

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

**Kardioprotektives Potential der LNA-vermittelten
microRNA-92a-Suppression im präklinischen
Ischämie-/Reperusionsmodell**

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

vorgelegt von
Stephanie Zühlke
aus Berlin

2017

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andrej Khandoga, PD Dr. med. Antje Habicht

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Rabea Hinkel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	6
1.1 Relevanz des Myokardinfarktes und dessen Folgen.....	6
1.2 Mechanismen des Reperfusionsschadens.....	8
1.3 Induzierbare Kardioprotektion als therapeutischer Ansatz.....	11
1.4 microRNAs	12
1.4.1 Prozessierung und Wirkmechanismus von miRNAs.....	13
1.4.2 miRNAs in der medizinischen Forschung	13
1.4.2.1 miRNAs mit kardiovaskulärer Relevanz	14
1.4.2.2 miRNA-92a und deren Zielgene in der Maus	15
1.4.2.3 Modifikation der miRNA-Expression.....	16
1.4.2.3.1 LNA-92a und deren Applikation	18
1.4.2.3.1.1 Systemische Applikation	19
1.4.2.3.1.2 Regionale Applikation.....	19
1.4.2.3.1.2.1 Antegrade Applikation	20
1.4.2.3.1.2.2 Retrograde Applikation.....	20
1.5 Fragestellung und methodischer Überblick	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Molekularbiologie	23
2.1.1 Real-time-PCR und Western Blot.....	23
2.1.2 Färbungen	24
2.1.2.1 Infarktfärbung und –größenbestimmung	24
2.1.2.2 Quantifizierung der Mikrozirkulation	25
2.1.2.3 Detektion der Apoptoserate im Herzgewebe.....	26
2.1.2.4 Detektion der Apoptoserate in der Zellkultur	26
2.1.3 Bestimmung der Entzündungsreaktion im Herzgewebe	27

2.2 In vitro-Versuche	28
2.2.1 Hypoxie – Reoxygenierung	28
2.2.1.1 Einfache Versuchsdurchführung	28
2.2.1.2 Kokultur-Versuch	28
2.2.1.3 Versuch mit konditioniertem Medium	29
2.2.2 Flusskammer-Versuch	29
2.3 In vivo-Versuche	30
2.3.1 Versuchstiere	30
2.3.2 Versuchsablauf	30
2.3.2.1 Präparation der Versuchstiere	31
2.3.2.2 LNA-Applikation	32
2.3.2.3 Messung hämodynamischer Basisparameter	33
2.3.2.3.1 Arterielle Druckmessung	34
2.3.2.3.2 Globale linksventrikuläre Herzfunktion	34
2.3.2.3.2.1 Ejektionsfraktion	35
2.3.2.3.2.2 Linksventrikulärer Druck	35
2.3.2.3.3 Regionale Herzfunktion (Sonomikrometrie)	36
2.4 Statistik	37
3 Ergebnisse	38
3.1 miR-92a-Expression	38
3.2 Herzfunktion und Hämodynamik	41
3.2.1 Infarktgröße	41
3.2.2 Globale linksventrikuläre Herzfunktion	43
3.2.3 Regionale Herzfunktion	45
3.3 Endothelprotektion	46
3.4 Apoptose	47

3.5 Entzündungsreaktion.....	48
3.6 7-tägige Reperfusion	50
3.7 In vitro-Versuche	51
3.7.1 Apoptose	51
3.7.2. Entzündungsreaktion.....	53
4 Diskussion	55
4.1 LNA-92a-vermittelte Reduktion der miR-92a-Expression	55
4.2 Kardioprotektiver Einfluss auf Mechanismen des Reperfusionsschadens.....	56
4.2.1 Verminderung der Apoptose	57
4.2.2 Verminderung der Entzündungsreaktion.....	60
4.3 Häodynamische und funktionelle Verbesserung	61
4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse	62
4.4.1 Rolle der miRNA-Therapie in der Medizin.....	62
4.4.2 miR-92a-Haltbarkeit und Nebeneffekte im Organismus.....	64
4.4.3 Bewertung der vorliegenden Daten im Hinblick auf den klinischen Einsatz.....	66
4.4.3.1 Anforderungen an präklinische Studien	66
4.4.3.2 Vergleich kardioprotektiver Therapieansätze	67
4.4.3.3 Schlussfolgerungen.....	69
5 Zusammenfassung und Ausblick	71
6 Abkürzungen	72
7 Literaturverzeichnis	75
8 Danksagung	89

1 Einleitung und Fragestellung

Nach wie vor sind Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems in Industrienationen wie Deutschland die häufigste Todesursache mit einem Anteil von mehr als 30 % [19, 51].

Das Vorliegen eines akuten Myokardinfarkts als zweithäufigste Todesursache unter den Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die potentiell darauffolgende Herzinsuffizienz leisten in diesem Zusammenhang einen weiteren, wesentlichen Beitrag [19].

1.1 Relevanz des Myokardinfarktes und dessen Folgen

Das Überleben des Akutereignisses des Myokardinfarktes geht mit der Entstehung von Folgeschäden im Langzeitverlauf einher. Trotz erfolgreicher Revaskularisierung mittels perkutaner Koronarintervention (PCI) oder koronarer Bypass-Operation erleidet etwa ein Drittel aller Patienten in Folge des akuten Infarktgeschehens eine behandlungsbedürftige Herzinsuffizienz [133, 19, 61].

Letztere hat bedeutende ökonomische und gesellschaftlich-soziale Auswirkungen:

Die Mortalität nach Myokardinfarkt im Krankenhaus beträgt etwa 5 % nach 30 Tagen. Trotz einer Reduktion der akuten und Langzeit-Mortalität durch Reperfusion und medikamentöse Sekundärprophylaxe beläuft sich die 6-Monatsmortalität im Schnitt auf 12 % und ist in den mittels GRACE-Score bestimmten Risikogruppen noch höher [61]. Diese zeichnen sich vor allem durch die Kombination eines hohen Lebensalters, einer hohen Herzfrequenz und eines hohen Blutdrucks, hoher Nierenretentionsparameter, zuvor aufgetretener Rhythmusereignisse sowie erhöhter Werte von Herzenzymen aus.

Die Diagnose Herzinsuffizienz (I50) nimmt die Stelle der zweit- (bei Frauen) bzw. dritthäufigsten (bei Männern) Hauptdiagnosen bei allen vollstationär aufgenommenen Patienten ein und betrifft insgesamt 1–2 % der Erwachsenen. Darunter befinden sich mehr als 10 % der über 70-Jährigen [20, 61]. Somit gilt die Herzinsuffizienz als eine Erkrankung des fortgeschrittenen Alters.

Eine Rehospitalisierungsrate von 50 % bei Herzinsuffizienzpatienten innerhalb von sechs Monaten [107] ist aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten heraus mit hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. Mindestens ebenso bedeutend im

Hinblick auf die Relevanz der Herzinsuffizienz ist die schlechte Prognose bezogen auf das Überleben der Patienten. So ist mehr als die Hälfte der Patienten bereits fünf Jahre nach Diagnosestellung verstorben [110]. Diese Zahl ist vergleichbar mit der Erkrankung an einem Malignom und unterstreicht den Handlungsbedarf im Hinblick auf die Therapie und besser noch die Prävention der Herzinsuffizienz. Daraus abgeleitet stellt das der Herzinsuffizienz potentiell vorgeschaltete Ereignis, der akuten Myokardinfarkt, einen Angriffspunkt bezüglich einer verbesserten Behandlung dar.

Für eine gute Prognose des Patienten nach stattgehabtem Myokardinfarkt sind insbesondere zwei Punkte von Bedeutung [11]: Zunächst ist das Überleben jeglicher Herzrhythmusstörungen eine Grundbedingung für das Überleben des Myokardinfarktes. Dies kann wiederum durch eine verbesserte Zugänglichkeit zu externen Defibrillatoren und eine suffiziente kardio-pulmonale Reanimation gewährleistet werden. Zum anderen ist die Verringerung der Infarktgröße einer der wichtigsten Faktoren für den Langzeitverlauf hospitalisierter Patienten nach akutem Myokardinfarkt. Die Ausbreitung des Infarktes wird durch die primäre Infarktgröße, linksventrikuläre Wandspannung und das Heilungsverhalten nach dem Infarkt bestimmt [127] und ist zu dem gewichtigen Anteil von bis zu 50 % auf den Reperfusionsschaden selbst zurückzuführen [136, 171, 11, 163, 61].

Außerdem dient die Größe des Infarktareals als prognostischer Marker für das Outcome des Patienten, da die Wahrscheinlichkeit, an einer Herzinsuffizienz in Folge eines akuten Infarktgeschehens zu erkranken, insbesondere mit der Größe des Infarktgebiets [145] und dem hämodynamisch relevanten Ausmaß abnormer Kontraktilitätsareale korreliert [47, 11].

Die Minimierung des Gewebsschadens ist folglich während und nach der myokardialen Ischämie von übergeordneter Wichtigkeit. Dies kann einerseits mittels möglichst frühzeitiger Reperfusion eingeleitet und andererseits durch verschiedenartige kardioprotektive Ansätze wie beispielsweise die Verminderung des Reperfusionsschadens [61], eine optimale medikamentöse Nachbehandlung, Vermeidung von Risikofaktoren und Anschluss an eine „Koronarsportgruppe“ als Tertiärprävention fortgeführt werden.

1.2 Mechanismen des Reperfusionsschadens

Dem Vorgang der Reperfusion kommt hinsichtlich des Ziels der Aufrechterhaltung vitalen und funktionsfähigen Myokardgewebes nach stattgehabter Ischämie eine entscheidende Funktion zu.

Die Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes ist essentiell für eine Verringerung der Infarktgröße. Aufgrund teilweise reversibler Gewebeschädigung ist mithilfe der Reperfusion die Regeneration des primär ischämischen Areals, der Area at Risk (AAR), bis etwa 24 Stunden nach Auftreten des Infarktereignisses möglich. Eine primäre PCI innerhalb der „Golden Hour“ nach Auftreten der typischen Symptome wie beispielsweise Brustschmerz ermöglicht eine vollständige Erholung des ischämischen Gewebes. Bereits nach 4-6 Stunden können aufgrund der beginnenden Koagulationsnekrose irreversible Veränderungen der myokardialen Feinstruktur beobachtet werden, die von einer Einwanderung von Entzündungszellen ab etwa 6 Stunden nach Symptombeginn gefolgt werden [70, 9, 63].

Jedoch sind die Reperfusion und der durch sie mitinitiierte Heilungsprozess [48, 145] auch für einen Teil des vorübergehenden und persistierenden Schadens am Myokardgewebe verantwortlich [136, 171, 11, 163, 61]. Insbesondere wird dieser Gewebsschaden durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), pH-Wert-Veränderungen, Elektrolyt-Verschiebungen und einen verstärkten Leukozyteneinstrom verursacht.

Das sogenannte „Sauerstoffparadoxons“ besagt, dass die Reoxygenierung, also die Zufuhr des mangelnden Substrates, selbst einen Teil des Gewebeschadens verursacht, der über jenen der Ischämie hinausgeht [62, 163]. Durch das plötzliche Wiederanfluten von Sauerstoff bei Reperfusion entstehen ROS zunächst durch eine Vielzahl von Enzymen wie der Xanthin-Oxidase, NADPH-Oxidase und Monoaminoxidasen. Ebenso kommt es zu einer Ischämie-induzierten Dysfunktion von Elektronentransporterkanälen und einer NOS-Entkopplung. Dies führt einer Aktivierung des Endothels, die durch die Expression von Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet ist. Zudem werden Inflammationsmediatoren sezerniert, Matrixmetalloproteasen (MMPs) aktiviert und NO/Superoxid-Interaktionen finden vermehrt statt. Auf Seite der Mitochondrien kommt es zur Öffnung von mPTPs (mitochondria Permeability Transition Pores) [79]. Dieser Vorgang wird durch Wiederanstieg des pH-Wertes nach Ischämie, oxidativen Stress und Calcium-

Überladung initiiert. Das als „Calciumparadoxon“ bekannte Phänomen beschreibt den abrupten Anstieg von intrazellulärem Calcium, welcher zum einem von extrazellulär durch einen ATP-Mangel-bedingten Membranschaden des Sarkolemms und zum anderen von intrazellulär durch Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums folgt. Das resultiert in einer intrazellulären und mitochondrialen Calcium-Überladung, die durch Induktion von Hyperkontraktilität den kardiomyozytären Zelltod bedingt und auch für Öffnung von mPTPs mitverantwortlich ist [163]. Noch mehr als durch die Calcium-Überladung wird die Öffnung der mPTPs allerdings durch den postischämischen pH-Anstieg getriggert und ist damit ein der Reperfusion vorbehaltenen Prozess [54, 79].

Die Öffnung von mPTPs erlaubt die Kommunikation zwischen Zytoplasma und mitochondrialer Matrix. Während die kurzzeitige Öffnung, wie beispielsweise bei stotternder Reperfusion, durch die nur transiente ROS-Produktion kardioprotektiv wirken kann, führt die langfristige Öffnung der mPTPs schließlich zu einem Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotentials, ATP- und NAD⁺-Mangel, der seinerseits zu einem Funktionsmangel der zellulären Ionenpumpen wie der Na⁺/K⁺-ATPase und Ca²⁺-ATPase führt. Na⁺- und K⁺-Verschiebungen führen zu einer Endothelaktivierung. Das wiederum führt zu Matrixschwellung und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch mitochondriale Proteine - unter ihnen proapoptotische Faktoren wie Cytochrom C oder Smac/Diablo - freierwerden [54, 163, 79]. Cytochrom C kann als sogenanntes „Death Signal“ den intrinsischen Weg der Apoptose über Aktivierung des Apoptosis Protease Activating Factor-1 (Apaf-1) und so die Bildung des Apoptosomes initiieren. Das Apoptosom ist vorstellbar als eine Plattform zur Rekrutierung und Inangasetzung der Selbstaktivierung der Pro-Caspase-9. Diese steht am Anfang der intrinsischen Apoptosekaskade [80]. Der extrinsische Weg wird hingegen durch Faktoren der TNF-Familie und FAS-Ligand (CD95L), die an den „Death Receptor“ binden, ausgelöst. Das aktiviert über Cofaktoren Pro-Caspase-8/-10. Sowohl der intrinsische, mitochondriale Weg, als auch der rezeptorvermittelte extrinsische Weg der Apoptose setzen somit eine Kaskade von intrazellulären Schritten in Gang, die einen weiteren Anstieg der Ca²⁺-Konzentration und die Aktivierung einer Vielzahl von Caspasen beinhaltet [59, 159]. Dies führt schließlich dazu, dass die in Vesikel verpackten Zellreste phagozytiert werden können ohne dabei eine Entzündungsreaktion hervorzurufen.

Von der Apoptose zu unterscheiden ist die Nekrose. Sie geht stets mit einer Entzündungsreaktion einher aufgrund der meist durch ATP-Mangel bedingten Zellmembranschädigung, die den Verlust intrazellulärer Bestandteile in den Extrazellulärraum nach sich zieht. Die ischämisch bedingte Vorstufe der Nekrose zeichnet sich durch eine Schwellung der Zellkompartimente und Plasmamembran aus und ist auf den Zusammenbruch des Konzentrationsgradienten der verschiedenen Ionen wie Na^+ , K^+ und Ca^{2+} zurückzuführen [101, 59].

Für den Reperfusionsschaden spielt neben Apoptose und Nekrose auch die Rekrutierung von Leukozyten wie bereits oben erwähnt eine wichtige Rolle. Angelockt werden Leukozyten durch Endothelaktivierung und Chemokinfreisetzung. Die bereits angesprochene ischämisch bedingte Entkopplung der NOS ist ebenfalls von Bedeutung. Die ihr zugeschriebenen kardioprotektiven Effekte wie die Inhibition der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, Inaktivierung von Superoxidradikalen und Verbesserung des koronaren Blutflusses durch Gefäßdilataion [31, 43, 173] sind abgeschwächt. Stattdessen werden bereits während der ersten Stunden der Reperfusion erst ortsständige und später zirkulierende neutrophile Granulozyten in das Infarktareal gelockt. Im Zeitverlauf migrieren sie Chemotaxis-vermittelt bis ins angrenzende intakte Myokardgewebe, die AAR. Die vermehrte Zellinteraktion findet statt zwischen den auf der Endothelzelloberfläche exprimierten Selektinen, CAMs (Cellular Adhesion Molecules) und ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) und auf Leukozyten vorhandenen Selektinliganden und Integrinen [38, 126]. Dabei wird die frühe inflammatorische Phase beispielsweise insbesondere über P-Selektine und das Zytokin Interleukin-8 vermittelt, die in den Endothelzellen in Weibel-Palade-Körperchen gespeichert sind und deren Expression an der Zelloberfläche durch verschiedenartige Aktivierung der Endothelzellen induziert wird [22, 126].

Neutrophile Granulozyten sind die am schnellsten in das reperfundierte Gewebe einwandernden Leukozyten, stellen die primäre Quelle externer, gewebsschädigender freier Sauerstoffradikale dar [77, 38, 22, 39] und sezernieren Enzyme wie Elastase, Myeloperoxidase und MMPs, die ebenfalls direkt gewebsschädigend wirken [48]. Die Myeloperoxidase ist ein granulozytenspezifisches Enzym, wird ebenso wie Elastase nach Zell-Aktivierung ausgeschüttet und ist zudem für die Rekrutierung weiterer Granulozyten von Bedeutung [82].

Die Einwanderung von Monozyten und deren Differenzierung zu Makrophagen folgt

dem Neutrophileneinstrom verzögert. Sie ist neben der Abräumfunktion nekrotischen Zellmaterials neben neutrophilen Granulozyten ebenfalls für einen Anteil des Myokardschadens nach Reperfusion verantwortlich [134, 98].

Zusammenfassend werden nach der Reperfusion Störungen der Mikrozirkulation und zelluläre Dysfunktion, die aktiv initiierte Apoptose und passiv ablaufende Nekrose bzw. deren ischämisch bedingten Vorstufe, die Onkose, beobachtet [101, 83, 41, 163]. Während Nekrose eher auf die vorangegangene Ischämie zurückzuführen ist, hat die Apoptose einen bedeutenden Anteil am Zelluntergang nach Reperfusion [123, 18, 59, 159]. Gemeinsam ist den gewebeschädigenden Mechanismen jedoch nach der Entstehung im Verlauf von Ischämie und Reperfusion der bedeutende Beitrag zur Infarktgröße.

Pathophysiologisch wird konsekutiv das umliegende, weitgehend gesunde Myokard aufgrund der mangelhaften Pumpleistung des betroffenen Areals funktionell mehrbelastet, was bei großen Infarkten nach dem Übergangsstadium der an das Infarktareal angrenzenden Hypertrophie mit der Entwicklung von Herzinsuffizienz und dilatativer Kardiomyopathie einhergeht [127, 145].

1.3 Induzierbare Kardioprotektion als therapeutischer Ansatz

Um von der Reperfusion nachhaltig profitieren zu können, bietet sich folglich eine Minimierung des durch sie ausgelösten Schadens durch induzierte Kardioprotektion an [163, 61]. Diese ist definiert als die Prävention eines Ischämie-Reperfusion-assoziierten Gewebsschadens, dessen primäre Manifestationen aus endothelialem und kardiomyozytärem Zelltod, Arrhythmien und kontraktile Dysfunktion bestehen [11].

Bislang wurden diesbezüglich Therapieansätze wie die vorübergehende Absenkung der Körpertemperatur, ischämische Postkonditionierung, Cyclosporin A- und Thymosin β 4-Behandlung untersucht.

Ein Überlebensvorteil durch Hypothermie-Induktion wurde zuerst in Hunden beschrieben [14]. Trotz vielversprechender Ergebnisse im Tierexperiment [58, 52], sind die klinischen Ergebnisse gemischt [36, 55, 53].

Die Tatsache, dass Postkonditionierung sich positiv auf die Verringerung der Infarktgröße auswirkt, wurde zuerst von Zhao et al. [171] beschrieben. Im Rahmen

der Postkonditionierung werden mit Beginn der Reperfusion wiederkehrende kurze Ischämieepisodes induziert, sodass von „stotternder Reperfusion“ gesprochen werden kann [108]. In klinischen Studien wurden bislang jedoch lediglich widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich eines Nutzens der Therapie erzielt [139, 50].

Durch Identifikation der Signalwege, über welche die Postkonditionierung wirkt, konnten pharmakologische Ziele wie die mPTP aufgefunden werden. Cyclosporin A dient so als Mittel der pharmakologischen Präkonditionierung. In einer ersten klinischen Studie war ein kardioprotektiver Effekt im Vergleich zur Kontrollbehandlung zu beobachten. [4, 61].

Eine weitere präklinisch untersuchte und kardioprotektive Substanz ist Thymosin β 4 [66, 68]. Dabei handelt es sich um ein G-Aktin-Bindungsprotein, das mit einer vermehrten Kollateralisierungskapazität bei CAD-Patienten assoziiert ist [7]. Nach vielversprechenden präklinischen Daten [67, 69] stehen klinische Phase I- und II-Studien zu Thymosin β 4-Behandlung nach Myokardinfarkt noch aus.

Aufgrund der vielfältigen, vorstehend beschriebenen Ursachen, die den Reperfusionsschaden bedingen und der bislang größtenteils nicht überzeugenden Ergebnisse in klinischen Studien erscheint die Untersuchung eines neuartigen, pleiotropen Ansatzes zur Reduktion des durch Reperfusion entstehenden Gewebsschadens als zielführend.

Eine derart vielschichtige Herangehensweise mit dem Ziel der Kardioprotektion auf Basis einer Verminderung des Reperfusionsschadens wird in der vorliegenden Arbeit durch die Inhibition der microRNA-92a verfolgt.

1.4 microRNAs

Nach Entdeckung des ersten microRNA-Gens *lin-4* im Jahr 1993 [93, 161] sind microRNAs (miRNAs) in den letzten fünfzehn Jahren von zunehmender Bedeutung als mögliche therapeutische Angriffspunkte geworden [97].

1.4.1 Prozessierung und Wirkmechanismus von miRNAs

miRNAs sind etwa 22 Nukleotide lange, nicht-kodierende Moleküle, die im Zellkern synthetisiert, unter anderem von den Enzymen Drosha und Dicer prozessiert und in das Zytoplasma ausgeschleust werden, um dort im RISC-Komplex ihre Wirkung zu entfalten. Dabei lagern sie sich an überwiegend komplementäre mRNAs an und initiieren dadurch deren Translationshemmung oder den Abbau der mRNAs [140, 146, 152, 106].

miRNAs besitzen, den siRNAs ähnlich, eine Wirkungsweise auf posttranskriptionaler Ebene. Im Gegensatz zum Wirkmechanismus von siRNAs ist jedoch keine fehlerfreie Basenpaarung zwischen miRNA und mRNA notwendig (s. auch Abb. 3). Demzufolge verfügen miRNAs über multiple und oft funktionell verwandte Ziel-mRNAs.

1.4.2 miRNAs in der medizinischen Forschung

Unter physiologischen, homöostatischen Bedingungen des Organismus konnte in Mausexperimenten nur eine schwache Wirkung von gezielten miRNA-Expressionsveränderungen beobachtet werden. Dies ändert sich jedoch unter pathologischen Expressionsveränderungen [125], sodass miRNAs als „Feintuner“ des Zellstoffwechsels betrachtet werden können. Insbesondere diese Tatsache macht miRNAs als therapeutischen Angriffspunkt [146] im Sinne einer zielgerichteten Beeinflussung des Zellgleichgewichts interessant.

Zirkulierende und organspezifisch exprimierte miRNAs bieten zudem neue diagnostische Möglichkeiten in der Medizin.

Das potentielle Einsatzgebiet der miRNAs reicht somit von der Verwendung als Biomarker im Blut [72, 57, 130] über die gewebsspezifischen Beeinflussung des Zellstoffwechsels [146] bis hin zur Umprogrammierung von Fibroblasten in Kardiomyozyten [75] mit dem Ziel einer funktionellen Verbesserung des Organs.

1.4.2.1 miRNAs mit kardiovaskulärer Relevanz

Die ersten therapeutisch relevanten Daten für das kardiovaskuläre System wurden 2006 von van Rooij et al. publiziert [150]. Seither wurden im Kontext der Kardioprotektion verschiedene Veränderungen des miRNA-Expressionsmusters identifiziert [25, 146, 26, 71, 172]. Abbildung 1 bietet einen Überblick über die Veränderung der Expression von miRNAs nach dem Auftreten eines Myokardinfarktes und zeigt so therapeutische Angriffspunkte auf.

