograde koronarvenöse Transfektion mit VEGF*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Vanoverschelde, J. L., Wijns, W., Borgers, M., Heyndrickx, G., Depré, C., Flameng, W. et al. (1997). Chronic myocardial hibernation in humans. From bedside to bench. *Circulation*, 95(7), 1961–71.
- Vanoverschelde, J. L., Wijns, W., Depré, C., Essamri, B., Heyndrickx, G. R., Borgers, M. et al. (1993). Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation*, 87(5), 1513–1523.
- Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkland, S. J. et al. (2008). Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell*, 132(5), 875–886.
- Vineberg, A., Mahanti, B. & Litvak, J. (1960). Experimental gradual coronary artery constriction by ameroid constrictors. *Surgery*, 47, 765–71.
- Virani, S. S., Alonso, A., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P. et al. (2020). Heart disease and stroke statistics—2020 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins.
- Völler, H., Nixdorff, U. & Flachskampf, F. A. (2000). Myokardialer Vitalitätsnachweis mit der Dobutamin-Echokardiografie: Aktuelle Übersicht. *Zeitschrift für Kardiologie*, 89(10), 921–931.
- Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hökfelt, T. et al. (2000). Potent and nontoxic

- antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5633–8. National Academy of Sciences.
- Wang, H., Ke, C., Ma, X., Zhao, Q., Yang, M., Zhang, W. et al. (2016). MicroRNA-92 promotes invasion and chemoresistance by targeting GSK3 β and activating Wnt signaling in bladder cancer cells. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Weber, K. T., Sun, Y., Tyagi, S. C. & Cleutjens, J. P. M. (1994, März 1). Collagen network of the myocardium: Function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press.
- Weber, M., Baker, M. B., Moore, J. P. & Searles, C. D. (2010). MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 643–648.
- Weiland, M., Gao, X. H., Zhou, L. & Mi, Q. S. (2012). Small RNAs have a large impact: Circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. *RNA Biology*. Taylor and Francis Inc.
- White, F. C., Roth, D. M. & Bloor, C. M. (1986). The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Laboratory animal science*, 36(4), 351–6.
- Wolf, D. & Ley, K. (2019). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 124(2), 315–327.
- Wu, W., Xiao, H., Laguna-Fernandez, A., Villarreal, G., Wang, K. C., Geary, G. G. et al. (2011). Flow-dependent regulation of krüppel-like factor 2 is mediated by MicroRNA-92a. *Circulation*, 124(5), 633–641.
- Ylä-Herttuala, S. & Baker, A. H. (2017, Mai 3). Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future. *Molecular Therapy*. American Society of Gene and Cell Therapy.
- Ylä-Herttuala, S., Bridges, C., Katz, M. G. & Korpisalo, P. (2017, Mai 1). Angiogenic gene therapy in cardiovascular diseases: Dream or vision? *European Heart Journal*. Oxford University Press.
- Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. (2010). Origins of cardiac fibroblasts. *Circulation Research*, 107(11), 1304–1312. NIH Public Access.
- Zeisberg, E. M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E. et al. (2007). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature Medicine*, 13(8), 952–961. Nature Publishing Group.
- Zerneck, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B. et al. (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Science Signaling*, 2(100), ra81-ra81.

7 DANKSAGUNGEN

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Christian Kupatt, nicht nur für das Überlassen des herausragenden Promotionsthemas, sondern auch für die geduldige Unterstützung während meines wissenschaftlichen Arbeitens an diesem spannenden Projekt.

Ein herzliches Dankeschön gebührt natürlich ebenso meiner Betreuerin Prof. Dr. med. vet. Rabea Hinkel. Durch ihre Hilfsbereitschaft und stetige Unterstützung mit konstruktiver Anleitung durfte ich neue Erfahrungen auf dem Gebiet der tierexperimentellen Forschung sammeln.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe für die kollegiale Zusammenarbeit sowie technische Hilfsbereitschaft. Hierfür gilt besonderer Dank an Andrea Howe und Katharina Klett, die durch ihr Mitwirken mein Projekt sehr unterstützt haben.

Prof. Dr. med. Ulrich Pohl danke ich für die Möglichkeit alle Tierversuche in den Räumlichkeiten des Walter-Brendel-Zentrums durchführen zu können.

Des Weiteren danke ich dem Team des FöFoLe-Programms, wodurch ich meine Promotion in einem wissenschaftlich außergewöhnlichen Rahmen mit exzellenter Förderung durchführen konnte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir durch ihre unermüdliche Unterstützung dieses Studium überhaupt ermöglicht hat.

8 AFFIDAVIT



Eidesstattliche Versicherung

Münch, Veronika

Name, Vorname

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

Kardioprotektive Wirkung der LNA-vermittelten microRNA-92a-Suppression bei chronischer myokardialer Ischämie

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.

Berlin, 11.01.2022

Veronika Münch

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand