

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

**Thymosin Beta4 vermittelte therapeutische Neovaskularisation
im Großtiermodell – Rolle der Gefäßmaturierung**

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

vorgelegt von
Wira Husada
aus
Tanjung Tiram, Indonesien

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Daphne Merkus

Prof. Dr. Sandra Eifert

Mitbetreuung durch die Prof. Dr. Rabea Hinkel
promovierte Mitarbeiterin:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2026

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	5
1.1 Klinischer Hintergrund.....	5
1.1.1 Koronare Herzerkrankungen (KHK)	5
1.1.2 Chronische Myokardischämie mit myokardialer Hibernation.....	5
1.2 Thymosin β 4 (T β 4).....	6
1.2.1 Einfluss auf die Neovaskularisation und Gefäßmaturierung	6
1.2.2 Einfluss auf das Myokard	6
1.3 Neuer Therapieansatz.....	7
1.3.1 Gentherapie.....	7
1.3.2 Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) als viraler Vektor.....	7
1.4 Applikationswege.....	8
1.5 Ziele.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Versuchstiere	10
2.1.1 Gruppenübersicht.....	10
2.1.2 Herstellung der T β 4-transgenen Tiere	11
2.1.3 Herstellung der rekombinanten Adeno-assozierter Viren (rAAV) und die Transduktionseffizienz	11
2.2 Modell der chronischen Myokardischämie	15
2.2.1 Überblick	15
2.2.2 Dyslipidämie als zusätzlicher Risikofaktor	16
2.2.3 Sequenzielle Überexpression des T β 4 mittels Tet-Off-Systems	16
2.3 Versuchsprotokoll.....	16
2.3.1 Antithrombotische Therapie	16
2.3.2 Narkoseeinleitung und -Überwachung	16
2.3.3 Zugangswege und periinterventionelles Management.....	17
2.3.4 Induktion der chronischen Myokardischämie.....	17
2.3.5 Regionale Applikation des viralen Vektors	18
2.3.6 Hämodynamische Messungen	18
2.3.7 Immunhistochemische Messung.....	22
2.4 Statistische Datenanalyse	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Normocholesterinämie Gruppe.....	25
3.1.1 Transduktionseffizienz	25

3.1.2	Mikrozirkulation.....	25
3.1.3	Makrozirkulation	27
3.1.4	Regionale Myokardfunktion	28
3.1.5	Globale Myokardfunktion	30
3.1.6	Sequenzielle Überexpression des T β 4 mit Hilfe des Tet-Off-Systems	31
3.2	Hypercholesterinämie Gruppe	35
3.2.1	Laborwerte.....	35
3.2.2	Mikro- und Makrozirkulation	36
3.2.3	Regionale und globale Myokardfunktion	37
4	Diskussion	39
4.1	Chronisches Myokardischämie-Modell.....	39
4.2	Neovaskularisierung durch transgene Expression von T β 4 und regionale rAAV-vermittelte T β 4-Überexpression	39
4.3	Sequenzielle Überexpression durch rAAV.tet-off.T β 4	39
4.4	Hypercholesterinämie als zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktor.....	40
4.5	Applikationswege.....	41
5	Zusammenfassung.....	43
6	Literaturverzeichnis	44
7	Danksagung	48

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

1.1.1 Koronare Herzerkrankungen (KHK)

Eine koronare Herzkrankheit ist eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen¹. Die Grundlage für diese Erkrankung bildet die Arteriosklerose, ein inflammatorischer Prozess der Koronararterien, der durch verschiedene Risikofaktoren, wie z. B. arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum sowie positive Familienanamnese begünstigt wird.

Die klinische Manifestation dieser Erkrankung kann im Rahmen einer akuten Myokardischämie/-infarktes oder aber auch im Rahmen einer Ischämie-bedingten Herzinsuffizienz ohne vorangegangenen Infarkt, sein. In beiden Fällen reduziert eine Myokardrevaskularisation die kardiovaskulär-bedingte Mortalität^{2,3}.

1.1.2 Chronische Myokardischämie mit myokardialer Hibernation

Während eine akute Myokardischämie in der Regel durch eine Plaqueruptur mit akutem thrombotischem Verschluss der Herzkranzgefäße entsteht, steht ein anderer pathophysiologischer Mechanismus bei einer chronischen Myokardischämie im Vordergrund⁴. Hier findet eine Progression der Arteriosklerose statt, die im späteren Verlauf zur hämodynamisch wirksamen Stenose bis hin zu einer Totalokklusion der Herzkranzgefäße führen kann. Es kommt zur myokardialen Minderperfusion mit daraus resultierender Gewebshypoxie. Um weitere Ischämie-Schäden zu reduzieren, nimmt die Kontraktilität des Myokards in dem ischämischen Gebiet ab. Diese Art des Anpassungsmechanismus wirkt protektiv auf das myokardiale Überleben und ist potential reversibel. Ein ist Zustand, der auch als myokardiale Hibernation bezeichnet wird⁵.

Aktuelle klinische Therapieoptionen zur Revaskularisation der chronischen Myokardischämie erfolgen entweder interventionell im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention oder chirurgisch im Rahmen einer koronaren Bypassoperation. Einige molekulare Therapieansätze mittels Verabreichung pro-angiogenestischer Faktoren, wie z. B. vascular endothelial growth factor, konnten zudem eine Neovaskularisation induzieren⁵.

In der vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde das kardioprotektive Potential des Thymosin β 4 in einem akuten Ischämie-Reperfusions-Schweine-Modell nachgewiesen werden⁶.

1.2 Thymosin β 4 (T β 4)

Thymosin β 4 ist ein wasserlösliches Protein, bestehend aus 43 Aminosäuren. Das ca. 5 kDa große Protein wird ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert, mit Ausnahme von Erythrozyten. Thymosin β 4 ist ein G-Aktin-bindendes Protein. Durch die hohe Bindungsaffinität zu G-Aktin spielt Thymosin β 4 eine zentrale Rolle in der Reorganisation des Zytoskeletts, z. B. in der Zellmigration. Besonders in hoher Konzentration findet sich Thymosin β 4 in Leukozyten, Makrophagen^{7,8}.

1.2.1 Einfluss auf die Neovaskularisation und Gefäßmaturierung

Während der Embryonalentwicklung der Maus zeigte sich Thymosin β 4 in Regionen mit Neovaskularisation hochreguliert⁹. Die embryonalen endothelialen Vorläuferzellen wiesen eine signifikant höhere Konzentration von Thymosin β 4 als die ausgereiften endothelialen Vorläuferzellen auf^{10,11}.

Eine stabile Neovaskularisation, welche eine Vaskulo-, Angio- und Arteriogenese umfasst¹², benötigt eine Rekrutierung von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen für die Gefäßreifung. Hier spielen besonders die glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der neugebildeten Gefäße während der Arteriogenese^{12,13,14}. Im Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass Thymosin β 4 sowohl an der Gefäß-Neubildung als auch an der Gefäßmaturierung beteiligt war¹⁵.

Frühere prä- und klinische Studien konnten eine Zunahme der Durchblutung alleine durch die Induktion einer Angiogenese in Abwesenheit der Gefäßreifung nicht erzielen^{16,17}, weshalb die Interaktion von Endothelzellen, Perizyten sowie glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Neovaskularisation von zentraler Bedeutung ist.

1.2.2 Einfluss auf das Myokard

Experimente mit T β 4-Knock-down-Mäusen zeigten eine reduzierte Dichte der Kleingefäße im Myokard, Malformation der Koronarien und weniger Rekrutierung der glatten Gefäßmuskelzellen. Der Effekt erklärte sich durch eine gestörte Migration der Vorläuferzellen aus dem Epikardium, welche in der Lage sind, sich weiter zu Endothelzellen oder zu glatten Gefäßmuskelzellen zu differenzieren¹⁸.

Ob diese Effekte in einem Myokard-Ischämie-Modell sich zeigten, wurde in einem Mausmodell mit Myokardischämie durch eine Ligatur des Ramus interventricularis anterior untersucht. Hier konnte die systemische Verabreichung von T β 4 eine Reduktion der Infarkt-Größe sowie Verbesserung der Myokardfunktion erzielen¹⁹.

In einem weiteren präklinischen Ischämie-Reperfusions-Großtiermodell (Schwein) unserer Arbeitsgruppe konnten durch eine selektive lokale Applikation von Tβ4 ebenso die Infarktgröße reduziert und die Myokardfunktion verbessert werden. Der Effekt ließ sich durch eine Reduktion der Apoptose der Endothel- und Myokardzellen nach Hypoxie und Reoxygenation sowie eine Reduktion der Leukozytenrekrutierung in vitro und in vivo erklären^{20,6}.

1.3 Neuer Therapieansatz

1.3.1 Gentherapie

Eine therapeutische Gentherapie für die Induktion einer Neovaskularisation kann bei symptomatischen Patienten mit koronarer Herzkrankheit mit bereits ausgeschöpfter interventioneller oder chirurgischer Revaskularisationsprozedur eine gute Option darstellen. Verschiedene virale Vektoren stehen hierfür zur Verfügung, z. B. Lenti- oder Retroviren, Adeno- oder adeno-assoziierte Viren (AAV). Die ersten Versuche zur Gen-Überexpression eines pro-angiogenetischen Faktors z. B. den vascular endothelial growth factor/ VEGF wurden mittels Adenoviren durchgeführt²¹, die trotz Design-Verbesserung von neuer Generation der Adenoviren weiterhin eine bedeutsame immunologische Reaktion hervorruften²².

1.3.2 Rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) als viraler Vektor

Adeno-assoziierte Viren gehören zu den sehr kleinen Parvoviren, ca. 22 nm groß und tragen Einzelstrang-DNA. Das Wildtyp-Genom kann in drei besondere Abschnitte eingeteilt werden, nämlich in das sogenannte „Rep“, durch das die für die Virusreplikation notwendigen Proteine kodiert werden, dann in das „Cap“, wodurch die Kapsidproteine kodiert werden, und schließlich die „inverted terminal repeat“ (ITR)-Abschnitte an beiden Enden des DNA, die für die Integration des Virus in die Wirtszelle notwendig sind²³. So können Wildtyp-adeno-assoziierte Viren in das Genom integrieren, bevorzugt an den so genannten „adeno-associated virus integration site 1“ (AAVS1) auf dem Chromosom 19 (Chr 19q13.3)²⁴.

Durch Modifikation der Wildtyp-adeno-assoziierten Viren durch Deletion der Rep- und Cap- und oder ITR-Gene entstehen replikationsdefiziente adeno-assoziierte Viren, auch als rekombinante adeno-assoziierte Viren (rAAV) genannt. Sie wiesen hierdurch im Vergleich zu wildtyp-adeno-assoziierten Viren eine deutlich niedrige Genomintegration in Wirtszelle und geringe Pathogenität auf^{25,26,27}.

Adeno-assoziierte Viren können zudem in unterschiedliche Serotypen unterteilt werden²⁸.

Abhängig von den Serotypen besteht eine mehr oder weniger spezifische Organ-/Gewebetransduktion. Unter den am bestens untersuchten und meist eingesetzten Serotypen der AAV sind die von Serotyp 2²⁹. In unserer Studie wurde der AAV 2/9, der mit sogenanntem „cross-packaging“ mit dem Viruskapsid von AAV9 hybrid zusammengeführt wurde, eingesetzt. Mit Capsid von AAV9 konnte eine hohe spezifische Transduktionsrate in den Myokardzellen erzielt werden³⁰.

1.4 Applikationswege

Nach dem geeigneten viralen Vektor sind nun die Applikationswege wichtig für eine erfolgreiche Gentherapie. Grundsätzlich kann die Gentherapie sowohl systemisch als auch regional appliziert werden, wobei die systemische Applikation z. B. über einen peripheren intravenösen Zugang die einfachere Methode darstellt. Nachteile einer systemischen Gabe sind jedoch die Notwendigkeit einer höheren viralen Konzentration, um eine ausreichende Gewebetransduktion im Ziel-Gewebe zu erzielen und die hiermit verbundene unerwünschte Nebenwirkung z. B. bei mehr off-Target-Transduktionen^{31,32}. In unserem Versuchsmodell mit Myokardischämie wäre außerdem, zu erwarten, dass noch eine höhere virale Konzentration benötigt wird, um eine suffiziente Gewebetransduktion im minder-perfundierten Gewebe zu erreichen. Somit stellt dies noch ein höheres Risiko für eine unerwünschte Nebenwirkung dar.

Die regionale Applikation einer katheter-basierten Gentherapie kann sowohl antegrad als auch retrograd erfolgen. Die antegrad Applikation hat den Nachteil, dass bei Koronarstenosen oder -Verschlüssen durch die eingeschränkte Koronarperfusion die Aufnahme des viralen Vektors lokal nicht optimal bzw. eingeschränkt ist.

Hier wurde in vorangegangener Arbeit unserer Arbeitsgruppe eine retrograde katheter-basierte Applikation der Gentherapie etabliert und weiterentwickelt. Dies erscheint bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit optimal zu sein, denn selten sind die Koronarvenen von der Arteriosklerose betroffen, damit wäre der Applikationsweg zugänglich^{33,34}.

In unserem Versuch wurde das sogenannte selektiv druck-regulierte Retroinfusionsverfahren durchgeführt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Methode im präklinischen Schweine-Modell sicher und wirksam war^{16,35-37}. Der Vergleich dieses Verfahrens mit intramyokardialer Gentransfer zeigte zudem eine homogene und effizientere Genübertragung im präklinischen Schweine-Modell³⁸. Auch im Rahmen klinischer Studien kam die selektiv druck-regulierte Retroinfusion bereits zum Einsatz und konnte bei Patientinnen sicher durchgeführt werden^{33,39}.

1.5 Ziele

Ziel dieser Studie war, das kardioprotektive Potential von T β 4 durch Überexpression in einem präklinischen Schweinemodell der chronischen Myokardischämie zu untersuchen. Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Inwieweit ist die Steigerung der Neovaskularisierung durch regionale Überexpression mittels viralen Vektors im Vergleich zu ubiquitärer Transgenen-Expression von T β 4 klinisch relevant?
- Kann eine sequenzielle T β 4-Überexpression mittels regulierbaren Tet-off-Vektors vergleichbare Verbesserung der Neovaskularisierung und der Myokardfunktion erzielen?
- Welchen Einfluss hat Hypercholesterinämie als zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktor auf die Neovaskularisierung?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die vorliegende Studie wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-26-09 und 55.2-1-54-2532-62-13). Das Versuchstier waren deutsche Landschweine. Die Haltung und Durchführung der Tierversuche fanden im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin in Großhadern statt. Am ersten Versuchstag waren die Schweine durchschnittlich 3 Monate alt und 25 kg schwer. Das durchschnittliche Gewicht der normocholesterinämen Gruppe betrug 40 kg am Tag 28 und 80 kg am Tag 56.

2.1.1 Gruppenübersicht

Normocholesterinämie Gruppe	Anzahl
rAAV.LacZ (Kontrolle)	7
rAAV.T β 4	6
rAAV.tet-off.T β 4	6
T β 4.tg (T β 4-Transgen)	5

Hypercholesterinämie Gruppe	Anzahl
rAAV.LacZ (Kontrolle)	4
rAAV.T β 4	5

2.1.2 Herstellung der Tβ4-transgenen Tiere

Die transgenen Tβ4-überexprimierenden Tiere wurden am Institut für Nutztiergenetik in Neustadt unter Leitung von Prof. H. Niemann hergestellt⁴⁰.

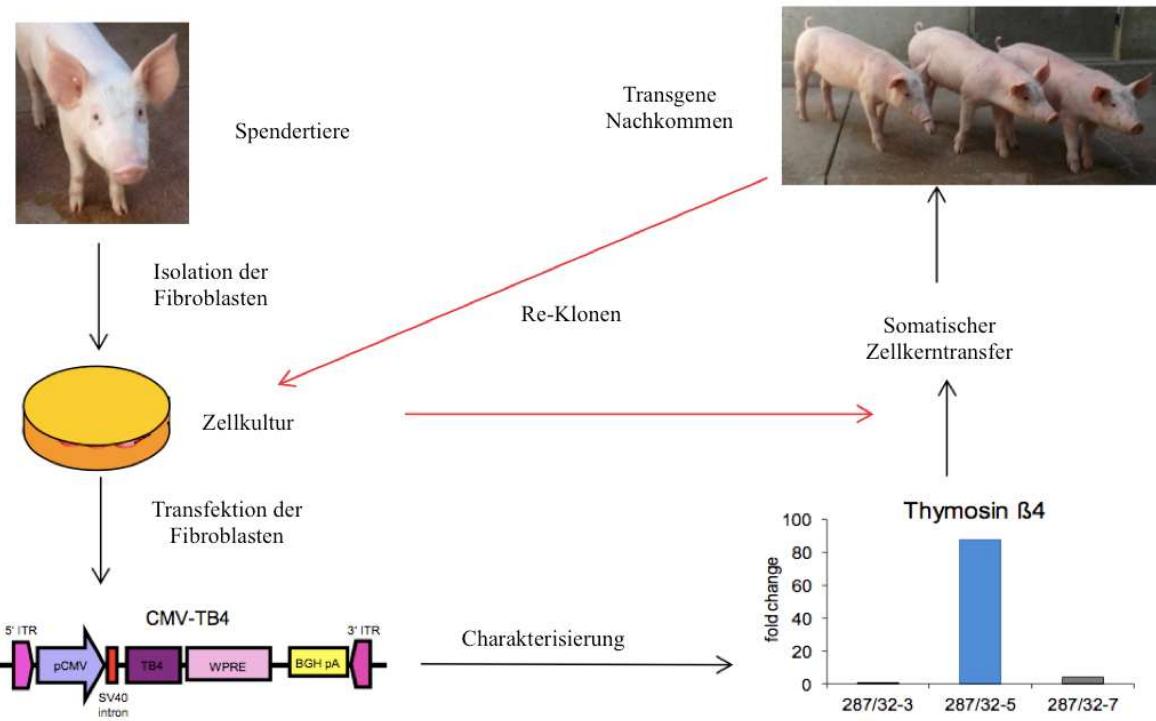


Abb. 1: Schematische Darstellung der Herstellung der Tβ4-Transgenen Tiere⁴¹

Fibroblasten von Spendertieren wurden entnommen und kultiviert. Diese wurden mit pCMV-Tβ4 via Elektroporation unter Antibiotika-Selektion transfiziert. Nach 14 Tagen wurde die Transgenexpression bestimmt. Nur erfolgreich Tβ4-transfizierte Fibroblasten wurden nachfolgend für einen somatischen Zellkerntransfer benutzt. Der Zellkerntransfer erfolgte in bereits enukleierte Oozyten der Empfängertiere, deren Nachkommen nun nach der Tβ4-Transgenexpression untersucht wurden. Die Nachkommen der ersten Generation mit erfolgreicher Tβ4-Transgenexpression wurden anschließend für einen zweiten somatischen Zellkerntransfer vorbereitet. Deren Fibroblasten wurden nun für die nächsten klonalen Schweine verwendet. Die Nachkommen der zweiten Generation dienten schließlich unserem Versuch nach Genotypisierung als Tβ4-Transgen-Modell (Tβ4.tg).

2.1.3 Herstellung der rekombinanten Adeno-assoziierter Viren (rAAV) und die Transduktionseffizienz

Für die Herstellung gewünschter rekombinanter Adeno-assoziierter Viren wurde eine Tripeltransfektionsmethode verwendet. Hierbei wurden drei Plasmide in einer Zelle benötigt:

Ein Plasmid mit den entsprechenden Informationen des Helfervirus, ein zweites Plasmid mit den erforderlichen AAV-Anteilen und ein drittes Plasmid mit dem gewünschten Transgen einschließlich CMV-Promotor.

Zunächst wurden HEK (Human embryonic kidney)-293-Zellen auf 50 Platten mit jeweils 22,1 cm² gesplittet und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Das Medium wurde zwei Stunden vor Transfektion über einen Vakuumsabzug mittels einer 2ml-Aspirationspipette vorsichtig abgesaugt. Dann wurde frisches serumfreies Medium hinzugegeben. Für die Transfektion wurde Polyethylenimin (PEI) mit nachgewiesener überdurchschnittlicher Transfektionsrate beansprucht⁴².

Das benötigte Transfektionsgemisch bestand aus 40 ml serumfreiem Medium in einem 50 ml-Falcon und den dazu gegebenen Plasmiden, nämlich

- Delta F6, Adenovirus-Helperplasmid (1300 µg)
- p 600 Transplasmid mit den AAV2 rep und AAV9 cap Genen³⁰ (650 µg)
- Cisplasmid mit dem Transgen, flankiert von beiden ITR-Regionen (650 µg).

Diese DNA-Medium-Lösung wurde gevortext und auf vier Falcons mit jeweils 10 ml aufgeteilt. Zu jedem Falcon wurden 15 ml serumfreies Medium hinzugegeben und erneut gevortext. Anschließend wurden 1300 µl PEI (1µg/µl) pro Ansatz dazu pipettiert und erneut gevortext, bevor die Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte.

Bei der Transfektion wurden dann 2,1 ml dieses Gemisches auf der zuvor vorbereiteten Platten mit HEK-293-Zellen gleichmäßig verteilt. Nach vier Stunden wurden dem Medium 5ml DMEM mit 50% FCS und 1% Pen/Strep hinzugegeben.

24 Stunden nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM 10% FCS (1% Pen/Strep). Nach weiteren 48 Stunden fand dann die Zellernte statt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und suspendiert. Die Suspension wurde dann für 15 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend bei -80°C bis zur Aufreinigung eingefroren.

Zu Beginn der Virusaufreinigung wurden die Zellen 10 Minuten bei 37°C aufgetaut. Das Pellet wurde dann mit 27 ml TMN-Puffer resuspendiert, auf ein Endvolumen von 35ml eingestellt und auf Eis gesetzt. Die Auflösung der Zellmembran erfolgte durch Sonifizierung bei dreimal 30 Sekunden mit einem Output von 5/30% im Eisswasserbad.

Zum Abbau freier DNA und RNA außerhalb des Viruskapsids wurden 3 µl Benzonase hinzugefügt. Danach erfolgte eine 20-minutige Inkubation bei 37°C, wobei alle 5 Minuten

invertiert wurde. Zum Aufschluss der Zellen erfolgte eine Zugabe von 1,25ml 10% Desoxycholsäure. Das Lysat wurde nun vorsichtig invertiert und inkubierte dann für 10 Minuten bei 37°C, gefolgt von 15-minütiger Lagerung auf Eis. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 4.000 rpm. Der Überstand wurde nun in ein neues steriles Falcontube überführt und dessen Volumen bestimmt. Zur Aufreinigung der Viruspartikel war eine Dichtebestimmung über einen Cäsiumchloridgradienten notwendig. Hierfür wurde zunächst pro 1 ml Überstand 0,454 g Cäsiumchlorid (CsCl) hinzugegeben und vermischt. Für die Dichtebestimmung wurden zwei unterschiedliche CsCl-Lösungen, jeweils 9 ml, mit einer Dichte von 1,41 und 1,61 benötigt. Diese wurden anschließend in SW-28 Tubes gefüllt, wobei das weniger dichte Gemisch zuerst gefüllt wurde, gefolgt von dichterem Gemisch. Es wurden dann 17-18 ml des in Falcons befindlichen Überstandes vorsichtig hinzugegeben. Anschließend folgte eine Ultrazentrifugation mit 25.000 rpm über 18-20 Stunden bei 15°C (Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Beckmann, München, Deutschland). Nach der Zentrifugation wurde milliliterweise der Gradient abgenommen und in Eppendorf-Gefäße überführt. Danach erfolgte eine Refraktionsindex-Bestimmung mittels Refraktometers der jeweils 5 µl Proben aus jedem Eppendorf-Gefäß. Fraktionen, die einen Refraktionsindex zwischen 1,362 und 1,373 aufwiesen, galten als AAV-Träger, wurden deshalb aufgehoben und in 70 Ti-Röhrchen Quick Seal Beckmann 342413 (Beckmann, München, Deutschland) überführt und bei Bedarf mit CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,41 aufgefüllt, bevor es bei 60.000 rpm und 15°C für 20-24 Stunden erneut ultrazentrifugiert wurde.

Danach wurde jeweils 0,5 ml Aliquot abgenommen und dessen Refraktionsindex erneut bestimmt. Aliquots mit Werten zwischen 1,362 und 1,373 wurden aufgehoben und wieder in Beckmann-Röhrchen ultrazentrifugiert. Anschließend wurden erneut 0,5 ml Aliquot abgenommen. Aliquots mit Werten in einem neu festgelegten Referenzbereich zwischen 1,364 und 1,371 wurden nun weiterverwendet und einem Falcontube vereinigt.

Am darauffolgenden Tag wurden die gewonnenen Aliquots in 20 ml PBS-Lösung in einem Amicon Ultra-15 Ultracel 10K Filter (Millipore, Billerica, USA) für 10-15 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert. Das ca. 2 ml entstandene Konzentrat wurde erneut mit PBS-Lösung gewaschen und auf 2 ml zentrifugiert.

Zur Bestimmung der Viruskonzentration wurde quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) angewandt. Hierfür wurden mehrere serielle Verdünnungsreihen (1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng und 0,001 ng) eines Standards, hierbei CMV-Vektor-Plasmids, angefertigt. Diese wurden dann mit dem unbekannten Titer von rekombinantem AAV verglichen.

Für die qPCR wurde das DNase Amplification Grade Kit verwendet. Zu 10 ml des Virusgemisches wurden 4 µl DNase, 10 µl DNase Puffer und 76 µl H₂O hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 µl 25mM EDTA zur Inaktivierung der DNase hinzugefügt. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65°C, bevor das Gemisch auf Eis gestellt wurde. Anschließend wurde die Lösung zusammen mit dem Taq-Man-Mix und einem Primer für das virusspezifische Bgh-Gen in die PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Von der Virus (AAV)-Lösung mit noch unbekanntem Titer wurden nun zwei Verdünnungen, 1:100 und 1:1000, hergestellt. Diese wurden mit oben genannten seriellen Verdünnungsreihen des CMV-Vektor-Plasmids zusammen pipettiert.

Nach Durchführung der qPCR konnte dann eine Standardkurve erstellt werden, anhand derer die Kopienanzahl und hiermit der Titer bestimmt werden konnte. Für die Herstellung des viralen Vektors, rAAV.LacZ, rAAV.Tβ4, rAAV.tet-off.Tβ4, wurden LacZ, respektive Tβ4 und Tet-off-Tβ4-System, in dem Transgen integriert. Die Transduktionseffizienz wurde mittels Real-Time-PCR mit unten genannten Primeren (iQ SYBR Green supermix, Bio-Rad, München) durchgeführt.

GAPDH vorwärts 5'-AATTCAACGGCACAGTCAAG-3'
GAPDH rückwärts 5'-ATGGTGTT-GAAGACACCAGT-3'

Tβ4 vorwärts 5'-TCATCGATATGTCTGACAAAC-3'
Tβ4 rückwärts 5'-CAGCTTGCTCTCTGTTCAA-3'

2.2 Modell der chronischen Myokardischämie

Das präklinische Schweinemodell der chronischen Myokardischämie ist in unserem Labor bereits etabliert⁴³.

2.2.1 Überblick

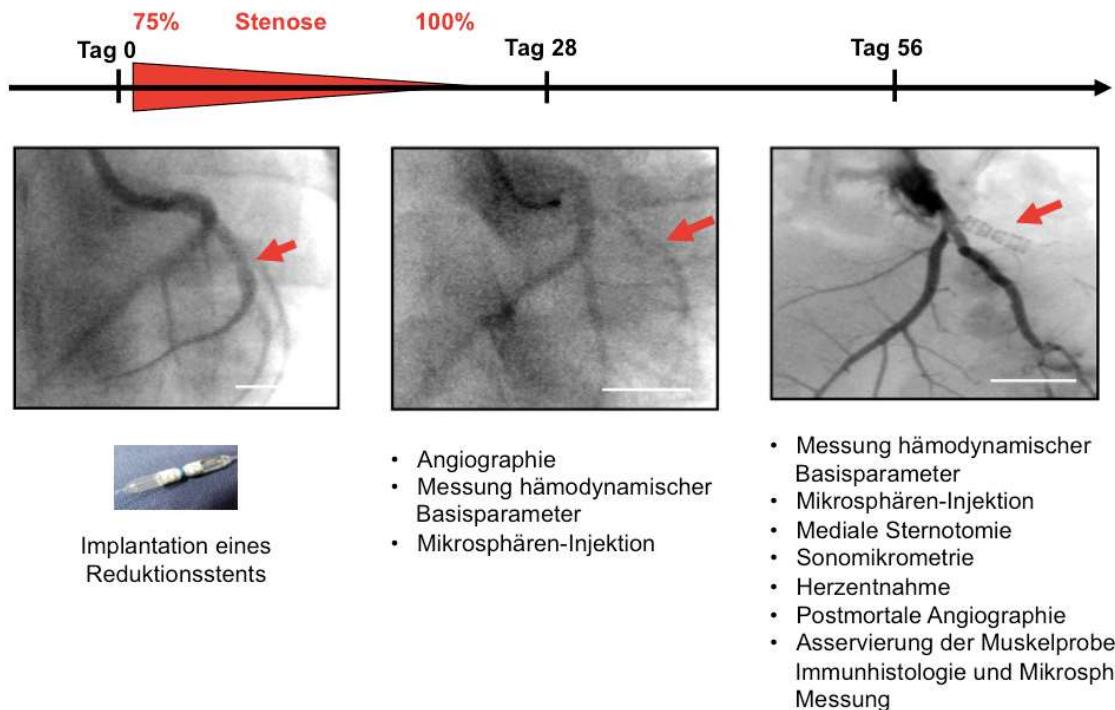


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf des Tierversuches (verändert nach Hinkel, R. et al. Nature communications 2014 ⁴¹)

Am Tag 0 wurde ein Reduktionsstent in den Ramus circumflexus der linken Koronararterie eingesetzt. Dieser induzierte eine 75%ige Ausgangstenose und führte zu einer kompletten Okklusion des Gefäßes nach 28 Tagen. Nach Erhebung hämodynamischer Basisparameter (Ejektionsfraktion, linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP) und Mikrosphären-Injektion) erfolgte am Tag 28 gemäß der Gruppeneinteilung eine regionale Applikation der adeno-assoziierten viralen Vektoren durch selektive druckregulierte Retroinfusion⁴⁴. Am Tag 56 wurden in einem dritten Eingriff die oben genannten Messungen wiederholt, danach führten wir eine mediale Sternotomie mit anschließender Messung der subendokardialen Segment-Verkürzung durch. Das Herz wurde anschließend entnommen. Nach Durchführung einer postmortalen Koronarangiographie wurden der linke Ventrikel aus Ischämie- und Nicht-Ischämie-Gebieten in kleine Stücke geschnitten. Die Myokardproben wurden anschließend zur weiteren Bestimmung (Mikrosphären, Immunhistochemie) im Labor weiterverarbeitet.

2.2.2 Dyslipidämie als zusätzlicher Risikofaktor

Die Hypercholesterinämie in unserem präklinischen Schweinemodell der chronischen Myokardischämie wurde durch die fettreiche Fütterung über die gesamte Versuchsdauer von 56 Tagen hervorgerufen. Es wurden Laborparameter wie Cholesterin, Triglyceride, Insulin sowie Glukose bestimmt.

2.2.3 Sequenzielle Überexpression des T β 4 mittels Tet-Off-Systems

Der häufig eingesetzte konstitutive CMV-Promotor zur kontinuierlichen Transduktion des gewünschten Genes wurde in unserem Versuch mit dem induzierbaren Tet-Promotor verglichen. Mit Hilfe des induzierbaren Tet-Promotors konnten wir so eine sequenzielle Gentransduktion erzielen⁴⁵. Denn eine steuerbare oder induzierbare Genexpression bietet eine sehr gute Möglichkeit um ein bestimmtes Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt im Bedarfsfall zu exprimieren. Wir verwendeten das Tet-off-System, bei dem eine gezielte reversible Unterdrückung der Genexpression durch Zugabe von Doxycyclin erzielt werden. Die Tiere in dieser Gruppe erhielten Doxycyclin am Tag 35, Tag 42 und Tag 49 für jeweils 5 Tage. Dies führten zu einer kurzen Überexpressionsdauer des T β 4 von lediglich zwei Tagen in der Woche bis zum Versuchsende.

2.3 Versuchsprotokoll

2.3.1 Antithrombotische Therapie

Alle Tiere erhielten eine Sättigungsdosis von 300 mg Clopidogrel (Iscover®, Bristol-Myers Squibb GmbH, München) täglich per os für insgesamt drei Tage bis zum Versuchsbeginn. Vor einer Stentimplantation wurden zudem ASS 500 mg (Aspisol, Bayer AG, Leverkusen) und Heparin 400 I.E./kg Körpergewicht (Heparin-Natrium, Braun, Melsungen) intravenös verabreicht. Als weitere antithrombotische Therapie erhielten die Tiere ASS 100 mg (Aspirin, Bayer AG, Leverkusen) und Clopidogrel 75 mg täglich per os für die ersten sieben Tage nach der Stentimplantation.

2.3.2 Narkoseeinleitung und -Überwachung

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 20 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Inresa GmbH, Freiburg), 10 mg/kg Körpergewicht Azaperon (Stresnil, Janssone-Cilag, Neuss) und 0,5 mg Atropin (Atropinsulfat 0,5 mg/ml, Braun, Melsungen). Danach wurde ein intravenöser Zugang an einer Ohrvene gelegt. Zur Vertiefung der Narkose wurden 5 mg Midazolam (Midazolam ratiopharm 15 mg/3ml, Ratiopharm, Ulm) und 0,002 mg/kg Körpergewicht Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5 mg Injektionslösung, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) intravenös verabreicht. Die Tiere wurden anschließend mit Hilfe eines Laryngoskops

endotracheal intubiert und beatmet (Servo Ventilator 900, Siemens, München) sowie auf dem Operationstisch an den Extremitäten fixiert.

Die Narkose wurde durch kontinuierliche i. v. Gabe von 10 mg/kg Körpergewicht/h Propofol (Disoprivan 2%, AstraZeneca, Wedel) über eine Spritzenpumpe (Perfusor, Braun, Melsungen) unter EKG- (Sirecust 304D, Siemens, München) und Pulsoxymeter- (Biox 3700e Pulsoxymeter, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) aufrechterhalten.

2.3.3 Zugangswege und periinterventionelles Management

Für den Zugangsweg der Katheterintervention erfolgte zunächst ein Hautschnitt mit Hilfe eines Skalpells (Skalpell, Feather Safety Razor Co, Osaka, Japan) über dem Musculus Sternocleidomastoideus. Hiernach wurden die Vena jugularis externa und Arteria carotis communis vorsichtig frei präpariert. Die so präparierten Gefäße wurden nach einander mit einer 9F- und 11F-Katheter-Schleuse (Cordis, Miami, USA) kanüliert.

Während der gesamten Versuchsdauer erfolgte zudem eine i. v. Infusion von 6%-iger HES(Hydroxyethylstärke)-Lösung (Fresenius Kabi, Bad Homburg) und 0,9%iger NaCl-Lösung mit Zusatz von 150 mg Amiodaron (Cordarex, Sanofi-Aventis, Frankfurt) und 1000 mg Magnesium (Magnesium Verla, Verla-Pharm Arzneimittel, Tutzing).

Zur Infektprophylaxe wurde am Ende der Intervention einmalig 750 mg Cefuroxim (Cefuroxim, Ratiopharm, Ulm) i. v. verabreicht.

2.3.4 Induktion der chronischen Myokardischämie

Vor der Induktion der chronischen Myokardischämie wurde ein Stent mit einer Polytetrafluorethylen (PTFE)-Membran (Jostent, Jomed, Rangendingen) zu einem sogenannten Reduktionsstent vorbereitet⁴⁶. Die Stentmitte wies, wie in der Abbildung 2, eine sanduhrförmige Verengung auf.

Zunächst wurde ein Führungskatheter (Cordis, Miami, USA) über die zuvor eingelegte Katheter-Schleuse in der Arteria carotis communis unter radiologischer Kontrolle (Exposcop 8000 C-Bogen, Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg) und Kontrastmittel-Gabe (Imeron 350, Bracco Imaging, Konstanz) in den linken Hauptstamm platziert. Mittels des Führungskatheters wurde ein Führungsdrat (Roadrunner Extra-Support, Cook Deutschland GmbH, Mönchengladbach) in den Ramus circumflexus vorgeschoben. Der Führungsdrat diente als Schiene für nun zum Einsatz kommenden PTCA-Ballon-Katheter (AMG, Raesfeld-Erle) mit dem vorbereiteten Reduktionsstent. Der Reduktionsstent wurde so durch eine Ballondilatation mit Hilfe eines Inflator im proximalen Ramus circumflexus dilatiert und somit implantiert.

Eine Angiographie zur Kontrolle der korrekten Lage und vollständigen Entfaltung des Reduktionsstents sowie Abschätzung des Stenosegrades wurde im Anschluss durchgeführt. Der eingesetzte Reduktionsstent induzierte initial eine 75%ige Stenose des Gefäßes und führte zu einer vollständigen Okklusion nach 28 Tagen.

2.3.5 Regionale Applikation des viralen Vektors

Am Tag 28 erfolgte die regionale Applikation des viralen Vektors in die Koronarvene mittels eines Retroinfusionskatheters. Diese retrograde Applikation wurde hinsichtlich der Sicherheit und Effektivität bereits in einer klinischen Studie mit über 300 Patienten geprüft³³. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass durch die druckregulierte Retroinfusion eine selektive und homogene Verteilung der Genvektoren erzielt werden konnte⁴⁷. Auch verglichen mit einer intrakardialen Direktinjektion, sowohl epikardial als auch endokardial, war dieses Verfahren überlegen³⁸.

Die Tiere erhielten je nach Behandlungsgruppe 5×10^{12} virale Partikel (rAAV.LacZ, rAAV.Tβ4, rAAV.Tet-off.Tβ4) über den Retroinfusionskatheter.

In der Gruppe mit der Tet-Off-Genregulation wurden zusätzlich Doxycyclin für insgesamt fünf Tage am Tag 35, Tag 42 und Tag 49 per os verabreicht. Die Doxycyclin-Gabe führte zur Unterdrückung der Genexpression von Tβ4. Hiermit konnten wir eine steuerbare Genexpression von Thymosin β4 erzielen.

2.3.6 Hämodynamische Messungen

Über die zuvor eingelegte arterielle Schleuse wurde ein Katheter mit Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg) auf Herzhöhe installiert. Systemische Drücke wurden so während der gesamten Untersuchung überwacht.

Chronische Myokardischämie führt zur Beeinträchtigung der myokardialen Funktion. Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung können in Ruhe zunächst asymptatisch sein. Typische Beschwerden wie Angina pectoris oder Dyspnoe treten häufiger unter Belastung auf. Analog zu diesem klinischen Erscheinungsbild analysierten wir die Myokardfunktion sowohl in Ruhe als unter Belastung.

Um einen Belastungszustand zu simulieren, erhöhten wir die Herzfrequenz durch eine intrakardiale Schrittmacherstimulation. Hierfür wurde unter radiologischer Kontrolle eine passagere Schrittmachersonde (Medtronic 5375 Demand Pulse Generator, Medtronic, Minneapolis, USA) rechtsatrial eingelegt. Die Herzfrequenz wurde durch die Schrittmacherstimulation von baseline (ca. 80 Schlägen/Minute) auf 120 und 150

Schläge/Minute erhöht und am EKG-Monitor überprüft.

Als Parameter für die globale Myokardfunktion wurden die Ejektionsfraktion (EF) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck bestimmt. Für die regionale Myokardfunktion wurde die subendokardiale Segmentverkürzung (SES) untersucht, die eine regionale Myokardkontraktilität darstellt⁴⁸. Die Messung der regionalen Myokardperfusion erfolgte mit Hilfe fluoreszierender Mikroskophären.

Die hämodynamischen Messungen wurden parallel zum EKG über einen Zeitraum von einer Minute durchgeführt. Anhand fünf repräsentativer Herzschläge wurden die Messwerte gemittelt ausgewertet.

2.3.6.1 Globale myokardiale Funktion

2.3.6.1.1 Ejektionsfraktion (EF)

Die EF wurde invasiv mittels Lävokardiographie bestimmt. Hierbei wurde der linke Ventrikel mit einem Pigtail-Katheter (Infinity, Cordis, Roden, Niederlande) unter Durchleuchtung sondiert. Die Fläche des linken Ventrikels in der enddiastolischen (EDF) und in der endsystolischen Phase (ESF) wurde planimetrisch mit Hilfe von Computerprogramm Image J errechnet. Die EF wurde schließlich anhand dieser Formel berechnet:

$$EF = \frac{EDF - ESF}{EDF} \times 100\%$$

2.3.6.1.2 Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

Für die Messung des LVEDP verwendeten wir einen speziellen Pigtail-Katheter (Mikro-Tip® Druck-Volumen-Katheter-Transducer-Kombination, Millar Instruments, Texas, USA), an dessen distalem Teil kleine Drucksensoren angebracht sind. Der Katheter wurde analog zur Lävokardiographie im linken Ventrikel platziert. Das Katheter-Tranducer-System wurde vor der Verwendung an der Druck-Kontrolleinheit auf die festgesetzten 0 mmHg und 100 mmHg geeicht.

Die Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks (LVD) wurde kontinuierlich am Computer (Pentium 200Mhz, HSE, March-Hugstetten) gespeichert. Die LVEDP-Werte konnten wir anhand der EKG-Kurve, nämlich zum Zeitpunkt des maximalen R-Zackenausschlags bzw. in der enddiastolischen Phase des Herzzyklus ermitteln.

2.3.6.2 Regionale myokardiale Funktion mittels Sonomikrometrie

Mit Hilfe des Ultraschall-Laufzeit-Verfahrens wurde die SES gemessen. Bei diesem Verfahren setzten wir die Sonomikrometrie (SonoMetrics, Ontario, Kanada) ein. Nach medianer

Sternotomie und Perikardektomie wurden jeweils zwei Sonomikrometerkristalle subendokardial mittels einer Stichinzision (Scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co., Japan) im Abstand von 1,5 cm im ischämischen RCX-Versorgungsgebiet und im nicht-ischämischen LAD-Kontrollgebiet platziert. Beide Piezokristalle fungierten sowohl als Sender als auch Empfänger der Ultraschallsignale. Mit Hilfe des Computerprogramms CardioSOFT (3.1.5, SonoMetrics, Ontario, Kanada) wurden der enddiastolische Abstand (EDA) und endsystolische Abstand (ESA) zwischen den beiden Kristallen gemessen. Zur Berechnung der SES wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{SES} = \frac{\text{EDA} - \text{ESA}}{\text{EDA}} \times 100\%$$

2.3.6.3 Regionale myokardiale Perfusion mittels Mikrosphären

Bereits vor über 50 Jahren kamen Mikrosphären zum Einsatz für die Messung der regionalen Organperfusion am Großtiermodell (Schaf und Ziege)⁴⁹. Es konnte von Rudolph et al.⁴⁹ gezeigt werden, dass die Verteilung der Mikrosphären im Kapillarbett des jeweiligen Endorgans proportional zu dem Blutfluss war. Relevante hämodynamische Veränderungen wie die Herzfrequenz und der Blutdruck vor, während und nach der Mikrosphären-Injektion wurden nicht beobachtet.

Die verwendeten Mikrosphären waren damals 50µm groß im Durchmesser und mit verschiedenen radioaktiven Nukliden markiert. Die Mikrosphären wurden in die Blutbahn injiziert und blieben aufgrund der physikalischen Größe in Blutkapillaren (ca. 10µm-Durchmesser) hängen.

Spätere Weiterentwicklung in der Mikrosphären-Messmethode durch den Ersatz des radioaktiven Nuklids mit einem Fluoreszenzfarbstoff, zeigte nicht nur eine bessere Sensitivität, sondern verkürzte auch den zeitlichen und materiellen Aufwand des Messverfahrens. Darüberhinaus besteht keine gesundheitliche Gefahr/ Strahlenexposition für die Laboranten bei der Arbeit mit fluoreszierenden Mikrosphären.⁵⁰. Diese Eigenschaften ermöglichen Mikrosphären seither als Goldstandard für die Messung der regionalen Organperfusion.

Für unsere Messung verwendeten wir 15 µm große FluoSpheres™ - Mikrosphären (Molecular Probes, Invitrogen, USA) mit verschiedenen Farbspektren. Für jede einzelne Messung wurde stets ein anderes Farbspektrum ausgewählt. Zur Vorbereitung wurden 5 ml Mikrosphärenlösung (5x10⁶ Partikeln) durch Vortexen und Ultraschallbad durchmischt und in 15 ml Dextran 10% suspendiert. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Pigtail-Katheters gleichmäßig über eine Minute in den linken Ventrikel injiziert. Parallel wurde eine

Referenzprobe aus der Arteria carotis communis mittels einer Spritzenpumpe (Harvard apparatus, South Natick, USA) mit einer konstanten Abzugsrate von 4.1ml/Minute über 3 Minuten gewonnen⁵¹.

Nach medianer Sternotomie und Herzentnahme wurde der linke Ventrikel für die Messung des regionalen Blutflusses in Ischämie- (RCX-Versorgung) und Nicht-Ischämie-Gebiete (LAD-Versorgung) unterteilt.

Die Messung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Myokardproben basierte auf dem, am ehemaligen Institut für chirurgische Forschung der LMU München, von Raab et al. entwickelten Messprotokoll mittels Sample Processing Unit (SPU). Mit Hilfe der SPU, bestehend aus Filter, Filterhalten und Probengefäß, konnte die Probenverarbeitung (Gewichtbestimmung, Verdaulung, Filtration, Spülung und Farbstoffauslösung) in einem einzigen Gefäß durchgeführt werden⁵². Die Fluoreszenzintensität der verarbeiteten Proben wurde schließlich mittels eines Fluoreszenzspektrometers (Safire 2, TECAN GmbH, Deutschland) bestimmt.

Da die Fluoreszenzintensität in der jeweiligen Myokardprobe proportional zum dort erreichten Blutfluss ist, kann anhand der Dreisatzregel, die regionale Blutperfusion ermittelt.

$$\frac{\text{Regionale Blutperfusion in der Probe}}{\text{Abzugsrate von Referenzprobe}} = \frac{\text{Fluoreszenzintensität in der Probe}}{\text{Fluoreszenzintensität von Referenzprobe}}$$

In unserem Ergebnisteil zeigten wir die regionale Blutperfusion in einem Prozentsatz als ein Verhältnis von Ischämie- zu Nicht-Ischämie-Gebieten.

2.3.6.4 Bestimmung der Kollateralen

Nach Herzentnahme erfolgte eine Koronarangiographie, um die Kollateralbildung im Ischämie-Bereich darzustellen. Hierbei wurde das Kontrastmittel (Imeron 350, Bracco Imaging, Konstanz) über ein Insert einer 7F-Schleuse in die linke Koronararterie unter Durchleuchtung injiziert.

Die Quantifizierung der Kollateralen wurde in Ischämie- und Ischämie-Grenzonen durchgeführt. Zu Kollateralen zählten die Gefäße distal der okkludierten Stelle im Ramus circumflexus, die Anschluss an Ramus interventricularis anterior oder linken Koronararterie hatten.

2.3.7 Immunhistochemische Messung

Für die Analyse des Kapillarwachstums verwendeten wir die Immunfluoreszenzfärbung. Hierbei werden gesuchte Zielstrukturen/Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers markiert. Mit der Applikation eines zweiten Antikörpers, der spezifisch an den ersten spezifischen Antikörper bindet und auch ein fluoreszierendes Molekül trägt, können so die markierten Zielstrukturen/Proteine unter Fluoreszenz-Mikroskop bei entsprechender Wellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden.

2.3.7.1 Anfertigung von Schnittproben

Nach Herzentnahme wurde der linke Ventrikel, von der Herzspitze bis zur Basis in 90°-Winkel zum Ramus interventricularis anterior, in 5 Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden anschließend gemäß standardisierten Schemata, transmural, in 36 Regionen aufgeteilt und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung im Labor aufbewahrt. Für die immunhistochemische Färbung verwendeten wir jeweils zwei Proben von Ischämie- und Nicht-Ischämie-Regionen.

Die Anfertigung der Schnittpräparate erfolgte in einem Kryostat (Leica 3050 S, Leica Biosystems GmbH, Nußloch) bei -20°C Temperatur. Die gefrorenen Myokardproben wurden zunächst mit einem Tissue Tek auf einem Haltestempel fixiert. Danach wurde gleichmäßig ein dünner Schnitt von 5µm angefertigt. Dieser wurde dann auf einen zuvor gekennzeichneten Objektträger (Thermo Scientific Superfrost ® Plus Menzel GmbH & Co KG Braunschweig) aufgetragen. Es wurden mindestens drei Schnittpräparate von jeweils zwei Proben von Ischämie- und Nicht-Ischämie-Regionen für die immunhistologische Bestimmung angefertigt.

2.3.7.2 Bestimmung des Kapillarwachstums

In unserem Versuch führten wir eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung (PECAM-1- und NG2-Antikörper) durch, um das Kapillarwachstum zu analysieren. Als Marker für die Endothelzellen verwendeten wir die PECAM-1-Antikörper und für die Perizyten, NG-2-Antikörper.

Färbeverfahren:

Schritt 1: Fixierung

- Als erster Schritt wurden die angefertigten Schnittpräparate auf dem Objektträger für 15 Minuten in 4°C kaltem Aceton (Merck, Whitehouse Station, USA) fixiert.
- Es folgte dreimal 5-minütige Waschvorgänge mit PBS-Lösung
- Die Schnittpräparate auf dem Objektträger wurden anschließend mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako, Hamburg) umrandet, damit die später auf den Objektträger zu

applizierenden Lösungen nicht auslaufen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass während des gesamten Färbeverfahrens die Schnittproben feucht gehalten oder mit Flüssigkeit bedeckt blieben, um Hintergrundfluoreszenz zu minimieren.

Schritt 2: Blockieren

- Um unspezifische Antikörperbindung und Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren, erfolgte eine einstündige Inkubation einer Blocking-Lösung aus 2%BSA (BSA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 0.2% Tween 20 (Tween 20, Sigma-Aldrich, Taufkirchen), beides wurden in PBS gelöst.
- Danach folgten wieder dreimal 5-minütige Waschvorgänge mit PBS-Lösung

Schritt 3: Inkubation der ersten primären Antikörper

- Nun erfolgte die Inkubation der PECAM-1-Antikörper (PECAM-1 (M-20): sc-1506, polyklonales goat-IgG, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) über Nacht bei 4°C Temperatur. Die Antikörper wurden zuvor 1:100 mit einem Verdünnungsmittel (Antibody diluent, Dako GmbH, Hamburg) verdünnt und auf die Gewebeschnitte pipettiert. Die lange Inkubationszeit der primären Antikörper erlaubt generell mehr Zeit für eine möglichst gesättigte Antikörperbindung an die Zielstruktur.
- Am folgenden Tag folgten erneut dreimal 5-minütige Waschvorgänge mit PBS-Lösung, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.

Schritt 4: Inkubation der ersten sekundären Antikörper

- Danach erfolgte die Inkubation der rot-fluoreszierenden sekundären Antikörper (anti-goat IgG-R: sc-2094, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA), die zuvor 1:100 verdünnt wurde. Die Inkubationszeit betrug mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die nächsten Schritte sollten möglichst in einem abgedunkelten Raum erfolgen, um eine Photobleichung bzw. Verlust der Fluoreszenz-Kraft der sekundären Antikörper durch Bestrahlung von Umgebungslicht zu vermeiden.
- Es folgten wieder die dreimal 5-minütigen Waschvorgänge mit PBS-Lösung.

Schritt 5: Inkubation der zweiten primären und sekundären Antikörper

- Nun wurden die zweiten primären Antikörper (Anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan Antibody: AB5320, polyklonales Rabbit-IgG, Millipore, Massachusetts, USA) in 1:250 Verdünnung auf die Gewebeschnitte pipettiert und

über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimal 5-minütigen Waschvorgängen mit PBS-Lösung folgte die Inkubation der zweiten grün-fluoreszierenden sekundären Antikörper (anti-rabbit IgG: sc2365, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) für mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden wieder dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Schritt 6: Gegenfärbung mit DAPI

- Als Gegenfärbung von Zellkernen wurden 1-2 Tropfen blau-fluoreszierendes DAPI (Vectashield Mounting Media with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf die Schnittproben pipettiert und mit einem Deckglas versehen.

Auswertung:

Die Betrachtung der immunhistochemischen Färbung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskops (Axioskop-2-Mikroskop, Zeiss, Oberkochen). Hierbei wurden mindestens fünf zufällige Bilder pro Schnittprobe für jeweils rote, grüne und blaue Fluoreszenz mit Hilfe der an dem Mikroskop montierten Kamera (AxioCam, Zeiss, Oberkochen) aufgenommen. Die Anzahl von Endothel-Zellen und Perizyten wurde anhand des Mittelwerts von fünf verschiedenen Bildern pro Probe in 40-facher Vergrößerung (high-power field magnification/ hp) ermittelt.

2.4 Statistische Datenanalyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (standard error of the mean/ SEM) angegeben. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen den Gruppen wurden ungepaarter t-Test, Bonferroni-Test und ANOVA-Analyse sowie Multivariatanalyse verwendet. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Normocholesterinämie Gruppe

3.1.1 Transduktionseffizienz

Die Transduktionseffizienz der rAAV.T β 4-Gruppe in der RT-PCR-Analyse war vergleichbar mit der von der T β 4.tg-Gruppe und signifikant hoch verglichen mit der von der LacZ-Kontroll-Gruppe.

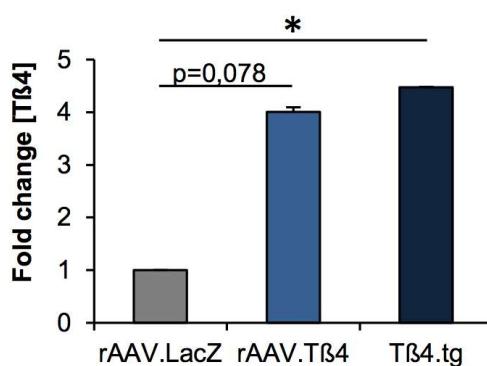


Abb. 3: RT-PCR-Nachweis des Thymosin β 4 in der rAAV.T β 4-Gruppe und T β 4.tg-Gruppe war um ca. vierfacher höher als in der Kontrollgruppe (Mittelwert \pm SEM, * p <0,05)⁴¹.

3.1.2 Mikrozirkulation

Die Angiogenese konnte durch die T β 4-Überexpression gesteigert werden. Die Anzahl der Kapillaren war in der rAAV.T β 4-Gruppe signifikant höher verglichen mit der von der Kontrollgruppe ($278,1 \pm 6,2$ vs. $148,6 \pm 6,5$ PECAM-1-positive Zellen in 40-facher Vergrößerung pro Bild). Auch die Anzahl der Perizyten war signifikant höher nach regionaler Applikation der rAAV.T β 4 im Vergleich zu der von der Kontrollgruppe ($280,6 \pm 9,4$ vs. $133,5 \pm 4,0$ NG-2-positive Zellen in 40-facher Vergrößerung pro Bild). Die Erhöhung der Kapillaren und Perizyten konnte in der transgenen Gruppe ebenfalls nachgewiesen werden ($256,0 \pm 8,1$ PECAM-1-positive Zellen und $240,1 \pm 6,9$ NG-2-positive Zellen in 40-facher Vergrößerung pro Bild).

3.1.2.1 Angiogenese

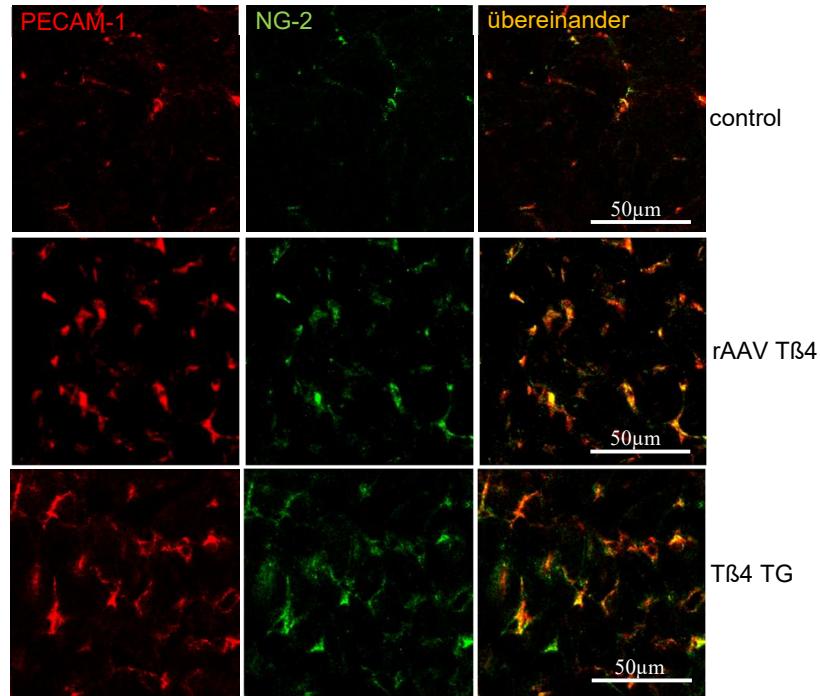


Abb. 4: Beispielhafte Bilder von der Immunfluoreszenzfärbung. Rot sind die PECAM-1-positive Zelle, grün sind die NG-2-positive Zellen.

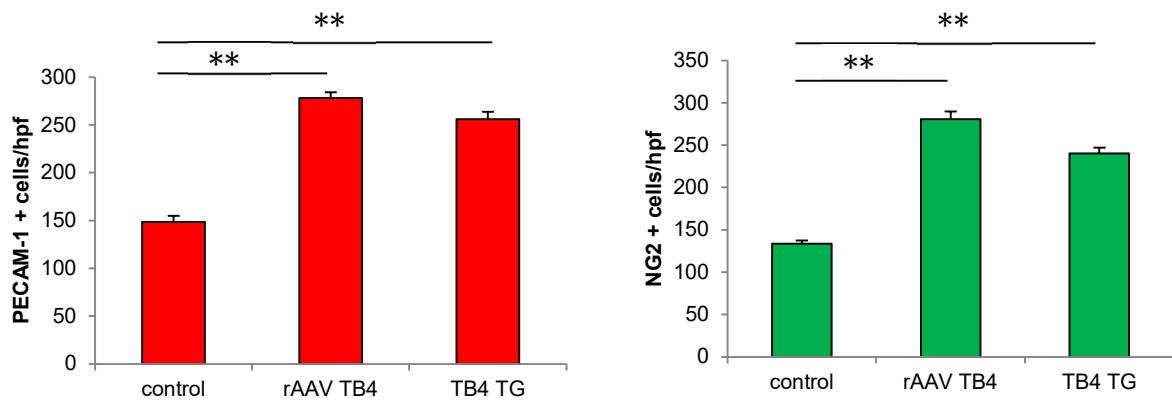


Abb. 5: Quantifizierung der PECAM-1- und NG-2-positive-Zellen (Mittelwert \pm SEM; **p<0,05)

3.1.3 Makrozirkulation

Die postmortem-Angiographie zeigte eine signifikant gesteigerte Kollateralbildung im Ischämie-Gebiet des Ramus circumflexus bei den transgenen Tieren mit ubiquitärer Expression des Thymosin β 4 ($8,0 \pm 1,0$ vs. $2,7 \pm 0,5$ Kollateralgefäße mit Anschluss an das Gefäß distal der okkludierten Stelle in der Kontrollgruppe). Diese gesteigerte Kollateralisierung konnte auch durch die Transduktion von rAAV.T β 4 erreicht werden ($8,5 \pm 0,56$ Kollateralgefäße mit Anschluss an das Gefäß distal der okkludierten Stelle).

3.1.3.1 Arteriogenese

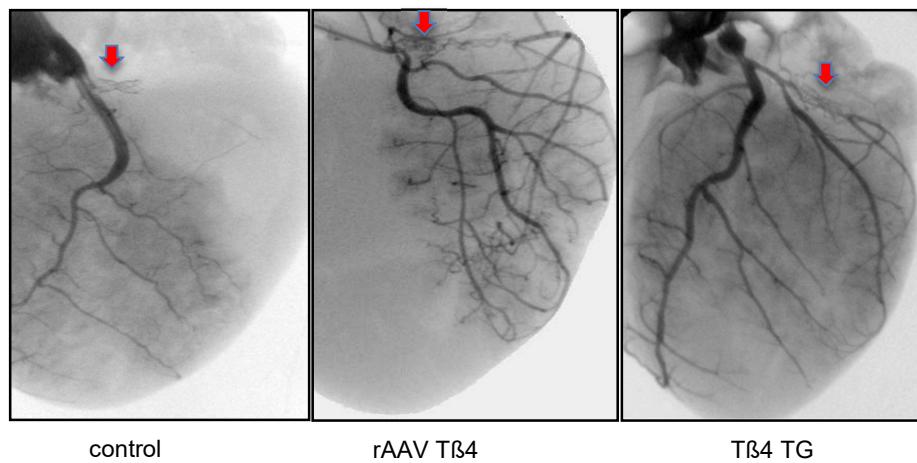


Abb. 6: Beispielhaftes Angiogramm der linken Koronararterie im Rahmen der postmortem-Angiographie. Der rote Pfeil zeigt den implantierten Reduktionsstent.

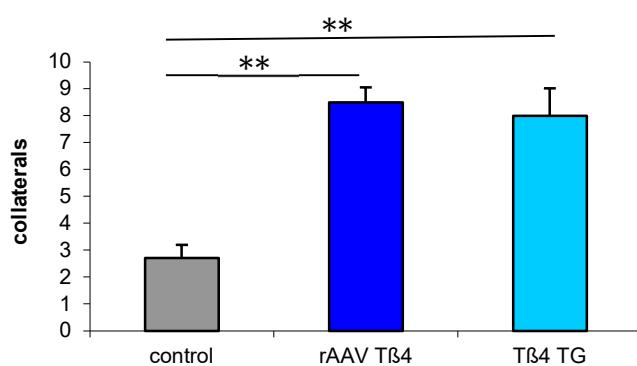


Abb. 7: Die Quantifizierung der Kollateralgefäße mit Anschluss an das Gefäß distal der okkludierten Stelle (Mittelwert \pm SEM; **p<0,05)

3.1.4 Regionale Myokardfunktion

Die regionale Myokardfunktion in Ruhe, gemessen an der subendokardialen Segmentverkürzung (SES), zeigte sich in allen Gruppen erniedrigt. Die SES konnte jedoch in der rAAV-T β 4-Gruppe und T β 4-TG-Gruppe unter hoher Herzfrequenzstimulation im Gegensatz zur Kontrollgruppe deutlich gesteigert werden ($76,1 \pm 2,8$ in der rAAV.T β 4-Gruppe, $75,7 \pm 9,0$ in der T β 4 TG-Gruppe vs. $9,4 \pm 6$ in der Kontrollgruppe).

3.1.4.1 Subendokardiale Segmentverkürzung (SES)

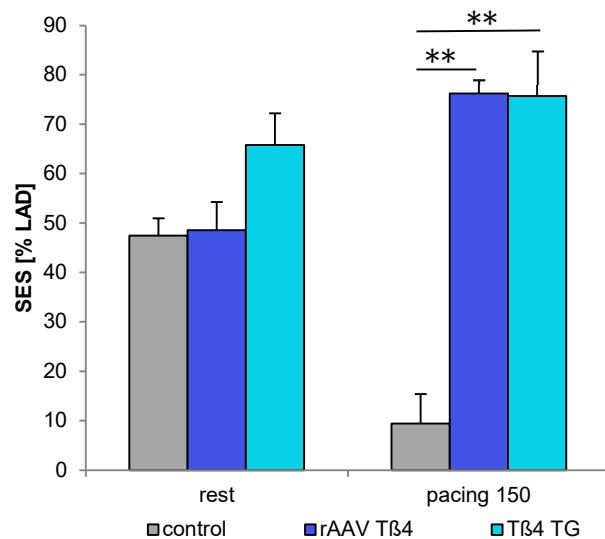


Abb. 8: Subendokardiale Segmentverkürzung (SES) des Ischämie-Gebietes in prozentualer Relation zu Nicht-Ischämie-Gebiet des Ramus interventricularis anterior (Mittelwert \pm SEM; **p<0,05)

3.1.4.2 Myokardperfusion

Die Myokardperfusionsbestimmung mittels Mikrosphären zeigte bereits in Ruhe-Messung eine signifikant bessere Perfusion in rAAV.T β 4- und T β 4.TG-Gruppe im Vergleich zu den Werten in der Kontrollgruppe ($91,2 \pm 5,5$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der rAAV.T β 4-Gruppe, $85,7 \pm 3,8$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der T β 4 TG-Gruppe vs. $66,8 \pm 2,6$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der Kontrollgruppe), welche unter Belastung/ atrialer Stimulation um 130/Minute noch mal gesteigert werden konnte ($124,0 \pm 8,8$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der rAAV.T β 4-Gruppe, $145,2 \pm 11,4$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der T β 4 TG-Gruppe vs. $74,73 \pm 3,1$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der Kontrollgruppe).

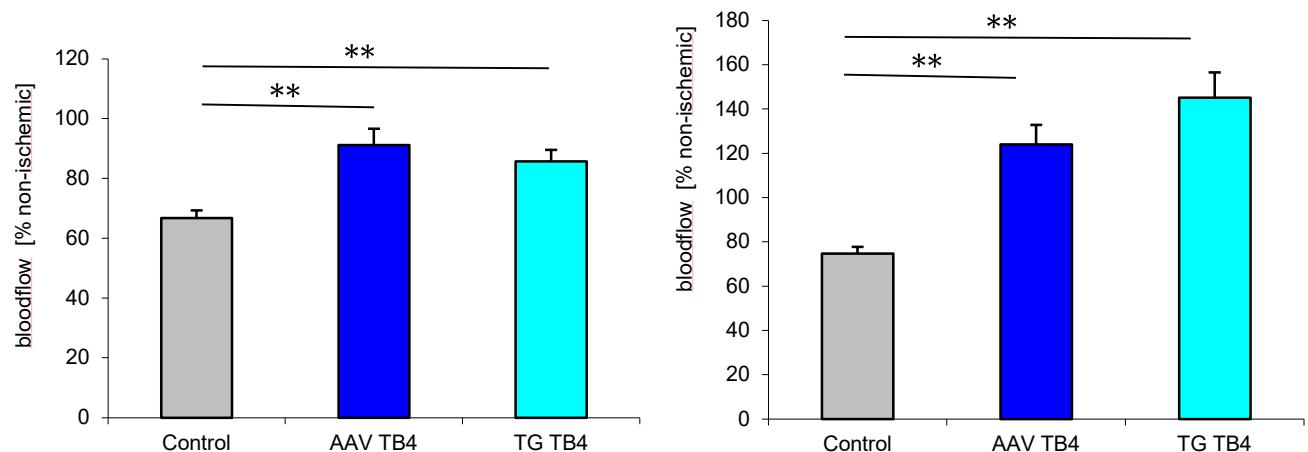


Abb. 9: Myokardperfusionsbestimmung mittels Mikrosphären (Mittelwert \pm SEM; **p<0,05), links: Messung unter Ruhe-Bedingungen (Herzfrequenz um 80/Minute), rechts: Messung unter Belastung (atriale Stimulation um 130/Minute)

3.1.5 Globale Myokardfunktion

Nach der Ischämie-Induktion zeigte sich am Tag 28 in der Kontroll- und in der rAAV.T β 4-Gruppe eine reduzierte globale Myokardfunktion. Hierbei waren die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) erniedrigt und der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP) erhöht. Nach Transduktion von rAAV.T β 4 konnte am Tag 56 die EF signifikant verbessert werden ($45,2 \pm 1,8$ % vs. $25,1 \pm 3,4$ % in der Kontroll-Gruppe), auch der LVEDP fiel signifikant ab ($11,95 \pm 1,2$ mmHg vs. $19,3 \pm 1,2$ mmHg in der Kontroll-Gruppe).

Die globale Myokardfunktion zeigte sich in der transgenen T β 4-Gruppe über die gesamte Versuchsdauer erhalten (EF $44,6 \pm 1,3$ %; LVEDP $13,5 \pm 0,6$ mmHg).

3.1.5.1 Ejektionsfraktion (EF)

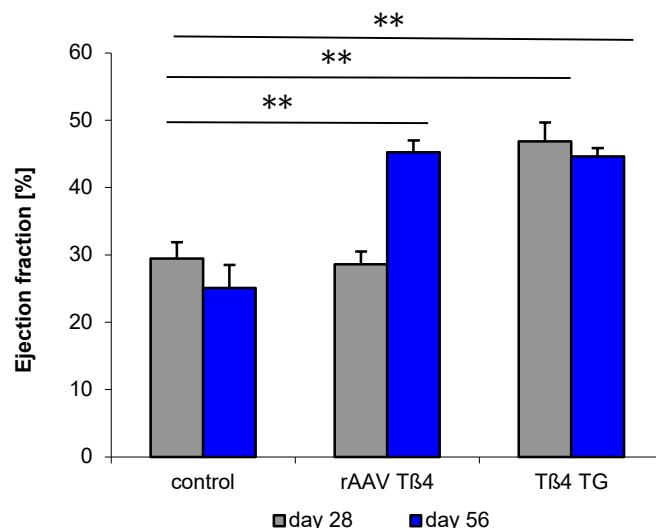


Abb. 10: Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion am Tag 28 und Tag 56 nach der Ischämie-Induktion (Mittelwert in \pm SEM; **p<0,05)

3.1.5.2 LVEDP

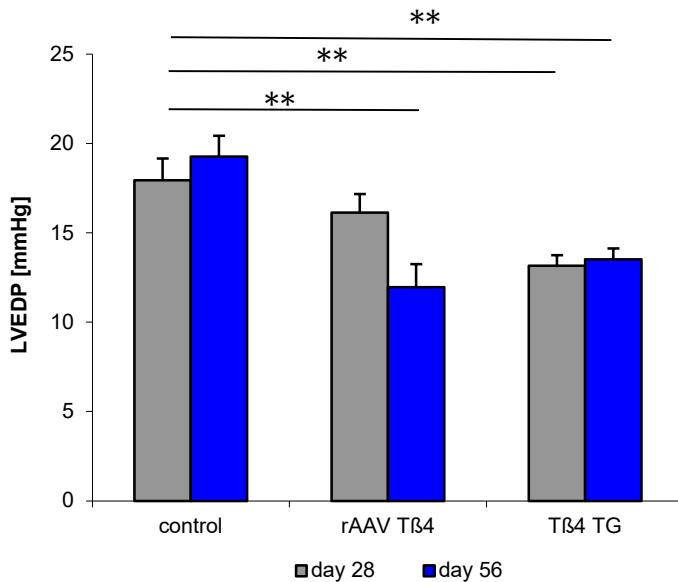


Abb. 11: Der linksventrikuläre enddiastolische Druck am Tag 28 und Tag 56 nach der Ischämie-Induktion (Mittelwert \pm SEM; **p<0,05)

3.1.6 Sequenzielle Überexpression des Tβ4 mit Hilfe des Tet-Off-Systems

Durch die Verabreichung von Doxycyclin am Tag 35, Tag 42 und Tag 49 für jeweils 5 Tage wurde die Tβ4-Überexpression unterdrückt. Die sequenzielle Überexpression von Thymosin β4 fand zwei Tage pro Woche bis zum Versuchsende statt.

Auch in dieser Gruppe konnte eine vergleichbare Steigerung der Mikro- und Makrozirkulation wie in der rAAV-Tβ4-Gruppe erreicht werden. Die Quantifizierung der PECAM-1- und NG-2-positiven Zellen sowie der Kollateralen in der rAAV.tet-off.Tβ4-Gruppe konnte eine statistische Signifikanz, verglichen mit den Werten der Kontroll-Gruppe, zeigen (PECAM-1-positive Zellen $245,1 \pm 26,4$; NG-2-positive Zellen $238,2 \pm 27,4$; Kollateralgefäß mit Anschluss an das Gefäß distal der okklidierten Stelle $6,0 \pm 0,5$).

Die Analyse der regionalen Myokardfunktion zeigte ebenfalls einen vergleichbaren positiven Effekt der sequenziellen Tβ4-Überexpression wie schon in der rAAV.Tβ4-Gruppe unter höherer Herzfrequenzstimulation (SES bei HF 150/Minute $57,0 \pm 5,3$ % von nicht-ischämie-Gebiet).

Die Messwerte der globalen Myokardfunktion blieben wie in der rAAV.Tβ4-Gruppe unter sequenzieller Tβ4-Überexpression signifikant höher im Vergleich zu den Werten der Kontroll-Gruppe (EF $40,5 \pm 1,9$ %, LVEDP $12,5 \pm 1,5$ mmHg).

3.1.6.1 Mikro- und Makrozirkulation

3.1.6.1.1 Angiogenese

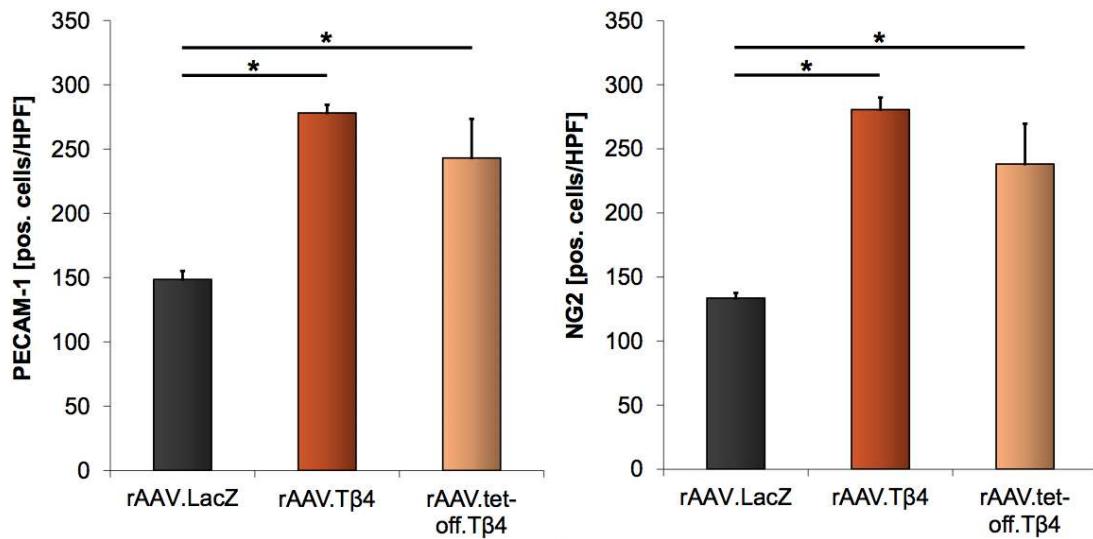


Abb. 12: Quantifizierung der PECAM-1- und NG-2- positiven Zellen (Mittelwert \pm SEM; *p<0,05)⁵⁴

3.1.6.1.2 Arteriogenese

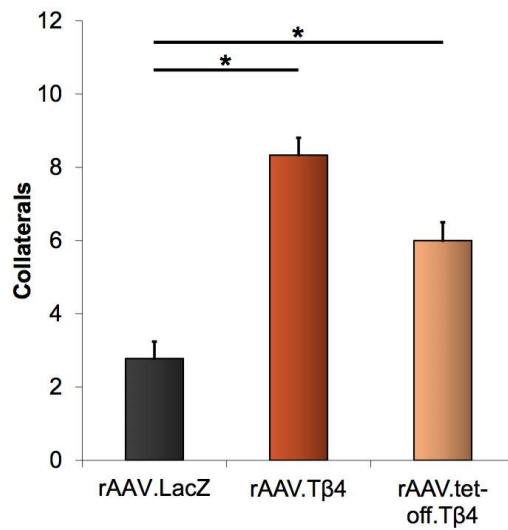


Abb. 13: Bestimmung der Kollateralgefäße mit Anschluss an das Gefäß distal der okkludierten Stelle im Ischämie-Gebiet (Mittelwert \pm SEM; *p<0,05)⁵⁴

3.1.6.2 Regionale und globale Myokardfunktion

3.1.6.2.1 Subendokardiale Segmentverkürzung (SES)

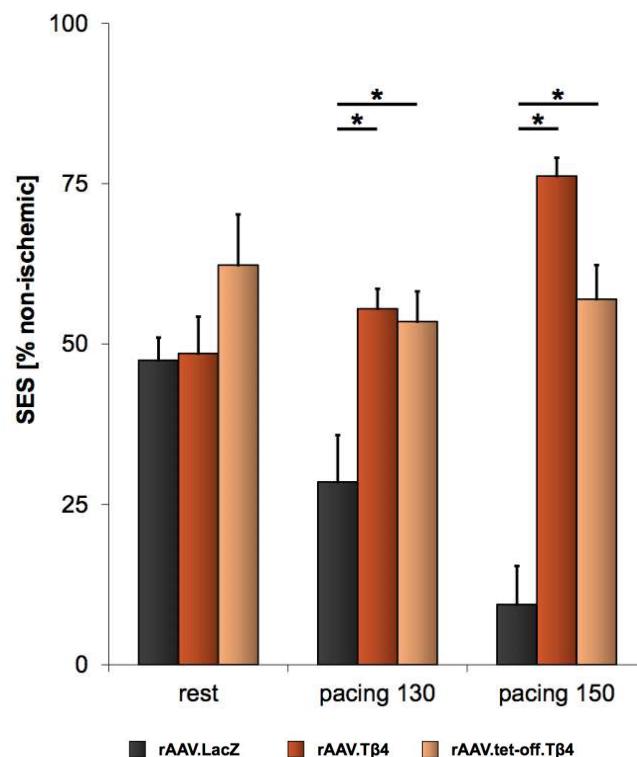


Abb. 14: Subendokardiale Segmentverkürzung des Ischämie-Gebiet des Ramus circumflexus in prozentualer Relation zu Nicht-Ischämie-Gebieten des Ramus interventricularis anterior (Mittelwert in \pm SEM; $*p<0,05$)⁵⁴

3.1.6.2.2 Ejektionsfraktion (EF) und linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP)

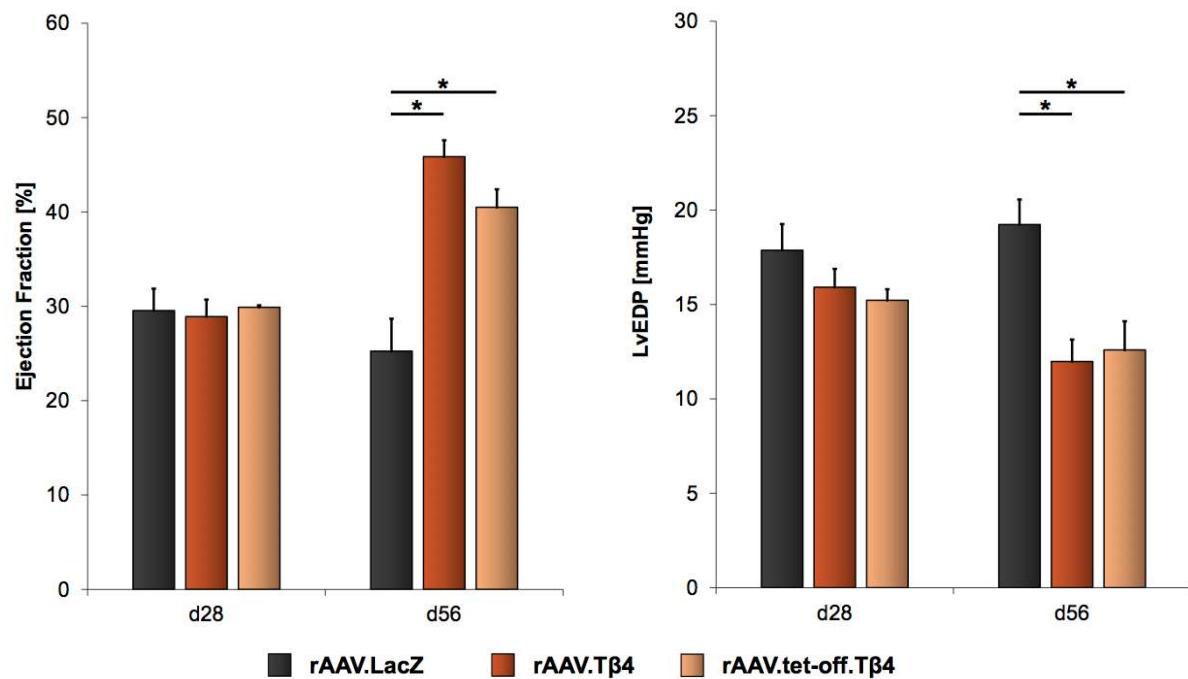


Abb. 15: Ejektionsfraktion und linksventrikulärer Druck am Tag 28 und Tag 56 (Mittelwert \pm SEM; *p<0,05)⁵⁴

3.2 Hypercholesterinämie Gruppe

Die fettreiche Fütterung über die gesamte Versuchsdauer führte zur signifikanten Erhöhung von Triglyceriden und Cholesterin, wohin gegen die Insulin- und Glukosespiegel unverändert blieben. Der Triglycerid- und Cholesterin-Spiegel der hypercholesterinämischen Gruppe lagen bei $72,0 \pm 3,4$ mg/dl und $90,6 \pm 2,2$ mg/dl vs. $21,8 \pm 2,7$ mg/dl und $78,0 \pm 1,3$ mg/dl in der normocholesterinämischen Gruppe. Die Insulin- und Glukose-Spiegel der hypercholesterinämischen Gruppe lagen bei $5,3 \pm 1,0$ μ U/ml und $115 \pm 10,2$ mg/dl vs. $7,1 \pm 1,4$ μ U/ml und $104,7 \pm 3,1$ mg/dl in der normocholesterinämischen Gruppe.

3.2.1 Laborwerte

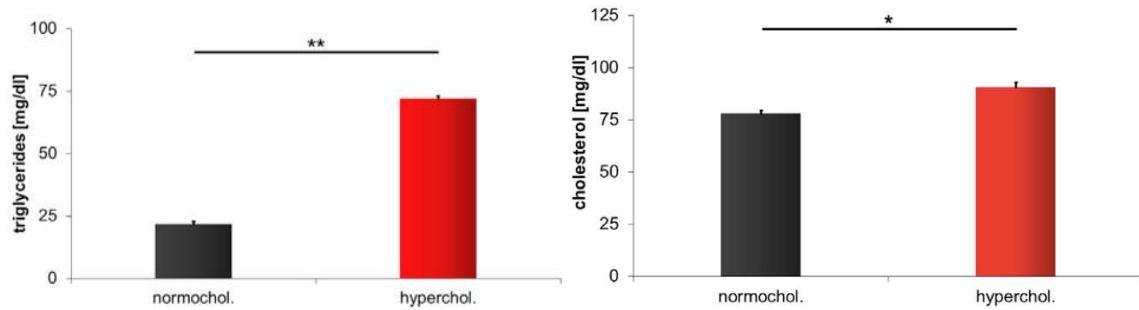


Abb. 16: Serumspiegel der Triglyceriden und Cholesterin (Mittelwert \pm SEM; * $p<0,05$ und ** $p<0,001$)⁵⁵

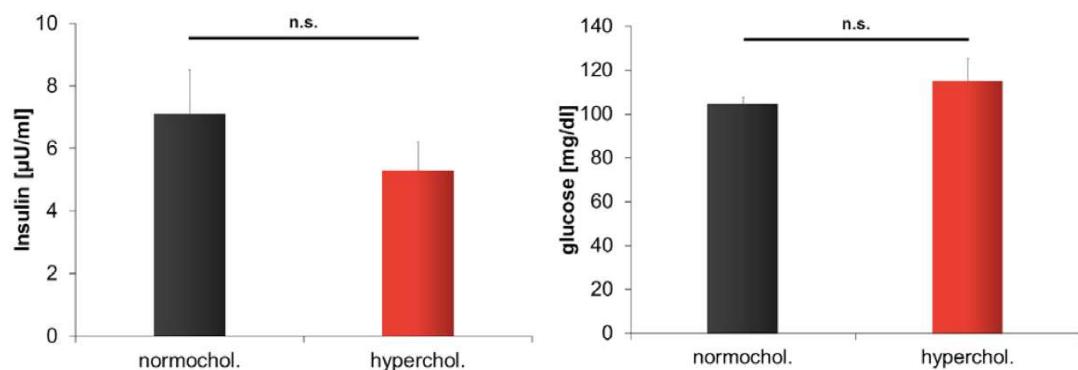


Abb. 17: Serumspiegel von Insulin und Glukose (n.s.: nicht signifikant)⁵⁵

3.2.2 Mikro- und Makrozirkulation

Die Hypercholesterinämie führte in der Kontrollgruppe zur signifikanten Kapillar-Rarefizierung im Vergleich zur normocholesterinämen Gruppe. Die Kapillarisierung konnte jedoch durch die T β 4-Überexpression signifikant gesteigert werden, auch wenn dies im Vergleich zur normocholesterinämen Gruppe auf niedrigem Niveau stattfand ($113,3 \pm 4,5$ PECAM-1-positive Zellen in der hypercholesterinämen rAAV.T β 4-Gruppe vs. $61,1 \pm 1,9$ PECAM-1-positive Zellen in der hypercholesterinämen Kontroll-Gruppe).

Die Kollateralisierung in der Kontroll-Gruppe der Normo- und Hypercholesterämie unterschied sich von einander nicht signifikant. Durch die Applikation der rAAV.T β 4 in der hypercholesterinämen Gruppe konnte jedoch eine signifikant erhöhte Kollateralisierung im Ischämie-Gebiet induziert werden ($6,0 \pm 0,4$ Kollateralgefäß mit Anschluss an das Gefäß distal der okklidierten Stelle in der hypercholesterinämen rAAV.T β 4-Gruppe vs. $3,0 \pm 0,3$ Kollateralgefäß mit Anschluss an das Gefäß distal der okklidierten Stelle in der hypercholesterinämen Kontroll-Gruppe).

3.2.2.1 Angio- und Arteriogenese

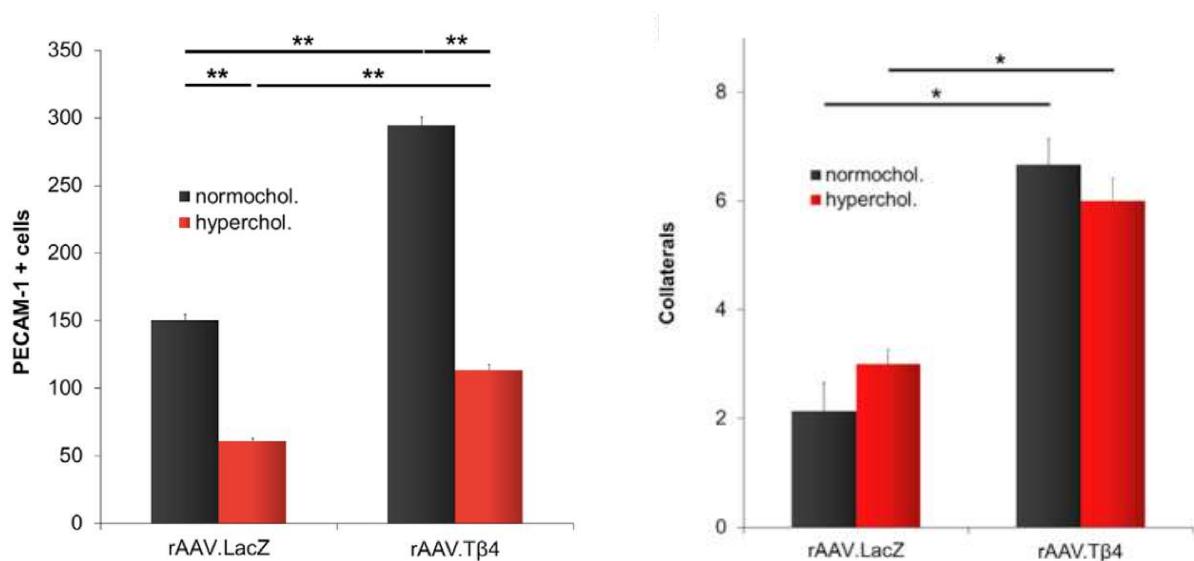


Abb. 18: Quantifizierung der PECAM-1-positive Zellen und Kollateralgefäß mit Anschluss an das Gefäß distal der okklidierten Stelle (Mittelwert \pm SEM; *p<0,05 und **p<0,001)⁵⁵

3.2.3 Regionale und globale Myokardfunktion

In der hypercholesterinämen rAAV.T β 4-Gruppe zeigte sich eine deutliche Steigerung der regionalen Myokardfunktion unter Belastung bei atrialer Stimulation von 150/Minute (SES $54,4 \pm 9,2$ % von nicht-ischämie-Gebiet vs. $25,3 \pm 4,2$ % von nicht-ischämie-Gebiet in der Kontroll-Gruppe).

Auch die globale Myokardfunktion in der rAAV.T β 4-Gruppe wurde verbessert. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion zeigte sich nach der T β 4-Transduktion signifikant höher (EF $40,7 \pm 2,6$ % vs. $25,7 \pm 2,5$ % in der Kontroll-Gruppe), der linksventrikuläre enddiastolische Druck fiel signifikant ab (LVEDP $13,86 \pm 0,7$ mmHg vs. $17,7 \pm 1,1$ mmHg in der Kontroll-Gruppe).

3.2.3.1 Subendokardiale Segmentverkürzung (SES)

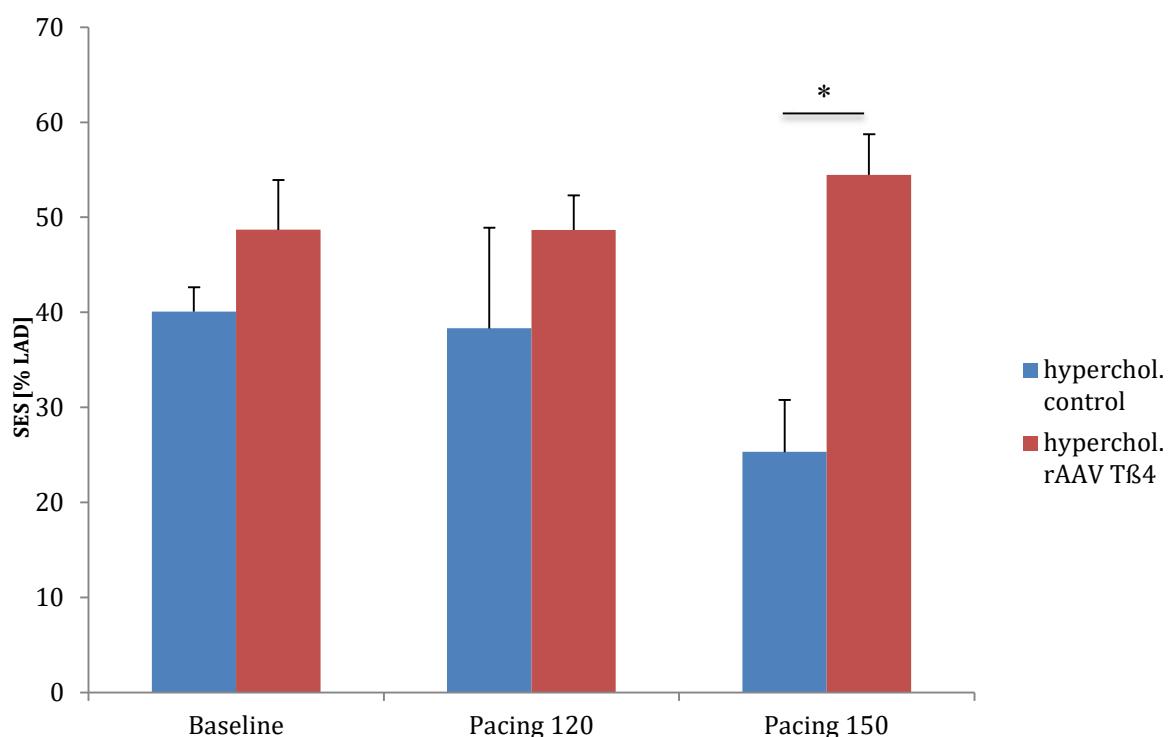


Abb. 19: Die subendokardiale Segmentverkürzung in Ruhe und unter Belastung bei atrialer Stimulation um 120/Minute und 150/Minute (Mittelwert \pm SEM; *p<0,05)

3.2.3.2 Ejektionsfraktion (EF) und enddiastolischer linksventrikulärer Druck (LVEDP)

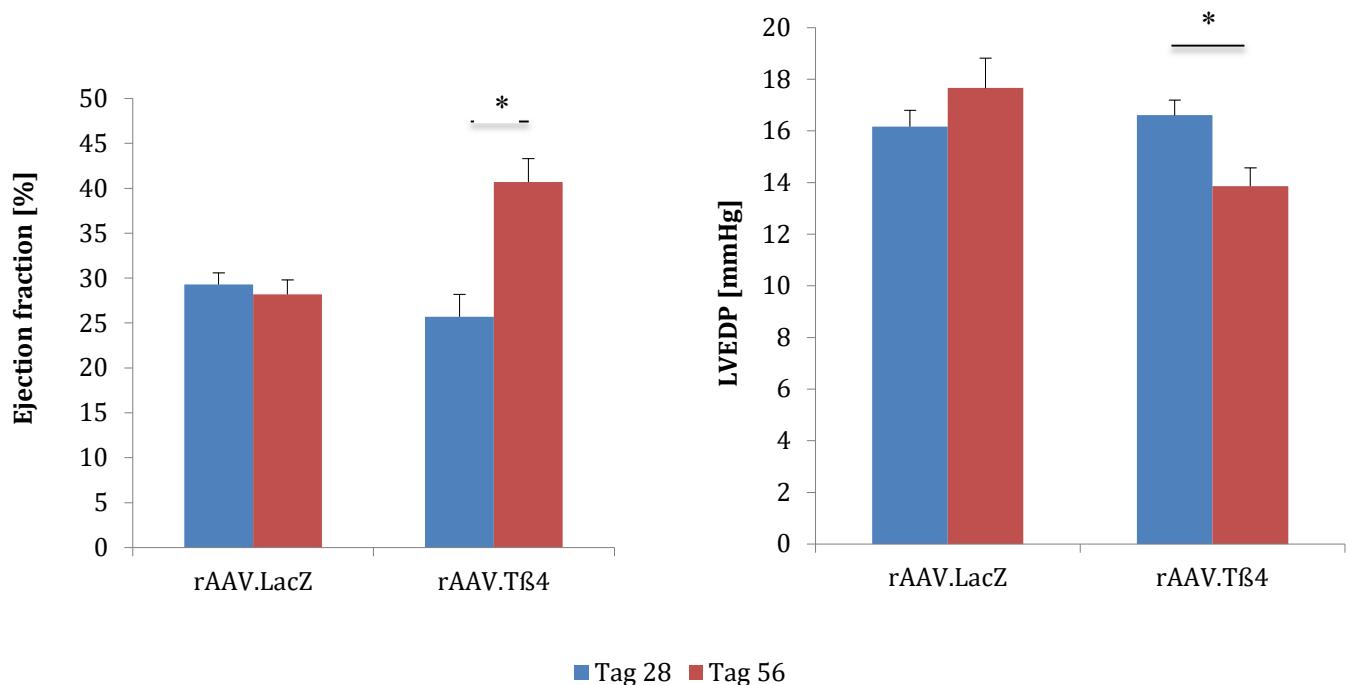


Abb. 20: Ejektionsfraktion und linksventrikulärer enddiastolischer Druck (Mittelwert \pm SEM; *p<0,05)

4 Diskussion

4.1 Chronisches Myokardischämie-Modell

Durch die Implantation des Reduktionsstents im Ramus circumflexus konnten wir eine chronische Myokardischämie erfolgreich induzieren. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Störung der Mikro- und Makrozirkulation, welche auch die Abnahme der regionalen und globalen Myokardfunktion widerspiegelte.

4.2 Neovaskularisierung durch transgene Expression von T β 4 und regionale rAAV-vermittelte T β 4-Überexpression

Durch die ubiquitäre und von Anfang an kontinuierliche T β 4-Expression bei den transgenen Tieren wurde der Ischämie-Einfluss in unserem chronischen Myokardischämie-Modell verringert. In diesem Fall wirkte die transgene T β 4-Expression bereits kardioprotektiv und war in der Lage, die induzierte Ischämie zu minimieren.

Die regionale rAAV-vermittelte T β 4-Überexpression konnte zum einen eine hohe vergleichbare Transduktionseffizienz des Thymosin β 4 wie die der transgenen Gruppe erzielen, zum anderen aber auch eine kardioprotektive Wirkung des Thymosin β 4 nach der induzierten Ischämie zeigen.

Die Mikrozirkulation zeigte sich durch die regionale T β 4-Überexpression deutlich gebessert. Die Dichte an Kapillaren war in den Ischämie-Gebieten signifikant höher in der rAAV-T β 4-Gruppe im Vergleich zu der von der Kontroll-Gruppe. Nicht nur die Anzahl an Endothelzellen konnte signifikant gesteigert werden, auch die Anzahl an Perizyten als Marker für eine Gefäßreifung war in der rAAV-T β 4-Gruppe signifikant höher.

Die hier so verbesserte Mikrozirkulation korrelierte mit einer signifikanten Kollateralbildung in den Ischämie-Gebieten. Somit konnte das Thymosin β 4 in Ischämie-Gebieten eine Neovaskularisierung erfolgreich induzieren. Dies führte wiederum zur signifikanten Zunahme der Myokardperfusion und -Funktion in der rAAV-T β 4-Gruppe.

4.3 Sequenzielle Überexpression durch rAAV.tet-off.T β 4

Das in unserem Versuch verwendete Tet-off-System erlaubte uns, die Genexpression des T β 4 unter Doxycyclin-Einfluss zu regulieren.

Die so steuerbare Genüberexpression ist wichtig, um den gewünschten therapeutischen Effekt des Thymosin β 4 in einem bestimmten Versuchszeitraum zu kontrollieren bzw. im Bedarfsfall zu limitieren. Denn nicht immer ist eine kontinuierliche Gen-Überexpression gewünscht,

welche bei den pro-angiogenetischen Faktoren wie z. B. vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren auch eine unerwünschte Nebenwirkung wie ein Tumorwachstum begünstigen kann⁵⁶.

Durch die Gabe von Doxycyclin am Tag 35, Tag 42 und Tag 49 für jeweils 5 Tage wurde in unserem Versuchsmodell eine Herabregulierung des Thymosin β 4 erzielt. Somit wurde eine sequenzielle Überexpressionsdauer von lediglich zwei Tagen in der Woche bis zum Versuchsende erreicht.

Auch hier zeigte die sequenzielle Überexpression des Thymosin β 4 gegenüber einer kontinuierlichen Überexpression eine vergleichbare kardioprotektive Wirkung sowohl auf die Neovaskularisierung als auch auf die Myokardfunktion.

Dieser positive Befund zeigte das kardioprotektive Potential von Thymosin β 4, welches auch im Rahmen einer temporären Überexpression erhalten blieb. Die so regulierbare Gen-Überexpression wird allerdings aufgrund der immunologischen Wirkung des Tet-Systems bei Menschen nicht zur Anwendung kommen, da dies aus Bakterien stammt. Im Rahmen einer translationalen Forschung bei Menschen wäre dann z. B. eine repetitive Gabe von Thymosin β 4 als Peptid denkbar, um die kardioprotektive Wirkung von Thymosin β 4 gezielt einzusetzen.

4.4 Hypercholesterinämie als zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktor

Im klinischen Alltag entwickeln Patient*innen mit schlecht eingestellten kardiovaskulären Risikofaktoren häufig eine koronare Herzerkrankung. Zu den bekannten Risikofaktoren zählen z. B. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Rauchen.

Präklinische Forschungsergebnisse lassen sich generell in den klinischen Alltag schlecht übertragen, da es in der Regel in präklinischen Tiermodellen mit jungen gesunden Tieren gearbeitet wird. Somit ist der Einfluss der kardiovaskulären Risikofaktoren von großer Bedeutung.

In wieweit unser transgen-Expressionsniveau, Aufnahme des Vektors und Veränderung des Myokards aufgrund des vorhandenen kardiovaskulären Risikofaktors hiermit beeinflusst werden, müssen untersucht werden. Auch das therapeutische Fenster bei einer Ischämie, das noch erreicht werden kann, muss untersucht werden.

In unserem Versuchsmodell mit der hypercholesterinämen Diät konnten wir das chronische Myokardischämie-Modell um einen Risikofaktor ausbauen.

Die fettreiche Diät führte zur signifikanten Serumspiegel-Erhöhung von Triglyceriden sowie

Cholesterin.

Dieser wichtige zusätzliche kardiovaskuläre Risikofaktor nahm einen negativen Einfluß auf die Mikrozirkulation mit deutlicher Rarefizierung der Kapillaren.

Die regionale und kontinuierliche Überexpression von Thymosin β 4 konnte dennoch eine signifikante Verbesserung der Mikrozirkulation erzielen, auch wenn dies im Vergleich zur normocholesterinämen Gruppe niedriger ausfiel.

Die Makrozirkulation/ die Kollateralbildung konnte durch die Überexpression des Thymosin β 4 trotz der fettreichen Fütterung positiv beeinflusst werden. Hierbei ist jedoch erwähnenswert, dass es bezüglich der Kollateralbildung nach der Ischämie-Induktion sowohl in der Kontrollgruppe der Normo- und Hypercholesterinämie-Diät kein signifikanter Unterschied fand.

Die positive Wirkung der T β 4-Überexpression auf die regionale Myokardfunktion zeigte sich unter Einflussnahme der fettreichen Diät erst bei höherer Herzfrequenz-Stimulation. Somit konnte das Thymosin β 4 die funktionelle Reserve der Myokardkontraktilität wie schon in der Gruppe der Normocholesterinämie-Diät aufrechterhalten.

Die Abnahme der globalen Myokardfunktion nach der Ischämie-Induktion in unserem chronischen Myokardischämie-Modell war sowohl in der Kontroll-Gruppe der Normo- und Hypercholesterinämie-Diät vergleichbar. Die fettreiche Fütterung hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die bereits reduzierte Myokardfunktion, die Ausgangswerte der globalen Myokardfunktion waren nämlich nach der induzierten Ischämie vergleichbar. Hier ist die relativ kurze Versuchsdauer mit der fettreichen Diät ein limitierender Faktor für die Manifestation einer globalen Myokardfunktionsstörung, die vermutlich erst im fortgeschrittenen Verlauf auftritt.

Durch die rAAV-vermittelte T β 4-Überexpression in der hypercholesterinämen Gruppe konnten wir jedoch eine signifikant verbesserte Myokardfunktion feststellen. Dies unterstreicht nochmal das kardioprotektive Potential des Thymosin β 4, auch in Anwesenheit eines zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktors wie Hypercholesterinämie.

4.5 Applikationswege

Wir entschieden uns in unserem Versuchsmodell für den Applikationsweg des viralen Vektors mittel druck-regulierter Retroinfusionsverfahren über die Koronarvene, da dies in früheren klinischen Arbeiten mit Patient*innen, die perkutane Koronarangioplastien erhielten, sicher durchgeführt werden konnte. Auch ein selektiver Zugang zu verschiedenen Myokardgebieten

war hiermit möglich^{39,44}, da bei einer relevanten Ischämie die antegrade Applikation durch die Koronarokklusion oder reduzierten antegradien Fluss bei hochgradiger Stenosierung signifikant beeinträchtigt wäre. Dennoch ist eine retrograde Applikation in der breiten Umsetzung wahrscheinlich schwierig, da dies im klinischen Alltag kaum verwendet wird.

Klinisch liefen bereits mehrere Gentherapien mittels rekombinater Adeno-assoziierter Viren (rAAV) am menschlichen Herzen. Ein Beispiel davon und erwähnenswert war der CUPID-Trial (Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy In Cardiac Disease).

Verwendet wurde dabei der rAAV/SERCA2a, welcher intrakoronal appliziert wurde und die herabregulierte Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase bei Patient*innen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz erhöhen soll.