Mit dem Ziel der Verringerung des Reperfusionsschadens bietet sich die Beeinflussung von miRNAs an, die das Zellüberleben und die Vaskularisierung steuern. Diesbezüglich sind die 2009 von Bonauer et al. [12] beschriebene Verbesserung der Neovaskularisierung im Hinterlaufischämie-Modell und Verminderung der Infarktgröße nach LAD-Ligation in der Maus nach miR-92a-Suppression bedeutsam. Es konnte mittels positiver Beeinflussung der Vaskularisierung via miR-92a ein kardioprotektiver Effekt im Mausmodell mit permanenter LAD-Ligation erkannt werden [12].

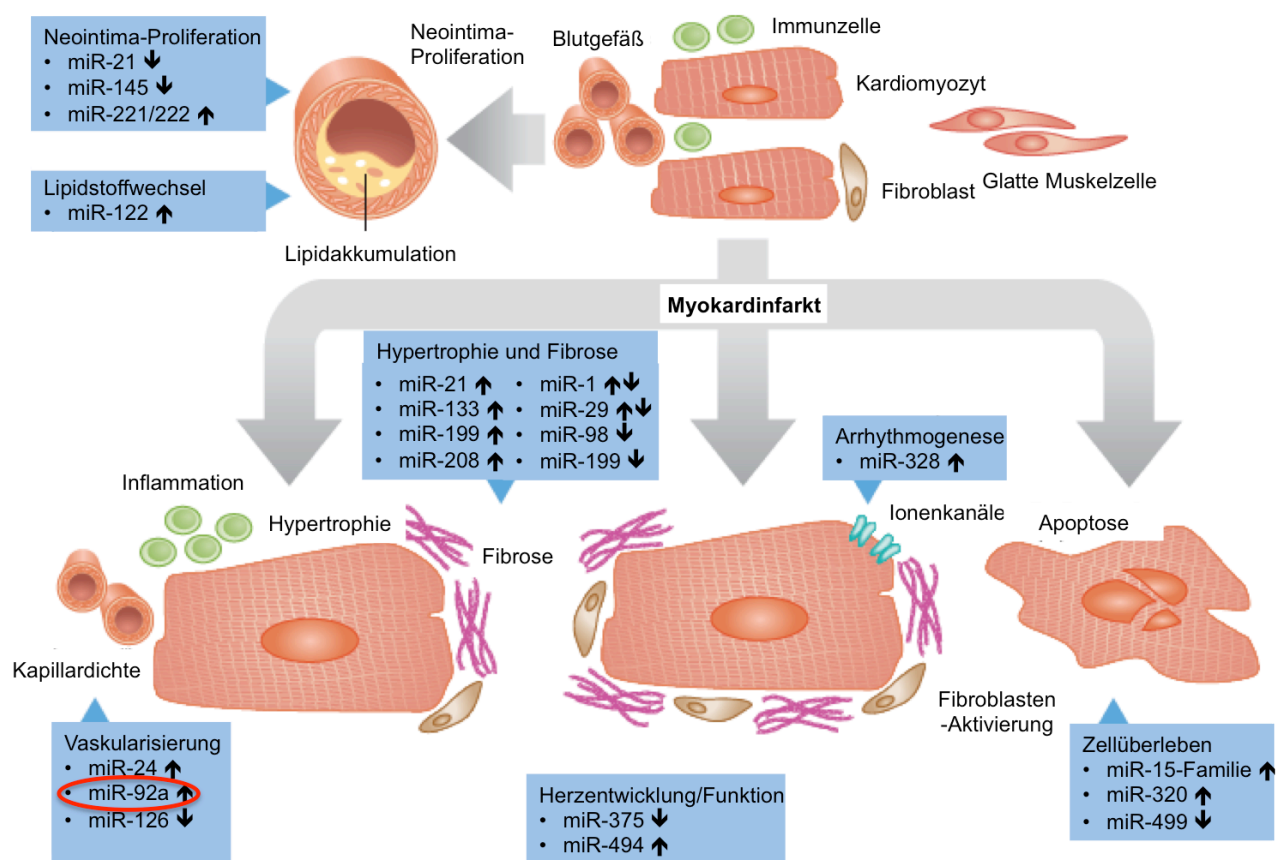


Abbildung 1: miRNA-Expressionsveränderungen nach Myokardinfarkt als Angriffspunkte der Therapie, modifiziert nach [146]

1.4.2.2 miRNA-92a und deren Zielgene in der Maus

Der auf Chromosom 13 lokalisierte miRNA-17~92a-Cluster ist vor allem aus der onkologischen Forschung als Tumorangio-genese fördernder Faktor bekannt [33, 165].

Zunehmend wird den zum miRNA-17~92-Cluster gehörigen miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b und miR-20a jedoch auch ein modulatorischer Einfluss im Rahmen des kardiovaskulären System zugeschrieben [13, 37, 30], der besonders in Bezug auf Herzentwicklung, Endothelzellproliferation und Neovaskularisierung als relevant angesehen wird.

Die Regulation des miR-17~92-Cluster betreffend konnte für die Onkogene c-myc und NMYC eine Beteiligung an der Expressionserhöhung in Tumorzellen gezeigt werden. Weitere Transkriptionsfaktoren des miR-17~92-Clusters sind E2Fs und Cyclin D1, die wiederum durch miR-17 und miR-20a reguliert werden und damit eine negative Feedbackregulation des Clusters erlauben. Auch ischämische Stimuli und inflammatorische Zytokine regulieren auf bislang noch nicht geklärte Weise die Transkription des Clusters [13].

Die miR-92a im Einzelnen ist meist unspezifisch in Tumorgeweben herunter- [119, 164] oder hochreguliert [12, 118] und beeinflusst möglicherweise die humane Hirnentwicklung unter Abgrenzung von der des Primaten [137]. Außerdem korreliert die miR-92a-Expression positiv mit dem Reservoir naiver CD8+ T-Zellen, sodass in der Folge eine Expressionsverminderung im Alter mit Verbrauch naiver T-Zellen einhergeht [120]. Im kardiovaskulären System wird die miR-92a nicht nur in Endothelzellen, sondern auch in Fibroblasten und Kardiomyozyten exprimiert und ist nach Ischämie-Induktion im Tiermodell hochreguliert [12, 13].

Mithilfe der miRanda-Software und TargetScan konnten bereits einige Zielgene der miR-92a in der Maus identifiziert werden (s. auch Abb. 3) [12]. Es handelt sich insbesondere um Signalmoleküle im Rahmen der Angiogenese:

- die Integrinuntereinheiten α_5 und α_v als Mediatoren der Zell-Matrix-Interaktion und Faktoren der Zellmigration [148]
- das kleine G-Protein Rap-1, das in der Integrin-Signalkaskade und somit auch bezüglich der Zelladhäsion von essentieller Bedeutung ist [21]
- S1P₁ (Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1) als Rezeptor für Sphingosin-1-Phosphat (SPP), das für Zellmigration und Angiogenese bedeutsam ist und in

diesem Zusammenhang beispielsweise Integrin-abhängig die Zellmigration von HUVECs (humane Endothelzellen der Nabelschnurvene) fördert [124, 138]

- die Histondeacetylase SIRT1, die eine Veränderung der Chromatinstruktur und damit des Expressionsmusters der Zelle in Abhängigkeit vom Zelltyp in apoptotische bzw. anti-apoptotische Richtung und verändertes Verhalten auf Angiogenese-stimulierende Chemokine bewirkt [129]
- die mit Myokardhypertrophie assoziierte MKK4 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4) [143].

Im Rahmen der Validierung dieser Zielgene in humanen Endothelzellen ergab die mRNA-Expressionsanalyse eine verminderte Expression aller genannten Zielgenprodukte unter miRNA-92a-Überexpression bis auf Rap-1, das unbeeinträchtigt exprimiert wurde. Zusätzlich konnte eine verringerte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) festgestellt werden. Stickstoffmonoxid wirkt ebenfalls als Angiogenese-fördernder Faktor [115], der in Abhängigkeit von der intravasalen Wandschubspannung durch KLF2 reguliert wird [162].

Zusammenfassend zeigen diese Daten ein anti-angiogenetisches Funktionsprofil der miR-92a durch Inhibition Zellmigration-fördernder und mutmaßlich auch Apoptose-hemmender Faktoren. Dieses konnte bislang durch weitere Arbeiten zum miR-17~92-Cluster bestätigt werden [142, 162]. Mit dem Ziel eines kardioprotektiven Effektes im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens erscheint somit die Suppression der miRNA-92a als vielversprechend.

1.4.2.3 Modifikation der miRNA-Expression

Um eine Modifikation der miRNA-Wirkung zu erzielen, stehen mehrere Mechanismen zur Verfügung. Dabei ist zwischen zwei Zielen der miRNA-Modifikation, der Erhöhung oder Verminderung der miRNA-Expression, zu differenzieren. Diese Unterscheidung ist vor allem von der pathologischen Veränderung der miRNA-Expression abhängig und zielt auf die „Normalisierung“ der miRNA-Levels ab.

Durch miRNA-Transfektion kann eine Erhöhung der miRNA-Spiegel erreicht werden. miRNA-Suppression kann mittels Applikation verschiedener AntimiRs gewährleistet werden [146]. Diese sind definiert als einzelsträngige RNA-Oligonukleotide, die

überwiegend komplementär zu entsprechender Ziel-mRNA sind und deren Wirkung unterdrücken.

Derzeit bestehen im Wesentlichen zwei Möglichkeiten der Oligonukleotid-Aufbereitung (s. Abb. 3). Zum einen können die Antisense-miRNA-Stränge an Cholesterin gekoppelt werden, um den Übertritt ins Zellinnere aufgrund erhöhter lipophiler Eigenschaften zu beschleunigen. LNAs (locked nucleic acids) sind andererseits vollständig phosphosulfurierte Oligonukleotide mit einer Länge von 16 Nukleotiden und zeichnen sich durch eine verbesserte Stabilität aufgrund einer zusätzlichen 2'-O-Methyl-Bindung zum C⁵-Atom des Ribosegerüsts aus [85, 12]. Der Mechanismus der LNA-Aufnahme in die Zelle ist noch ungeklärt, allerdings konnte die Aufnahme „nackter“ LNA („Gymnose“) gezeigt werden [141, 168]. Nach Aufnahme der LNA in die Zelle kommt es zu thermodynamisch stabilen Duplexformationen mit der komplementären miRNA [42].

Im Vergleich zu AntagomiRs bietet sich die Verwendung von LNAs (AntimiRs) aus mehreren Gründen bevorzugt an. Sie weisen eine verstärkte Resistenz gegenüber Nukleasen und erhöhte Schmelztemperatur auf. Aufgrund der stärksten Affinität unter den AntimiRs gestatten sie die Applikation niedrigerer Konzentrationen bei mindestens gleicher Effektivität [12, 153] und lassen somit auch weniger Nebeneffekte erwarten. Zudem werden an Patienten bereits seit 2010 erste therapeutische miRNA-Modifikationen mittels LNA-basierter miRNA-Inhibition durchgeführt [135, 40, 155, 74] und befinden sich in klinischer Testung. Im Gegensatz zu AntagomiRs kann so die rasche Etablierung in der Klinik angestrebt werden.

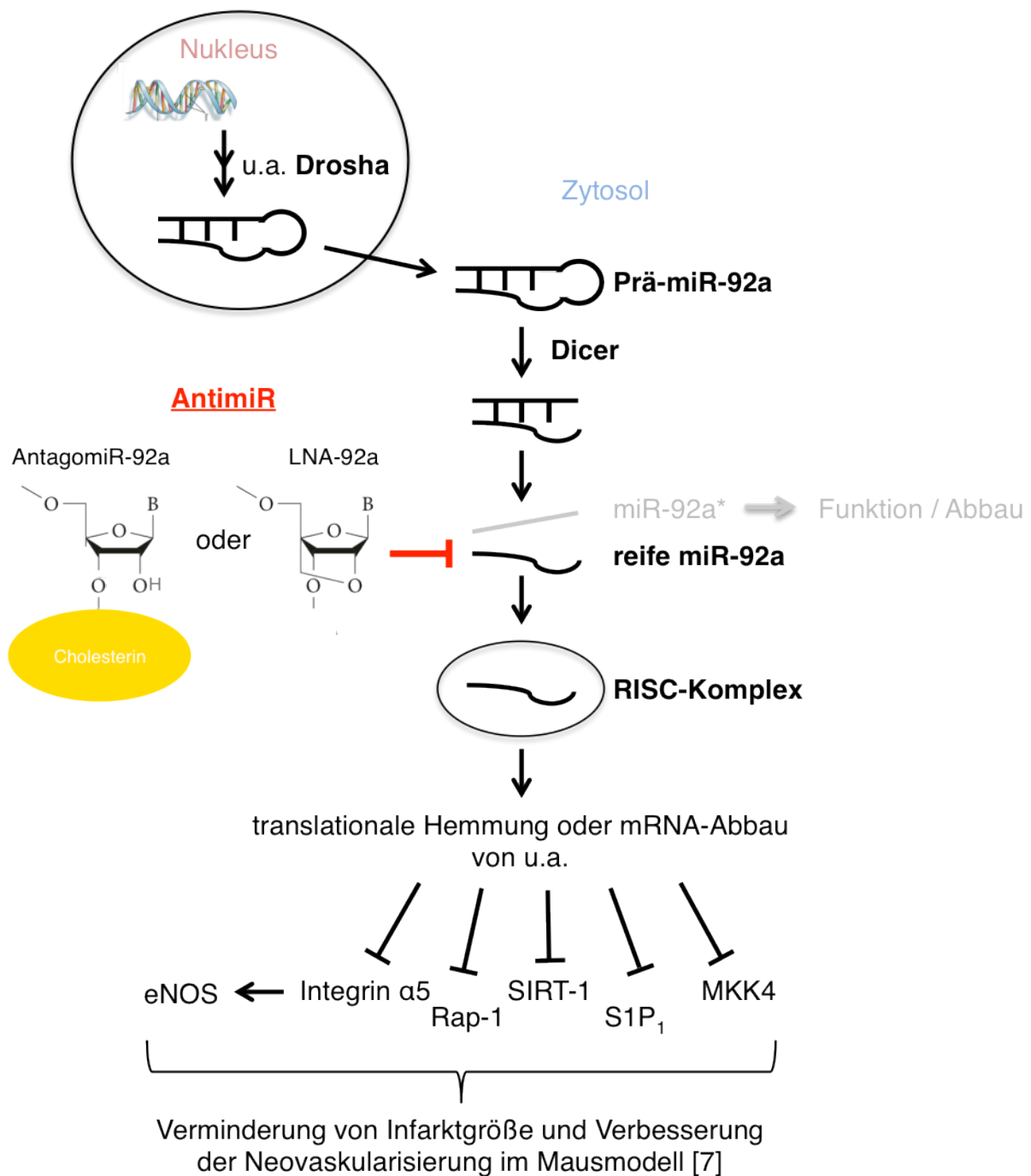


Abbildung 2: Übersicht über die miR-92a-Prozessierung, deren Zielproteine in der Maus und Möglichkeiten der Inhibition

1.4.2.3.1 LNA-92a und deren Applikation

Die LNA-92a ist eine 16 Nukleotide lange und zu Base 2 bis 17 der miR-92a vollständig komplementäre LNA.

Aufgrund ihrer Größe und Ladung sind LNAs in ihrer intestinalen Resorption stark eingeschränkt und daher für eine orale Applikation ungeeignet [153]. Somit bestehen

die Möglichkeiten, sie gelöst systemisch und damit unspezifisch in das venöse Gefäßsystem zu verabreichen oder regional und damit weitestgehend auf das Herz beschränkt zu applizieren, um so das umgebende Gewebe zu schonen.

1.4.2.3.1.1 Systemische Applikation

Die systemische Applikation von LNAs und AntagomiRs ist experimentell am weitesten verbreitet. Dieses ist hauptsächlich durch die einfache Vorgehensweise bedingt, da die Substanz lediglich über einen peripheren venösen Zugang verabreicht werden kann.

Im Gegensatz zum systemischen Therapieansatz, der möglicherweise mit Nebeneffekten durch die veränderte miRNA-Expression jenseits des Zielorgans im Organismus behaftet ist, sollte jedoch möglichst auch die regionale Applikation untersucht werden, um die Bedeutung der selektiven Therapie des ischämischen Areals herauszustellen.

1.4.2.3.1.2 Regionale Applikation

Dem Myokardinfarkt liegt pathophysiologisch ein verminderter Blutfluss zugrunde. Dieser erschwert die Verteilung und Aufnahme der Substanz im Zielgebiet, weshalb höhere systemische Konzentrationen zur Therapie angestrebt werden müssten, die wiederum eine höhere Wahrscheinlichkeit von Nebeneffekten nach sich ziehen [68]. Somit erscheint es als sinnvoll, die systemische Gabe der LNA-92a bezüglich ihrer Wirksamkeit und möglicher systemischer Nebeneffekte der regionalen Applikation gegenüber zustellen.

Die regionale LNA-Applikation erfordert einen invasiveren, Katheter-basierten Zugang zu den Herzkranzgefäßen im Vergleich zur systemischen Applikation, bei der lediglich ein peripher-venöser Zugang benötigt wird.

Allerdings kann von der regionalen LNA-Gabe angenommen werden, dass sie Hinblick auf potentielle Nebenwirkungen in herzfernem Gewebe vorteilhaft ist. Zudem ist die Effektivität der LNA-92a-Applikation für die miRNA-Modifikation und damit den zukünftigen Therapieerfolg entscheidend. Die Effektivität steht in engem

Zusammenhang mit der regionalen Verweildauer der Infusionslösung in Gefäßen und Gewebe, die ebenfalls bei regionaler Applikation verbessert ist und von der in Infarkt- und angrenzenden Arealen unter anderem aufgrund von Ödembildung nicht per se ausgegangen werden kann [10].

Somit erscheint die regionale LNA-Applikation als die konzeptionell überlegene Methode. Es bieten sich durch die benachbarte Lokalisation von Arterie und Vene zwei Zugangswege.

1.4.2.3.1.2.1 Antegrade Applikation

Die antegrade Applikation wird mittels OTW (*over the wire*) - Ballonkatheter in die LAD (Left anterior descending artery) in physiologischer Flussrichtung des Blutes durchgeführt (s. Abb. 3) und ist eine zielgerichtete Strategie, um direkt im ischämischen Areal eine therapeutische Maßnahme einzuleiten, da das Zielgewebe direkt zirkulatorisch an die verlegte Arterie angebunden ist. Obwohl die antegrade Applikation die Methode der Wahl am Patienten darstellt, beinhaltet dieses Vorgehen auch Limitationen. Diese bestehen beispielsweise in einer sehr kurze Passage- und damit Penetrationszeit des Agens und der oft eingeschränkten Perfusion des erkrankten Koronargefäßes durch Mikrothromben und Ischämie-bedingte Gefäßveränderungen [68]. Jedoch kann im klinischen Kontext mit dieser Methode in einer Sitzung die Revaskularisierung mit Applikation einer therapeutischen Substanz verbunden werden.

1.4.2.3.1.2.2 Retrograde Applikation

Des Weiteren bietet sich die retrograde LNA-92a-Applikation in die AIV (Anterior interventricular vein) in dem Blutstrom entgegengesetzter Richtung mittels SSR (*synchronized suction and retroinfusion*)-System an (s. Abb. 3).

Die vergleichsweise geringe Effektivität der erstmals 1976 in Hunden beschriebenen [105, 113] EKG-synchronisierten Retroinfusionen mittel Katheter in der klinischen Anwendung führte zur Weiterentwicklung hin zum System der *Synchronized Suction and Retroinfusion* (SSR) [10]. Das System enthält eine EKG-getriggerte,

druckregulierte Infusionseinheit. Während der Diastole wird das Agens über die AIV kontrolliert bis ins Kapillarbett retroinfundiert und ermöglicht zum Zeitpunkt der Systole einen ungehinderten Abfluss des venösen Blutes durch das Absaugen über den Katheter [149].

Dies bietet den Vorteil, dass zum einen eine verlängerte Verweildauer der applizierten Substanz ermöglicht wird und in Folge zu einer erhöhten Penetrationsrate in den Zellen führt. Zum anderen wird mit dieser Methode der potentielle Zustand einer anhaltenden Minderperfusion der Arterie umgangen und die Applikation kann notfalls sogar vor der Reperfusion der Koronararterie erfolgen.

Obwohl zu bedenken ist, dass es bei selektiver Katheterisierung der Koronarvenen zu einer verlängerten Interventionszeit und die Flussbehinderung durch Venenklappen kommen kann [68], konnte die Wirksamkeit und Überlegenheit dieser Katheter-basierten Strategie im Vergleich zu anderen lokalen Applikationsverfahren wie der intramyokardialen Gabe von extern oder endoventrikulär via Katheter bereits mehrfach gezeigt werden [156, 87, 131, 88].

Die retrograde LNA-92a-Applikation stellt somit insgesamt einen geeigneten Zugangsweg dar, dessen Effizienz in der LNA-Therapie untersucht wird.

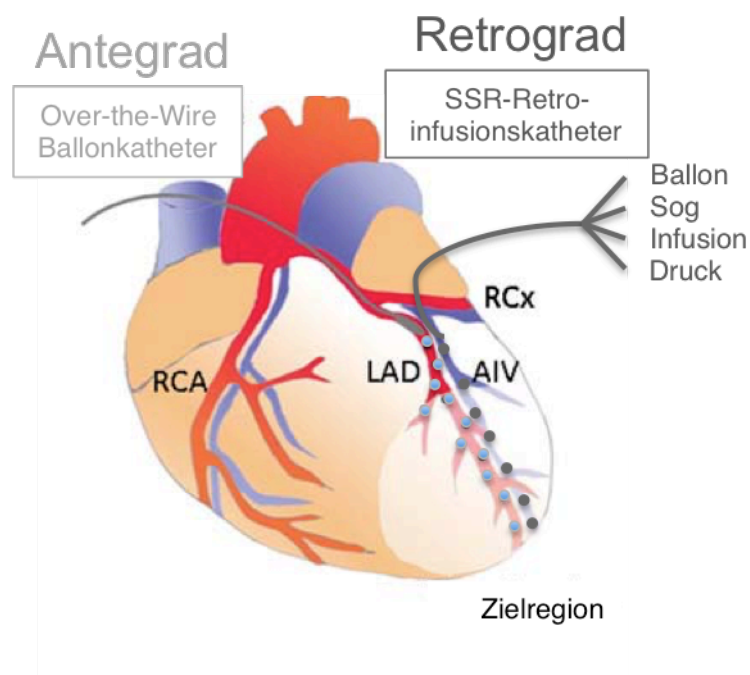


Abbildung 3: antegrade (in hellgrau) oder retrograde (in dunkelgrau dargestellte) Applikation der LNA mittels OTW-Ballonkatheter in die LAD bzw. mittels SSR-Katheter in die AIV, modifiziert nach [68]

1.5 Fragestellung und methodischer Überblick

Basierend auf den Ergebnissen im Hinblick auf Neovaskularisierung und Verminderung von Apoptose und Infarktgröße in der Zellkultur und im Kleintiermodellen durch Suppression der miRNA-92a [12] wird in der vorliegenden Arbeit die Hypothese untersucht, dass miRNA-92a-Suppression mittels LNA-92a-Applikation kardioprotektives Potential in einem präklinischem Ischämie-/Reperusionsmodell im Großtier (Schwein) besitzt. Zudem erfolgt der Vergleich von systemischer und regionalen Applikationsarten anhand dieses Modells.

Das Ausmaß des Ischämie-/Reperusions-Schadens wird funktionell sonomikrometrisch und die Erhebung linksventrikulären Drucks, histochemisch und molekularbiologisch durch die Ermittlung von Infarktgröße, Apoptose und Entzündungsreaktion erhoben.

Außerdem erfolgen in-vitro-Versuche zur Klärung der Beeinflussung zugrunde liegender Pathomechanismen des Reperusionssschadens durch die LNA-Behandlung.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 Real-time-PCR und Western Blot

Real-time-PCR und Western Blots wurden anhand von standardisierten Protokollen im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Stefanie Dimmeler in Frankfurt durchgeführt.

Gewebeproben von Infarkt- und nicht-infarziertem Herzgewebe sowie Lunge, Leber, Milz und Niere wurden entnommen, aus denen die enthaltene RNA mit dem miRNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert und die Real-time PCR mit microRNA Assays am StepOnePlus-Gerät (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt wurden.