Im Rahmen des CUPID 1-Trials konnten erfolgsversprechende Ergebnisse erzielt werden, nämlich die transgene Erhöhung des SERCA2a-Proteins, Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion, bis hin zur Mortalitätsreduktion bei den Patient*innen in der hohen Dosis-Gruppe des rAAV/SERCA2a⁵⁷.

In dem nachfolgenden, multinationalen, placebo-kontrollierten, randomisierten, CUPID 2-Trial mit 250 Patient*innen⁵⁸, konnten jedoch der primäre klinische Endpunkt mit Rehospitalisierung aufgrund der kardialen Dekompensation und sekundäre Endpunkte wie Tod jeglicher Ursache, Herztransplantation und Implantation von mechanischer Kreislaufunterstützung nicht erreicht werden.

Obwohl das Ergebnis des CUPID 2-Trials negativ ausfiel, war dies eine der größten klinisch durchgeführten Genetherapie-Studien mit Herzinsuffizienz. Bisherigen Erkenntnissen zufolge, wurde im Rahmen der Studien kein relevantes Sicherheitsproblem beobachtet.

Somit legten die Studien den ersten entscheidenden Schritt in Richtung der klinischen Gentherapie.

5 Zusammenfassung

In unserem Versuch konnten wir zeigen, dass eine rAAV-vermittelte Gentransduktion mittels einer selektiv druckregulierten Retroinfusion in einem ischämischen Myokard-Gebiet möglich und effektiv war.

Die regionale Überexpression des Thymosin β 4 zeigte einen signifikant vergleichbaren kardioprotektiven Effekt wie die kontinuierliche Überexpression des Thymosin β 4 bei den transgenen Tieren.

Auch die mittels Doxycyclin steuerbare sequenzielle Überexpression des Thymosin β 4 mittels des Tet-off-Promotors war suffizient, um die kardioprotektive Wirkung zu erreichen.

Die fettreiche Diät über die gesamte Versuchsdauer führte zur Erhöhung der Serumspiegel von Cholesterin und Triglyzeriden. Es kam zur Mikrozirkulationsstörung mit Rarefizierung der Kapillaren. Die Mikrozirkulationsstörung konnte unter Thymosin β 4-Einfluss signifikant vermindert werden.

Desgleichen zeigte sich in der Analyse der regionalen und globalen Myokardfunktion. Das Thymosin β 4 war in der Lage, die funktionelle Reserve der regionalen Myokardkontraktion unter Belastung aufrechtzuerhalten. Die globale Myokardfunktion mit der Ejektionsfraktion als Marker für eine systolische Funktion und mit dem linksventrikulären enddiastolischen Druck als Marker für die diastolische Funktion konnte durch die Thymosin β 4-Überexpression signifikant gebessert werden.

Somit konnten wir die kardioprotektive Wirkung des Thymosin β 4 mittels einer rAAV-vermittelten Genüberexpression in unserem präklinischen Schweine-Modell mit chronischer Myokardischämie und hypercholesterinämischer Diät zeigen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Virani, S. S. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **141**, e139-e596, doi:10.1161/cir.0000000000000757 (2020).
- 2 White, H. D. & Chew, D. P. Acute myocardial infarction. *Lancet* **372**, 570-584, doi:10.1016/S0140-6736(08)61237-4 (2008).
- 3 Suero, J. A. *et al.* Procedural outcomes and long-term survival among patients undergoing percutaneous coronary intervention of a chronic total occlusion in native coronary arteries: a 20-year experience. *Journal of the American College of Cardiology* **38**, 409-414, doi:10.1016/s0735-1097(01)01349-3 (2001).
- 4 Thygesen, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **60**, 1581-1598, doi:10.1016/j.jacc.2012.08.001 (2012).
- 5 Slezak, J. *et al.* Hibernating myocardium: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Can J Physiol Pharmacol* **87**, 252-265, doi:10.1139/Y09-011 (2009).
- 6 Hinkel, R. *et al.* Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation* **117**, 2232-2240, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758904 (2008).
- 7 Hannappel, E. & van Kampen, M. Determination of thymosin beta 4 in human blood cells and serum. *Journal of chromatography* **397**, 279-285 (1987).
- 8 Huff, T., Otto, A. M., Muller, C. S., Meier, M. & Hannappel, E. Thymosin beta4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 691-696, doi:10.1096/fj.01-0713com (2002).
- 9 Gomez-Marquez, J., Franco del Amo, F., Carpintero, P. & Anadon, R. High levels of mouse thymosin beta4 mRNA in differentiating P19 embryonic cells and during development of cardiovascular tissues. *Biochimica et biophysica acta* **1306**, 187-193, doi:10.1016/0167-4781(96)00003-6 (1996).
- 10 Hatzopoulos, A. K., Folkman, J., Vasile, E., Eiselen, G. K. & Rosenberg, R. D. Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* **125**, 1457-1468, doi:10.1242/dev.125.8.1457 (1998).
- 11 Kupatt, C. *et al.* Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1576-1578, doi:10.1096/fj.04-3282fje (2005).
- 12 Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395, doi:10.1038/74651 (2000).
- 13 Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine* **9**, 685-693, doi:10.1038/nm0603-685 (2003).
- 14 Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* **146**, 873-887, doi:10.1016/j.cell.2011.08.039 (2011).
- 15 Smart, N. *et al.* Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* **445**, 177-182, doi:10.1038/nature05383 (2007).
- 16 Kupatt, C. *et al.* Cotransfection of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-B via recombinant adeno-associated virus resolves chronic ischemic malperfusion role of vessel maturation. *Journal of the American College of Cardiology* **56**, 414-422, doi:10.1016/j.jacc.2010.03.050 (2010).
- 17 Rissanen, T. T. & Yla-Herttuala, S. Current status of cardiovascular gene therapy.

- 17 *Molecular Therapy* **15**, 1233-1247, doi:10.1038/sj.mt.6300175 (2007).
- 18 Smart, N. *et al.* Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1112**, 171-188, doi:10.1196/annals.1415.000 (2007).
- 19 Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M. D., Dimaio, J. M. & Srivastava, D. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* **432**, 466-472, doi:10.1038/nature03000 (2004).
- 20 Hinkel, R., Bock-Marquette, I., Hatzopoulos, A. K. & Kupatt, C. Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1194**, 105-111, doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05489.x (2010).
- 21 Yla-Herttula, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I. & Hartikainen, J. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *Journal of the American College of Cardiology* **49**, 1015-1026, doi:10.1016/j.jacc.2006.09.053 (2007).
- 22 Muruve, D. A. The innate immune response to adenovirus vectors. *Human gene therapy* **15**, 1157-1166, doi:10.1089/hum.2004.15.1157 (2004).
- 23 McCarty, D. M., Young, S. M., Jr. & Samulski, R. J. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet* **38**, 819-845, doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143717 (2004).
- 24 Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11288-11294, doi:10.1073/pnas.93.21.11288 (1996).
- 25 Nowrouzi, A. *et al.* Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 1177-1186, doi:10.1038/mt.2012.47 (2012).
- 26 Russell, D. W., Miller, A. D. & Alexander, I. E. Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8915-8919, doi:10.1073/pnas.91.19.8915 (1994).
- 27 Berns, K. I. & Giraud, C. Biology of adeno-associated virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **218**, 1-23, doi:10.1007/978-3-642-80207-2_1 (1996).
- 28 Gao, G. *et al.* Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**, 6381-6388, doi:10.1128/JVI.78.12.6381-6388.2004 (2004).
- 29 Lisowski, L., Tay, S. S. & Alexander, I. E. Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **24**, 59-67, doi:10.1016/j.coph.2015.07.006 (2015).
- 30 Bish, L. T. *et al.* Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Human gene therapy* **19**, 1359-1368, doi:10.1089/hum.2008.123 (2008).
- 31 Kupatt, C. *et al.* Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model. *Cardiovascular research* **61**, 530-537, doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.012 (2004).
- 32 Kupatt, C. *et al.* Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase. *Circulation* **112**, I117-122, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524801 (2005).
- 33 Boekstegers, P., Giehrl, W., von Degenfeld, G. & Steinbeck, G. Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology* **31**, 1525-1533, doi:10.1016/s0735-1097(98)00135-1 (1998).

-
- 34 Hinkel, R., Boekstegers, P. & Kupatt, C. Adjuvant early and late cardioprotective therapy: access to the heart. *Cardiovascular research* **94**, 226-236, doi:10.1093/cvr/cvs075 (2012).
- 35 Kupatt, C. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* **49**, 1575-1584, doi:10.1016/j.jacc.2006.11.047 (2007).
- 36 Hinkel, R. *et al.* Angiogenetic potential of Ad2/Hif-1alpha/VP16 after regional application in a preclinical pig model of chronic ischemia. *Current vascular pharmacology* **11**, 29-37 (2013).
- 37 Hinkel, R. *et al.* Heme Oxygenase-1 Gene Therapy Provides Cardioprotection Via Control of Post-Ischemic Inflammation: An Experimental Study in a Pre-Clinical Pig Model. *Journal of the American College of Cardiology* **66**, 154-165, doi:10.1016/j.jacc.2015.04.064 (2015).
- 38 Raake, P. *et al.* Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *Journal of the American College of Cardiology* **44**, 1124-1129, doi:10.1016/j.jacc.2004.05.074 (2004).
- 39 Pohl, T. *et al.* Retroinfusion-supported stenting in high-risk patients for percutaneous intervention and bypass surgery: results of the prospective randomized myoprotect I study. *Catheter Cardiovasc Interv* **62**, 323-330, doi:10.1002/ccd.20060 (2004).
- 40 Petersen, B. *et al.* Development and validation of a highly efficient protocol of porcine somatic cloning using preovulatory embryo transfer in peripubertal gilts. *Cloning Stem Cells* **10**, 355-362, doi:10.1089/clo.2008.0026 (2008).
- 41 Hinkel, R. *et al.* MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2. *Nature communications* **5**, 10, doi:10.1038/ncomms4970 (2014).
- 42 Boussif, O., Zanta, M. A. & Behr, J. P. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene therapy* **3**, 1074-1080 (1996).
- 43 Kupatt, C. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* **49**, 1575-1584, doi:10.1016/j.jacc.2006.11.047 (2007).
- 44 Boekstegers, P. *et al.* Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis. *Z Kardiol* **89 Suppl 9**, IX/109-112 (2000).
- 45 Gossen, M. *et al.* Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**, 1766-1769, doi:10.1126/science.7792603 (1995).
- 46 von Degenfeld, G. *et al.* 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**, 1120-1128 (2003).
- 47 Raake, P. W. *et al.* Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene therapy* **15**, 12-17, doi:10.1038/sj.gt.3303035 (2008).
- 48 Hagl, S. *et al.* [Ultrasound transit-time method for evaluation of regional myocardial function (author's transl)]. *Thoraxchir Vask Chir* **23**, 291-297, doi:10.1055/s-0028-1096966 (1975).
- 49 Rudolph, A. M. & Heymann, M. A. The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circulation research* **21**, 163-184, doi:10.1161/01.res.21.2.163 (1967).

-
- 50 Glenny, R. W., Bernard, S. & Brinkley, M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *Journal of applied physiology* **74**, 2585-2597 (1993).
- 51 Buckberg, G. D. Studies of regional coronary flow using radioactive microspheres. *The Annals of thoracic surgery* **20**, 46-51, doi:10.1016/s0003-4975(10)63850-7 (1975).
- 52 Raab, S., Thein, E., Harris, A. G. & Messmer, K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *The American journal of physiology* **276**, H1801-1806 (1999).
- 53 Rentrop, K. P., Cohen, M., Blanke, H. & Phillips, R. A. 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**, 587-592, doi:10.1016/s0735-1097(85)80380-6 (1985).
- 54 Ziegler, T. *et al.* Steerable Induction of the Thymosin beta4/MRTF-A Pathway via AAV-Based Overexpression Induces Therapeutic Neovascularization. *Human gene therapy*, doi:10.1089/hum.2017.013 (2017).
- 55 Ziegler, T. *et al.* Tbeta4 Increases Neovascularization and Cardiac Function in Chronic Myocardial Ischemia of Normo- and Hypercholesterolemic Pigs. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **26**, 1706-1714, doi:10.1016/j.ymthe.2018.06.004 (2018).
- 56 Dvorak, H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* **20**, 4368-4380, doi:10.1200/JCO.2002.10.088 (2002).
- 57 Zsebo, K. *et al.* Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circulation research* **114**, 101-108, doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.302421 (2014).
- 58 Greenberg, B. *et al.* Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* **387**, 1178-1186, doi:10.1016/S0140-6736(16)00082-9 (2016).

7 Danksagung

Ich kann mich noch sehr gut an die erste Vorstellungsrunde bei der Bewerbung dieser Doktorarbeit im Rahmen des FöFöLe-Programms bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt und meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. med. vet. Rabea Hinkel erinnern.

Ich möchte mich an dieser Stelle zunächst für ihr Vertrauen und letztlich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für die Überlassung des sehr interessanten Themas herzlich bedanken. Es folgte eine sehr intensive und wertvolle Betreuung im und außerhalb des Labors, sei es beim Etablieren einer neuen immun-histochemischen Färbungsmethode, Vortragen der Forschungsergebnisse auf verschiedenen Kongressen und zum Schluss bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Ich bin Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt und Frau Prof. Dr. med. vet. Rabea Hinkel hierfür sehr dankbar.

Auch bei der medizinischen Fakultät für die Möglichkeit der strukturierten Promotion „Molekulare und systembiologische Medizin“ im Rahmen des FöFöLe-Programms möchte ich mich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeitenden in der Arbeitsgruppe, Herrn Cuong Kieu und Frau Elisabeth Raatz für die ausgezeichnete technische Unterstützung, Frau Elena Gottlieb, Frau Teresa Trenkwalder, Frau Vanessa Pfetsch, Frau Karolina Weinmann, Frau Stephanie Zühlke, Herrn Florian Gesenhues, Herrn Seungmin Lee, Herrn Tilman Ziegler, für die Einarbeitung, Austausch und exzellente Zusammenarbeit.

Auch beim Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für die Bereitstellung des Groß-Tier-OP-Raums und Frau Blount und ihrem Team für die fürsorgliche Betreuung der Tiere möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heiner Niemann vom Friedrich-Löffler-Institut für die Herstellung der transgenen Tiere.

Und nicht zuletzt möchte ich meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung danken, ohne die ein Auslandsstudium und nun eine Promotion unmöglich gewesen wäre.

**Eidesstattliche Versicherung**

Husada, Wira

Name, Vorname

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

**Thymosin Beta4 vermittelte therapeutische Neovaskularisation im Großtiermodell - Rolle
der Gefäßmaturierung**

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

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

München, 15.01.2026

Ort, Datum

Wira Husada

Unterschrift Wira Husada

**Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation
mit der elektronischen Fassung**

Husada, Wira

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Thymosin Beta4 vermittelte therapeutische Neovaskularisation im Großtiermodell - Rolle der
Gefäßmaturierung**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 15.01.2026

Ort, Datum

Wira Husada

Unterschrift Wira Husada