Die Immunoblot-Analyse wurde erstellt, indem 50 µg der Gewebeprobe mit 4x Protein Loading Dye gemischt und die Proteine mittels Erhitzung auf 95 °C für 5 min denaturiert wurden. Danach erfolgte die Auftragung der Proben auf einen vorgefertigten Gradienten von 8 - 16 % SDS-Polyacrylamidgel zur Separation mittels Elektrophorese. Die Proteine wurden im Anschluss auf eine durch einminütiges Alkoholbad aktivierte Polyvinyliden-Fluorid-Membran aufgebracht. Dabei erfolgte der Nasstransfer für 1,5 h bei 20 W. Um unspezifische Antikörperbindung an der Membran zu verhindern, wurde diese im Vorfeld mit 5 % Milch + 2 % Esel-Serum in TBS mit 0,1 % Tween-20 (TBS-T) (Roth AG, Arlesheim, Schweiz) für 60 min bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Itga5; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) 1 : 3000 in 5 % BSA in TBS-T gelöst über Nacht inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für 10 min in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen und dann mit Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem sekundären Antikörper (anti-rabbit, 1:4000 in 2,5 % Milch in TBS-T; Cell Signaling, Danvers, MA, USA) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Visualisierung wurde die Membran nochmals dreimalig in TBS-T gewaschen und mit Enhanced Chemiluminescence Reagent nach Herstellerangaben (Amersham ECL, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) inkubiert. Die Aufnahmen wurden am Fluorchem M (Proteinsimple, Santa Clara, CA, USA) angefertigt.

2.1.2 Färbungen

2.1.2.1 Infarktfröbung und –größenbestimmung

Die Differenzierung der Gewebsareale in AAR, Infarkt- und Kontrollareal und Verifizierung der vorherig gewählten Sonomikrometrie-Messstellen erfolgte durch eine Färbung mittels Methylenblau-Injektion in nicht-infarziertes Gewebe nach Umstechung und Ligation (Vicryl 1 CTX Plus, Ethicon, Brüssel, Belgien) der LAD am Ort der stattgehabten Okklusion durch Injektion von 20 ml Methylenblau in den linken Ventrikel. Das manuell druckkontrolliert (80 – 100 mmHg) durch die Koronarien gepumpte Methylenblau färbte in Folge das Kontroll-Areal blau an, während die Area at Risk ungefärbt blieb. Zusätzlich wurden 10 ml 10 % Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in PBS gelöst und in die kanülierte LAD injiziert [87]. TTC dient dabei als Redoxindikator für die Zellatmung und nimmt in Gegenwart von Reduktionsäquivalenten eine intensive Rotfärbung an. So konnte vitale Area at Risk visuell vom Infarktgewebe unterschieden werden.

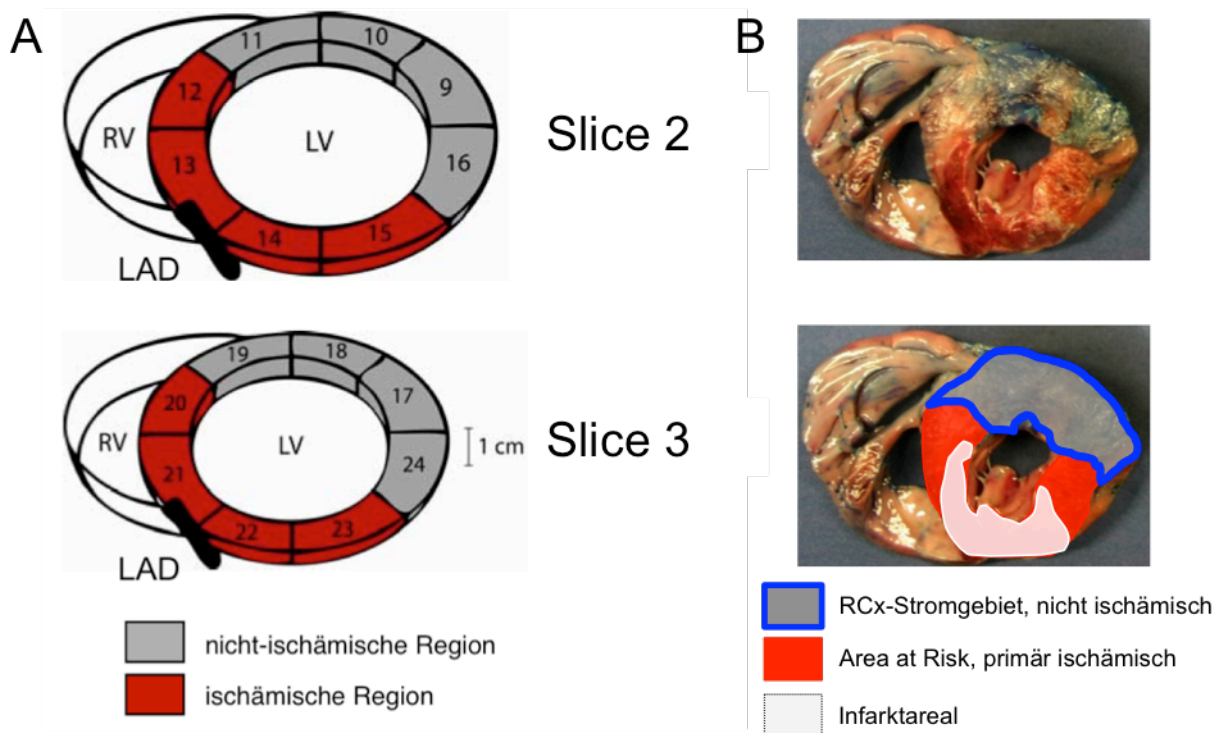


Abbildung 4: schematische Aufteilung der linksventrikulären Slices in Abhängigkeit des Perfusionsareals (A) und Beispielbild histochemisch angefärbter Slices (B oben) und farblicher Verdeutlichung der Perfusions- und Infarktareale (B unten)

Für Folgeuntersuchungen wurde das entnommene Herz senkrecht zur Herzachse in Scheiben (Slices) von 10 mm Dicke geschnitten. Die Slices wurden für die spätere Vermessung des Infarkt-, AAR- und linksventrikulären Volumens fotografiert (Digital Mavica MVC-FD81, Sony). Anhand planimetrischer Bestimmung der digitalen Aufnahmen der gefärbten Slices erfolgte die Infarktgrößenbestimmung (SigmaScan, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland). Transmurale Gewebeproben aus Infarktareal, Area at Risk und Kontrollareal wurden zum Zwecke histochemischer Untersuchungen entnommen und im Anschluss bei - 80 °C aufbewahrt. Zur Auswertung wurden die Slices 2 und 3 (s. Abb. 4) herangezogen.

2.1.2.2 Quantifizierung der Mikrozirkulation

Mittels PECAM-1-Immunofluoreszenzfärbung wurden Kapillaren in Gewebsschnitten der AAR immunhistochemisch nach Herstellerprotokoll gefärbt: Im Anschluss an eine 10-minütige Fixierung in Aceton (Roth AG, Arlesheim, Schweiz) der Gefrierschnitte und dem dreimal 5 min Waschen in PBS erfolgte das Blocking mittels 2 % BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) + 0,2 % Tween (Roth AG, Arlesheim, Schweiz) in PBS über 30 min. Nach dreimal 5 min Waschen in PBS wurde der primäre PECAM-1-Antikörper (sc-13537, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland) in einer Konzentration von 1 : 50 in Antibody Diluent (Dako, Hamburg, Deutschland) gelöst auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert gefolgt vom dreimaligen Waschen in PBS und der Zugabe des sekundären Antikörpers (donkey anti-goat IgG-R, sc-2094, Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland; ebenfalls 1 : 50 in Antibody Diluent), der für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubierte. Schließlich erfolgte die Kernfärbung mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (VECTASHIELD[®] Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und das Eindeckeln der Schnitte. Zur Quantifikation wurden bei allen folgenden Färbungen je 3 repräsentative Aufnahmen ausgewertet.

2.1.2.3 Detektion der Apoptoserate im Herzgewebe

Die TUNEL-Immunofluoreszenzfärbung erfolgte zur Detektion apoptotischer Zellen in Gefrierschnitten mithilfe des ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit (EMD Millipore, Schwalbach, Deutschland) anhand des Herstellerprotokolls. Zur selektiven Darstellung von Kardiomyozyten wurden die Schnitte zusätzlich mit einem primären Anti-Troponin-I-Antikörper (ab19615, Abcam plc, Cambridge, UK) und einem sekundären Antikörper (Alexa Fluor® 594 goat anti-mouse IgG, Eugene, OR, USA) immunhistochemisch markiert. Beide Antikörper wurden in einer Konzentration von 1 : 200 in Antibody Diluent (s.o.) gelöst verwendet. Zur Anfärbung des Zellkerns wurde vor dem Eindeckeln 4,6-Diamidin-2-phenylindol (s.o.) auf die Schnitte gegeben.

2.1.2.4 Detektion der Apoptoserate in der Zellkultur

Die Bestimmung apoptotischer Zellen aus der Zellkultur wurde mittels Trypanblaufärbung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) oder alternativ mit TUNEL-immunhistochemischer Färbung durchgeführt.

Bei Letzterer wurde das In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland), das Streptavidin-Biotin Kit, New Fuchsin Substrate System (beide von Dako, Hamburg, Deutschland) und Mayers Hämalaun (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Hierbei wurden nach einer 30-minütigen Fixierung in PBS + 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur mittels PBS + 0,1 % Tween20 (Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) permeabilisiert und anschließend 15 min mit PBS + 1 % H₂O₂ behandelt. Danach wurde der TdT-Mix (100 µl bestehend aus 99,4 µl TUNEL Dilution Buffer + 0,3 µl Biotin-16-dUTP + 0,3 µl TdT (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) bei 37 °C für 30 min aufgetragen. Es folgte die Behandlung mit 5 % Magermilch und das Auswaschen mit PBS und H₂O_{dest.} Für 60 min bei Raumtemperatur wurde Streptavidin-AP-Konjugat in einer Verdünnung von 1 : 100 in 0,1 M Trisphosphatpuffer aufgetragen. Schließlich wurden die Schnitte 5 min lang bei Raumtemperatur mit 6 µl Fuchsin-Chromogen + 6 µl Aktivierungs-Agens pro 100 µl

Lösung und anschließend 3 min lang mit Mayers Hämalaun gefärbt. Die Fixierung erfolgte mit Gelatine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Zusätzlich wurden zur Apoptose-/Nekrosedetektion Durchflusszytometrie-Messungen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden nach Herstellerangaben mit dem TACS Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) behandelt. Anschließend erfolgte die Zellsortierung und -quantifizierung im Flow-Cytometer (COULTER EPICS XL; Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).

2.1.3 Bestimmung der Entzündungsreaktion im Herzgewebe

Die Messung der Myeloperoxidase-Aktivität erfolgte als Maß für die akute Entzündungsreaktion des Myokardgewebes, da das Enzym vorwiegend in neutrophilen Granulozyten vorhanden ist und diese in erster Linie den Beginn und das Ausmaß des akuten Entzündungsgeschehen nach stattgehabtem Myokardinfarkt bestimmen (s.o.).

Zur Gewinnung der Messproben wurden 150 mg Myokardgewebe abgewogen und in 3 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH = 6,0) mit 0,5 % HTAB (Hexadecyltrimethylammonium Bromid, Sigma Ultra, Steinheim, Deutschland) zerkleinert (Ultra-Turrax, IKA-Werk GmbH & CoKG, Staufen, Deutschland). Das Gemisch wurde im Anschluss dreimalig eingefroren und aufgetaut. Im Anschluss daran wurde das Gemisch für 30 min bei 15 °C und bei 40000 g zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden zur MPO-Aktivitätsmessung eingesetzt.

Zu jeder Gewebeprobe wurden jeweils ein Leerwert und zwei Probenwerte bestimmt, die im Anschluss gemittelt wurden. Die Leerwertprobe setzte sich aus 2,9 ml Phosphatpuffer (pH = 6,0), 0,53 mM O-Dianisidin als Redoxindikator (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 100 µl Probengemisch zusammen. Die Messprobe wurde zusätzlich mit 0,15 mM H₂O₂ versetzt, um eine Enzymreaktion hervorzurufen.

Am Photometer (Ultrospec Plus, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) erfolgte bei einer Wellenlänge von 460 nm die Messung der Extinktion. Anhand dieser wurde mittels einer Eichkurve auf den Gehalt neutrophiler Granulozyten pro Gramm Myokardgewebe geschlossen.

2.2 In vitro-Versuche

2.2.1 Hypoxie – Reoxygenierung

2.2.1.1 Einfache Versuchsdurchführung

Als kardiomuskuläre Zelllinie wurden HL-1-Zellen, als endotheliale Zellen HUVEC bzw. BEnd.3-Zellen verwendet und bei 37 °C in Claycomb-Medium bzw. DMEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) kultiviert. Sie wurden in 24-Wellplatten ausplattiert und 24 h vor Hypoxie mit 500 nM LNA-92a oder Kontroll-LNA behandelt und einer 18-stündigen Hypoxie und 4 Stunden Reoxygenation ausgesetzt. Vor Hypoxie erfolgte ein Mediumwechsel, um die LNA-Einwirkung vor Hypoxie zu terminieren.

Im Anschluss wurden in allen Hypoxie-Reoxygenierungsversuchen apoptotische Zellen mithilfe einer Trypanblau- oder immunhistochemischer TUNEL-Färbung (s.u.) angefärbt und anhand von drei repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) pro Well quantifiziert.

2.2.1.2 Kokultur-Versuch

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurden HL-1- und BEnd.3-Zellen kokultiviert (s. Abb. 5), um indirekte Effekte auf das Zellüberleben, wie sie bereits für miRNAs beschrieben wurden [65], zu untersuchen.

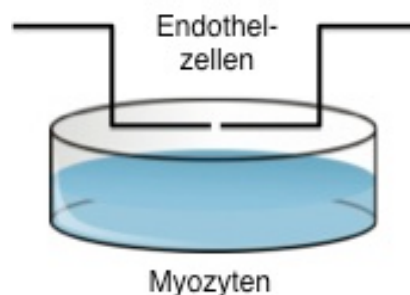


Abbildung 5: Darstellung des Co-Kultur-Versuchs

Dabei war der Versuchsablauf identisch zum oben beschriebenen. Lediglich die in den Inserts befindlichen Zellen wurden mit LNA-92a beziehungsweise Kontroll-LNA behandelt oder unbehandelt belassen, um die Einwirkung von den in den Inserts

befindlichen Zellen produzierten Faktoren auf die in den Kulturschälchen lokalisierten Zellen zu beobachten.

2.2.1.3 Versuch mit konditioniertem Medium

Als Erweiterung der Kokultur-Versuche erfolgten Experimente mit konditioniertem Endothelzell-Medium. Dabei wurden zuerst bEnd.3-Zellen für 24 h mit 500 nM LNA-92a behandelt und einer anschließenden Hypoxie bzw. Normoxie von 12 h unter vorangegangenem Mediumwechsel ausgesetzt. Daran schloss sich die Gewinnung des Endothelzellmediums an, das dann zu HL-1-Zellen hinzugefügt wurde. Diese durchliefen ihrerseits eine 18-stündige Hypoxie und 4 h Reoxygenation vor Quantifizierung der Apoptoserate (s. auch Abb. 6).

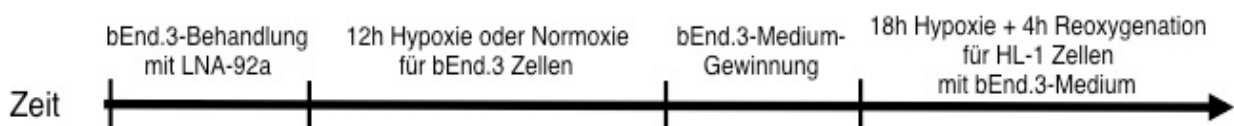


Abbildung 6: Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Versuchs

2.2.2 Flusskammer-Versuch

Des Weiteren wurde ein direkter Effekt der LNA-92a-Behandlung auf die Entzündungsreaktion mithilfe von Flusskammerversuchen untersucht.

Dazu wurden HUVECs in Mikro-Slides (μ -Slide VI^{0.4} Flow Kit, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) ausgesät und mit 500 nM LNA-92a oder Kontroll-LNA behandelt bzw. unbehandelt belassen. THP-1-Zellen wurden gegensinnig mit 500 nM LNA-92a oder Kontroll-LNA behandelt bzw. unbehandelt belassen und zur Detektierbarkeit mit Vybrant DiO Cell-Labeling Solution (invitrogen, Leiden, Niederlande) nach Herstellerprotokoll angefärbt. 24 h nach Aussaat erfolgte bei geschlossener Zellschicht die Stimulation der HUVECs mittels 15 ng / ml Medium TNF α (Recombinant Human TNF- α Lyophilized, invitrogen, Leiden, Niederlande).

18 h später wurde die HUVEC-Zellschicht mit 750000 THP-1-Zellen / ml bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,57 ml / min für 8 min (= 1dyn/cm²; Harvard apparatus, South Natick, USA) überspült. Es schloss sich eine Waschung mit Medium für 1 min

bei gleicher Flussgeschwindigkeit an, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Auszählung adhärenente Zellen anhand 3 repräsentativer Aufnahmen pro Slide.

2.3 In vivo-Versuche

2.3.1 Versuchstiere

Bei den für die Versuche verwendeten Tieren handelte es sich um Deutsche Landschweine, die vom Lehr- und Forschungsgut der LMU in Oberschleißheim bezogen wurden.

Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006). Gemäß § 8 Abs. 1 wurde die Studie von der Regierung Oberbayern mit dem Aktenzeichen 55.2.-1-54-2532-141-11 genehmigt und mit Zustimmung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden in acht Gruppen, davon sechs mit $n = 5$ Tieren im Rahmen der 72-stündigen Reperfusion und zwei mit $n = 3$ Tieren unter 7-tägiger Reperfusion eingeteilt. Das Gewicht der Tiere betrug im Mittel 25 kg.

Die Haltung der Versuchstiere und die Durchführung der Versuche fanden in den Räumlichkeiten und mit Unterstützung des Walter-Brendel-Zentrums in Großhadern statt.

2.3.2 Versuchsablauf

Den anästhesierten Tieren wurde nach Messung der basalen Herzfunktion an Tag 0 eine Ischämie in der LAD für 60 min gesetzt. Nach 55-minütiger Ischämie begann das Zeitfenster der Therapie für 10 min. Die Tiere durchliefen nach Beendigung der Narkose eine Reperfusionsdauer von 72 h bzw. 7 Tagen. Es erfolgte die wiederholte Messung der Herzfunktion und Explantation der Herzen zur weiteren Analyse von Infarktgröße, Apoptose und Inflammationsreaktion (s. auch Abb. 7).

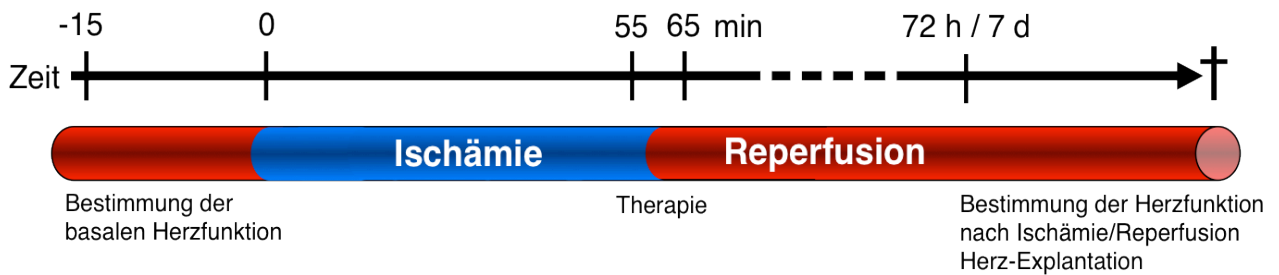


Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf des Ischämie-/Reperusionsversuchs im Schwein

2.3.2.1 Präparation der Versuchstiere

Die Einleitung der Narkose erfolgte im Tierstall mittels i.m. Injektion von 10 mg/kg Körpergewicht (KG) Azaperon (Stresnil, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland), 20 mg / kg KG Ketamin (Ketamin Inresa, Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) und 0,04 mg / kg KG Atropin (Atropinsulfat-Lösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland).

Über den anschließend gelegten Zugang zu einer Ohrvene wurden 0,2 mg / kg KG Midazolam (Midazolam ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) sowie 0,002 mg / kg KG Fentanyl (Fentanyl-Janssen 0,5 mg Injektionslösung, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) mit flankierender Spülung des Zugangs durch isotone NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verabreicht.

Im Anschluss daran fanden die endotracheale Intubation und Beatmung (Servo Ventilator 900 C, Siemens, München, Deutschland) sowie die Platzierung und Fixierung des Versuchstieres auf dem Operationstisch statt. Die Narkoseüberwachung wurde mittels Einthoven-Ableitungen im EKG (Sirecust 304 D, Siemens, München, Deutschland) und Pulsoxymetermessung (Biox 3700e Puls-Oxymeter, DATEX-OHMEDA, GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien) gewährleistet.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden intravenös kontinuierlich via Perfusor® (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 10 mg / kg KG / h Propofol (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland), HES (Hydroxyethylstärke 6 %, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland), 0,9 % NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit je 6 mg / kg KG Amiodaronhydrochlorid (Cordarex, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt,

Deutschland) und 0,2 mg / kg KG Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Magnesiumsulfat Inresa, Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) versetzt und bei Bedarf zusätzlich Midazolam und Fentanyl (s.o.) per Bolus verabreicht. Im Anschluss an die abschließende Erhebung der hämodynamischen Parameter wurden vor Myokardexplantation zusätzlich 0,002 mg / kg KG Fentanyl (s.o.) und 0,16 mg / kg KG Pancuronium (Pancuronium Inresa, Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland) appliziert und das Herz durch eine intrakardiale Injektion von 10 ml KCl zum Stillstand gebracht.

Voraussetzung für die Interventionen an allen Versuchstieren war der Zugang zu Vena jugularis externa und Arteria carotis interna durch Katheterschleusen einer Größe von 11 French für die Vene bzw. 9 French für die Arterie (Avanti+ Introducer, Cordis Europa, Waterloo, Belgien bzw. Radifocus® Introducer II, Terumo Cooperation, Leuven, Belgien). Die Gefahr einer Thrombusbildung durch Gefäßmanipulation wurde mittels Bolusgabe von 400 I.E. / kg KG Heparin (Heparin-Natrium, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vor Schleusenplatzierung verringert. Die Induktion der 60-minütigen Myokardischämie wurde mittels Inflation eines PTCA-Ballonkatheter (Pro-Kinetic 2.5/20, Biotronik SE & Co. KG, Berlin, Deutschland) mit 6 atm distal des ersten Diagonalastes der LAD gewährleistet. Unter Kontrastmittelgabe (Imeron 350, Bracco Imaging, Konstanz, Deutschland) und Röntgenkontrolle (Exposcop 8000 C-Bogen, Ziehm Imaging GmbH, Nürnberg, Deutschland) erfolgte die korrekte Platzierung des Ballons und der Beginn der Reperfusion nach 60 min angiographisch.

2.3.2.2 LNA-Applikation

Alle verwendeten LNAs wurden von miRagen Therapeutics (Boulder, CO, USA) bezogen. Die Kontroll-LNA besteht aus einer Sequenz, die gegen eine *Caenorhabditis elegans*-spezifische miRNA gerichtet ist.

Dem Vergleich verschiedener Applikationsformen wurde durch die Einteilung in sechs Versuchsgruppen Rechnung getragen: Die Kontrollgruppe erhielt lediglich eine PBS-Injektion von 2 ml und keine LNA. Der Kontroll-LNA-Gruppe wurden in 2 ml PBS antegrad mit 5 mg unspezifischer LNA / kg Herzgewicht (= 0,03 mg/kg Körpergewicht) verabreicht; ebenso wie den LNA-92a-Applikationsgruppen 2 ml PBS

mit 5 mg LNA-92a / kg Herzgewicht antegrad mittels OTW-PTCA-Ballonkatheter (s.o.) bzw. retrograd via SSR (Myoprotect SSR, PTC, Möling, Österreich) appliziert wurden wie bei Kupatt et al. [87] beschrieben. Die Gruppe mit Applikation der erhöhten LNA-Konzentration erhielt die fünffache LNA-92a-Konzentration (25 mg LNA-92a / kg Herzgewicht). Ebenso erhielt die Gruppe, die eine siebentägige Reperfusion durchlief, 25 mg LNA-92a / kg Herzgewicht auf antegradem Weg. Der Gruppe mit systemischer LNA-92a-Applikation wurden 5 ml PBS mit ebenfalls 5 mg LNA-92a / kg Herzgewicht intravenös verabreicht (s. Tab. 1).

Das zehnminütige Zeitfenster der Applikation begann nach 55 min Ischämie bei leichter Deflation des Ballonkatheters und endete nach 5 min Reperfusion.

experimentelle Gruppe	Applikationsart	LNA-Konzentration in PBS
Kontrolle	antegrad	keine
LNA Kon	antegrad via OTWC	5 mg unspezifische LNA / kg Herzgewicht
LNA-92a ante	antograd via OTWC	5 mg LNA-92a / kg Herzgewicht
LNA-92a retro	retrograd via SSR	5 mg LNA-92a / kg Herzgewicht
LNA-92a ante x5	antegrad via OTWC	25 mg LNA-92a / kg Herzgewicht
LNA-92a i.v.	antegrad i.v.	5 mg LNA-92a / kg Herzgewicht
LNA-L	antegrad via OTWC	25 mg LNA-92a / kg Herzgewicht

Tabelle 1: Vergleich von Applikationsarten und applizierten LNA-Konzentrationen in Bezug auf die experimentelle Gruppe

2.3.2.3 Messung hämodynamischer Basisparameter

Zu Beginn jedes Versuches an Tag 0 und vor der Myokardexplantation an Tag 3 bzw. 7 wurden hämodynamische Basisparameter erhoben. In diesem Zusammenhang erfolgte einerseits die Messung des arteriellen Drucks (AP) als Maß für die systemische Zirkulation. Andererseits wurden der linksventrikuläre Druck (LVP) als Maß für die Pumpfunktion des linken Ventrikels [5] und die subendotheliale Segmentverkürzung (SES) als Parameter für die regionale Kontraktilität des Myokards bestimmt.

Sämtliche Aufzeichnungen von Messwerten erfolgte zeitkorreliert durch das Programm CardioSOFT (3.1.5, Sonometrics Corporation, London, Ontario, Kanada). Als Zeitpunkt der Messung von LVEDP und enddiastolischer Segmentlänge (EDL) wurde das Ende der Diastole am maximalen R-Zackenausschlag im EKG bzw. zu Beginn des Anstiegs des $dLVP/dt$ definiert [64]. Für die Messung der endsystolischen Segmentlänge (ESL) wurde der Messzeitpunkt in das Minimum des LVPs ($dLVP/dt_{min}$) gelegt.

Die Druckkurvenverläufe und das EKG wurden jeweils über eine Minute hinweg aufgezeichnet und anschließend anhand fünf repräsentativer Herzschläge gemittelt ausgewertet.

2.3.2.3.1 Arterielle Druckmessung

Ein konstanter systemischer Perfusionsdruck ist essentiell für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Organperfusion. Als Maß für die Kreislaufstabilität, Auswurfkraft des Herzens und den peripheren Gefäßwiderstand wurde der zentralarterielle Druck bei jedem Versuch über eine Verbindung zur arteriellen Schleuse abgegriffen.

Letztere wurde kurz hinter dem Abgang der Arteria carotis aus dem Aortenbogen bzw. der Truncus brachiocephalicus platziert. Die Druckmessung erfolgte über einen mit isotoner Kochsalzlösung gefüllten, Luftblasen-freien Druckabnehmer. Dieser wurde im Vorfeld jedes Versuches zum Umgebungsdruck auf 0 mm Hg und einen vorgegebenen Wert von 100 mm Hg geeicht.

2.3.2.3.2 Globale linksventrikuläre Herzfunktion

Ein vorangegangener Myokardinfarkt resultiert in Abhängigkeit von der Infarktgröße in einer verminderten kardialen Pumpfunktion, die wiederum zu einer herabgesetzten Ejektionsfraktion und somit sekundär zu einer gesteigerten Vorlast im linken Ventrikel führt. Die Erhebung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks eignet sich als Parameter für das Vorwärtsversagen des linken Ventrikels im Sinne einer linksventrikulären Herzinsuffizienz, da das Auftreten erhöhter linksventrikulärer Füllungsdrücke entsprechend dem klinischen NYHA-Stadium I der beginnenden

Herzinsuffizienz das erste pathophysiologisch auftretende Merkmal der noch kompensierten Herzinsuffizienz ist. Mittels Frank-Starling-Mechanismus führt die erhöhte Vordehnung des Ventrikelmyokards zur Kompensation der beginnenden Herzinsuffizienz.

2.3.2.3.2.1 Ejektionsfraktion

Zur Quantifizierung der Auswurfleistung des Herzens erfolgten linksventrikuläre Angiografien mit Kontrastmittel (s.o.) unter Ruhebedingungen (HF etwa 80/min) und Pacing (HF 120/min, 150/min), die mit *ImageJ* planimetriert wurden. Dabei wurden das minimale (endsystolische, ESV) und maximale Ventrikelvolumen (enddiastolische, EDV) planimetrisch bestimmt und wie folgt in Relation gesetzt [156]:

$$EF (\%) = (EDV - ESV) / EDV .$$

2.3.2.3.2.2 Linksventrikulärer Druck

Die Aufnahme der linksventrikulären Druckmessung (LVP) wurde mittels Pigtail-Conductance-Katheter (Mikro-Tip® Catheter, Millar Instruments Inc., Houston, Texas, USA) unter Ruhebedingungen (Baseline) und Funktionsreserve-Bedingungen (Pacing, Herzfrequenz 120 / min, 150 / min) durchgeführt. Die Eichung der Geräte erfolgte vor jeder Versuchsdurchführung auf die festgelegten Werte 0 mm Hg bzw. 100 mm Hg.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Parametern wurde anhand der linksventrikulären Druckkurve die erste Ableitung dieser nach der Zeit ($dLVP/dt$) bestimmt. Dieser Wert dient der Beurteilung der linksventrikulären Druckentwicklung ($dLVP$) unter Berücksichtigung der Kontraktionsgeschwindigkeit (pro dt). Es erfolgt die qualitative Bestimmung der myokardialen Pumpkraft und dient damit auf Basis der physikalische Kraft, Masse und (Kontraktions-)Geschwindigkeit linear in Beziehung setzenden Formel

$$F = m \times v = m \times (dLVP/dt)$$

als Maß für die Bewertung des inotropen myokardialen Funktionszustandes.

Für die Pacing-Bedingung wurde zusätzlich unter Röntgenkontrolle eine Schrittmacherelektrode (Medtronic 5375 Demand Pulse Generator, Medtronic, Minneapolis, USA) an der Wand des rechten Herzhohrs platziert und die Herzfrequenz am EKG überprüft.

2.3.2.3.3 Regionale Herzfunktion (Sonomikrometrie)

Die Messung der subendothelialen Segmentverkürzung (SES) als Parameter der regionalen Myokardfunktion resultiert aus der Annahme einer wesentlich veränderten Kontraktilität von vitalem Myokardgewebe mit physiologischer Kontraktionsfähigkeit zu narbig umgebautem Gewebe mit einer unvollständigen Restkontraktilität [132], die vor allem durch Myofibroblasten gewährleistet wird [48, 78, 49, 109]. Zudem gilt das subendokardiale Myokard als „letzte Wiese“ der Perfusion, ist somit am ehesten von einer Ischämie betroffen und gestattet dadurch eine Differenzierung von vitalem und durch Ischämie/Reperfusion eingeschränkt funktionsfähigem Areal.

Die Messung der SES wurde via Sonomikrometrie durchgeführt [87]. Nach medianer Sternotomie und Eröffnung des Perikards an Tag 3 wurden zwei Ultraschallkristalle (Sonometrics Corporation, London, Ontario, Canada) subendokardial je im Myokardgewebe der Area at Risk, des Infarkt- und Kontrollareals nach vorangegangener Stichinzision (Disposable Scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co., Japan) des Myokards perpendicular zur LAD platziert. Der Abstand zur LAD-Verschlußsstelle betrug dabei definitionsgemäß für die AAR 1 cm beziehungsweise 4 cm für das Infarktareal. Im Kontrollareal, das sich im durch den Ramus circumflexus arteriae coronariae sinistrae (RCX) perfundierten Hinterwandgebiet befindet, wurde ein Kristallpaar im längs der Kontraktionsbewegung befindlichen Myokardgewebe eingebracht. Der Abstand der Kristalle zueinander maß jeweils etwa 1 cm.

Die Kristalle fungierten beim Messvorgang als Transceiver, also abwechselnd als Sender und Empfänger. Die Laufzeitdifferenzen der piezoelektrischen Signale zueinander werden als Sonomikrometriekurven zur Kontraktilitätsbestimmung auf Basis maximaler (enddiastolischer) und minimaler (endsystolischer) Segmentlängen aufgezeichnet. Unter Baseline-Bedingungen sowie Pacing (Herzfrequenz 100 bzw. 130 bzw. 150 / min) erfolgte die Erhebung des SES. Angegeben ist die

Segmentverkürzung als prozentuale Veränderung der Segmentlänge. Diese ergibt sich mit der Formel

$$\text{SegmentShortening (\%)} = (EDL - ESL) / EDL \times 100$$

aus der Differenz von enddiastolischer (EDL) Ausgangs- und endsystolischer (ESL) Länge bei maximaler Kontraktion im Verhältnis zur enddiastolischen Ausgangslänge.

2.4 Statistik

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Zunächst wurden die Resultate der einzelnen Versuchsgruppen im einseitigen ANOVA-Test auf signifikante Abweichungen überprüft. Bei Auftreten einer solchen, also dem Verwerfen der Nullhypothese, schloss sich ein *multiple comparison test* (Student-Newman-Keul-Test) an. So wurden signifikante Unterschiede der einzelnen Gruppen untereinander eruiert. Beim Vorliegen von nur zwei zu vergleichenden Gruppen wurde ein Student-t-Test durchgeführt.

Als signifikantes Ergebnis wurde $p < 0,05$, als hochsignifikantes $p < 0,01$ angesehen. Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 20.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 miR-92a-Expression

Die Effizienz der LNA-92a-vermittelten miR-92a-Suppression wurde relativ zur Expression des Housekeeping-Gens U6 mittels Realtime-PCR im Myokardgewebe bestimmt, das entweder antegrad (LNA-92a ante), retrograd (LNA-92a retro) oder systemisch (LNA-92a i.v.) therapiert bzw. mit Kontroll-LNA (LNA Kon) oder nur mit PBS (Kontrolle) behandelt wurde.

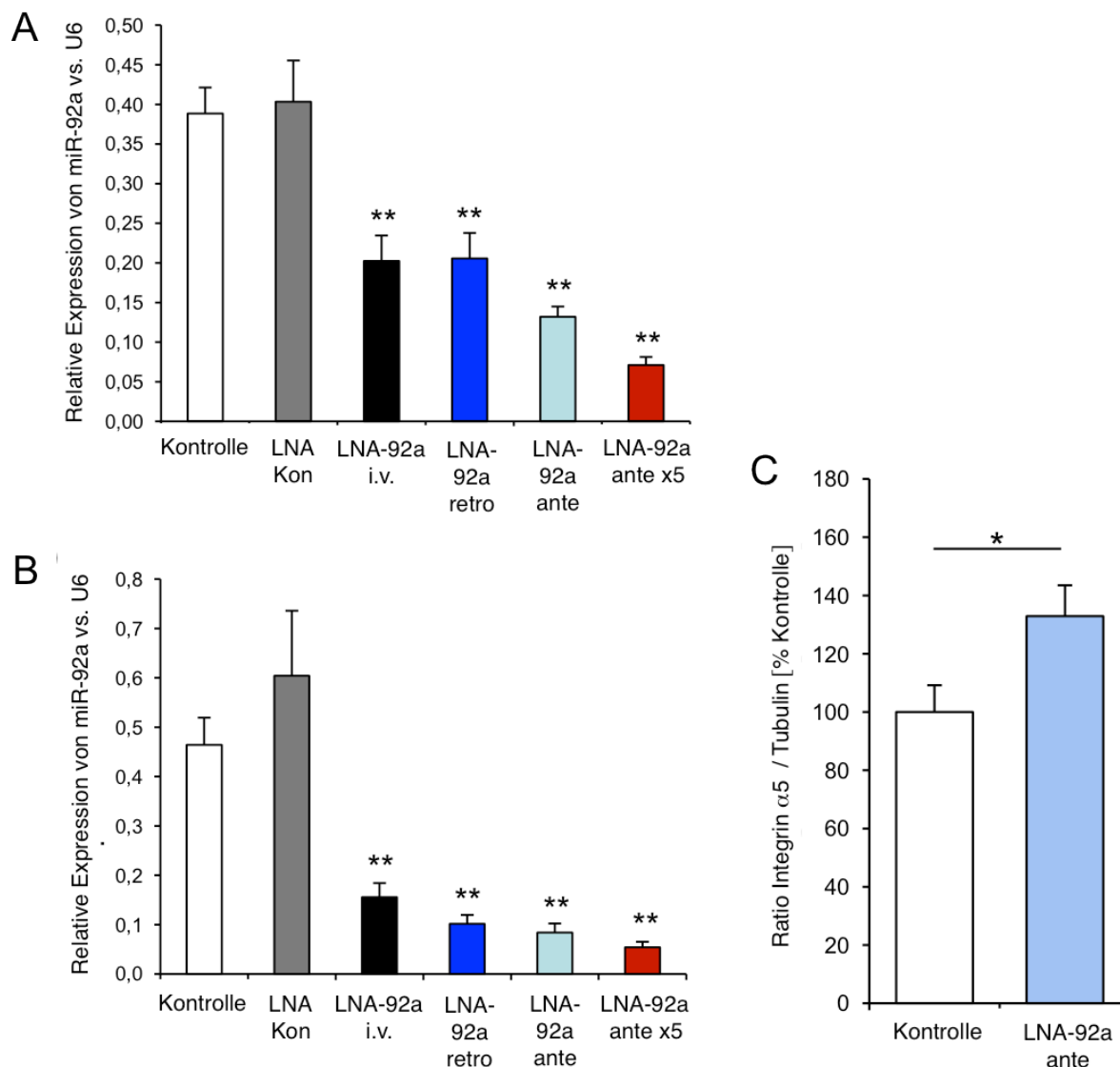


Abbildung 8: relative Expression von miR-92a im nicht-ischämischen (A) und im Infarktareal (B) und relative Integrin $\alpha 5$ -Expression verglichen mit Tubulin (C). *Mean \pm SEM, * $p < 0,05$ bzw. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle*

Die LNA-92a-Applikation reduzierte dabei die miR-92a-Expression im Infarktareal in allen drei Therapiegruppen signifikant (A: 8 ± 2 %; R: 10 ± 2 %; S: 16 ± 3 % vs. PBS 46 ± 5 %; Abb. 8 B). Nach Behandlung mit hochkonzentrierter LNA-92a (LNA-92a ante x5) konnte ein Trend zu einer zusätzlichen Reduktion der miR-92a-Expression bis auf 5 ± 1 % beobachtet werden. Auch in den nicht-infarzierten Arealen des Herzens (Abb. 8 A) zeigte sich eine signifikante Expressionsminderung in allen Therapiegruppen, jedoch war der Effekt der miR-92a-Expression in den Gruppen mit systemischer und retrograder Applikation schwächer (Abb. 8 A/B). Außerdem war die miR-92a-Expression erwartungsgemäß im infarzierten Kontrollgewebe nach PBS- (1,19-fach) und Kontroll-LNA-Behandlung (1,50-fach) erhöht (Abb. 8 A/B). Korrespondierend zur signifikanten miR-92a-Suppression zeigte sich eine vermehrte Expression des Zielproteins Integrin $\alpha 5$ im Herzgewebe nach LNA-92a-Behandlung (Abb. 8 C).

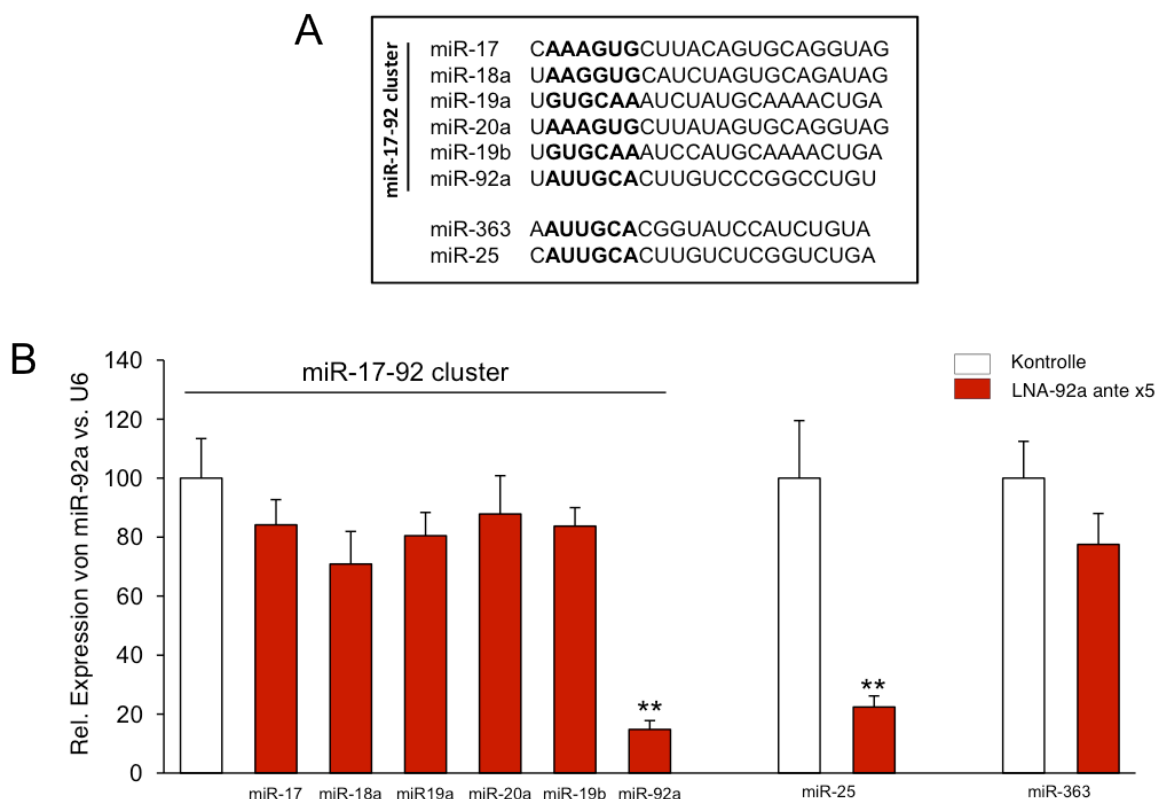


Abbildung 9: Sequenz des miR-17~92-Cluster im Vergleich zu miR-25 und miR-363 (A); relative Expression des miR-17~92-Clusters und miR-25, -363 nach Behandlung mit LNA-92a in hoher Dosis (B). Mean \pm SEM, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle

Die Spezifität der LNA-92a für die miR-92a wurde im Weiteren untersucht, indem die Expression der Mitglieder des miR-17~92-Clusters und der miR-363 (Abb. 9 A) nach Applikation der hochdosierten LNA-92a-Gabe verglichen wurde.

Lediglich eine signifikante Reduktion der miR-92a und miR-25, jedoch nicht der anderen miRs des miR-17~92-Clusters oder der miR-363 wurde beobachtet (Abb. 9 B).

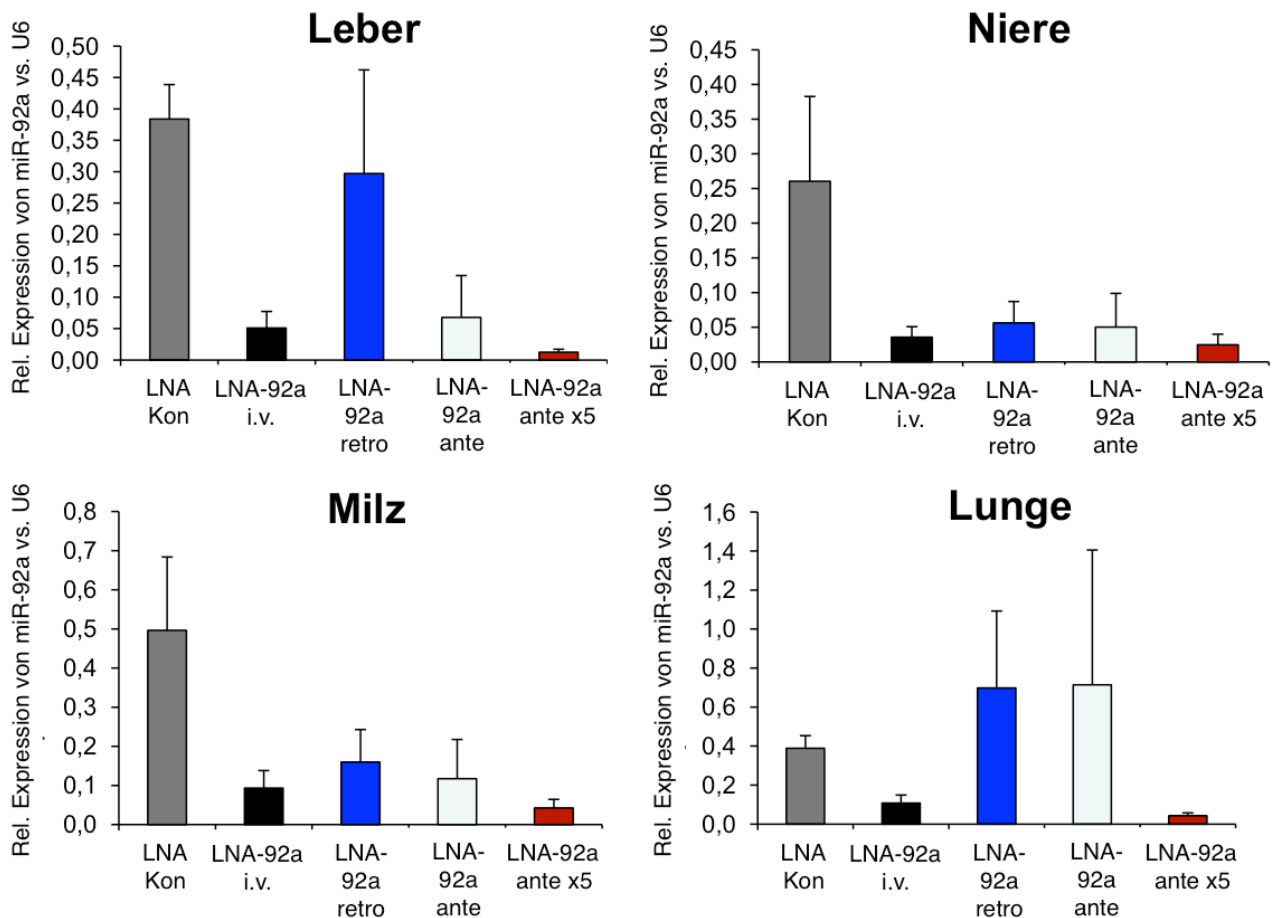


Abbildung 10: Repräsentative Expressionsanalyse der miR-92a-Expression in Leber (A), Niere (B), Milz (C) und Lunge (D). $n = 3$

Um die Auswirkungen der regionalen und systemischen LNA-92a-Applikation beurteilen und damit auch einen Anhalt für mögliche Nebeneffekte der Applikation zu erhalten, wurde das miR-Expressionsmuster in verschiedenen Geweben nach ante-, retrograder und systemischer LNA-92a-Applikation verglichen.

In Niere und Milz reduzierten alle LNA-92a-Applikationen dosisabhängig die miR-92a-Expression deutlich. In der Leber konnte durch retrograde LNA-92a-Applikation die miR-92a-Expression geschont werden. Im Lungengewebe zeigte sich die miR-

92a-Expression durch regionale LNA-92a-Gabe nicht vermindert. Insgesamt konnte nach regionaler Gabe der LNA-92a eine weniger starke Suppression der miR-92a beobachtet werden (Abb. 10).

3.2 Herzfunktion und Hämodynamik

3.2.1 Infarktgröße

Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte planimetrisch und ergab, dass die regionale LNA-92a-Gabe zu einer Reduktion dieser (in % AAR) von 56 ± 4 % (K) und 57 ± 2 % (nach PBS-Injektion) auf 32 ± 5 % in der antegraden, 36 ± 4 % in der retrograden LNA-92a-Gruppe und 34 ± 2 % nach Applikation der fünffachen Konzentration führte, während sich die systemische Applikation von LNA-92a als wenig effektiv erwies (50 ± 3 %; Abb. 11 A/B). Somit konnte eine maximale Reduktion der Infarktgröße nach antegrader LNA-92a-Behandlung von 40 % (relativ) erzielt werden.

Das Ausmaß der AAR und damit die Größe der primär ischämischen Zone unterschied sich in keiner der Gruppen signifikant (Abb. 11 C).

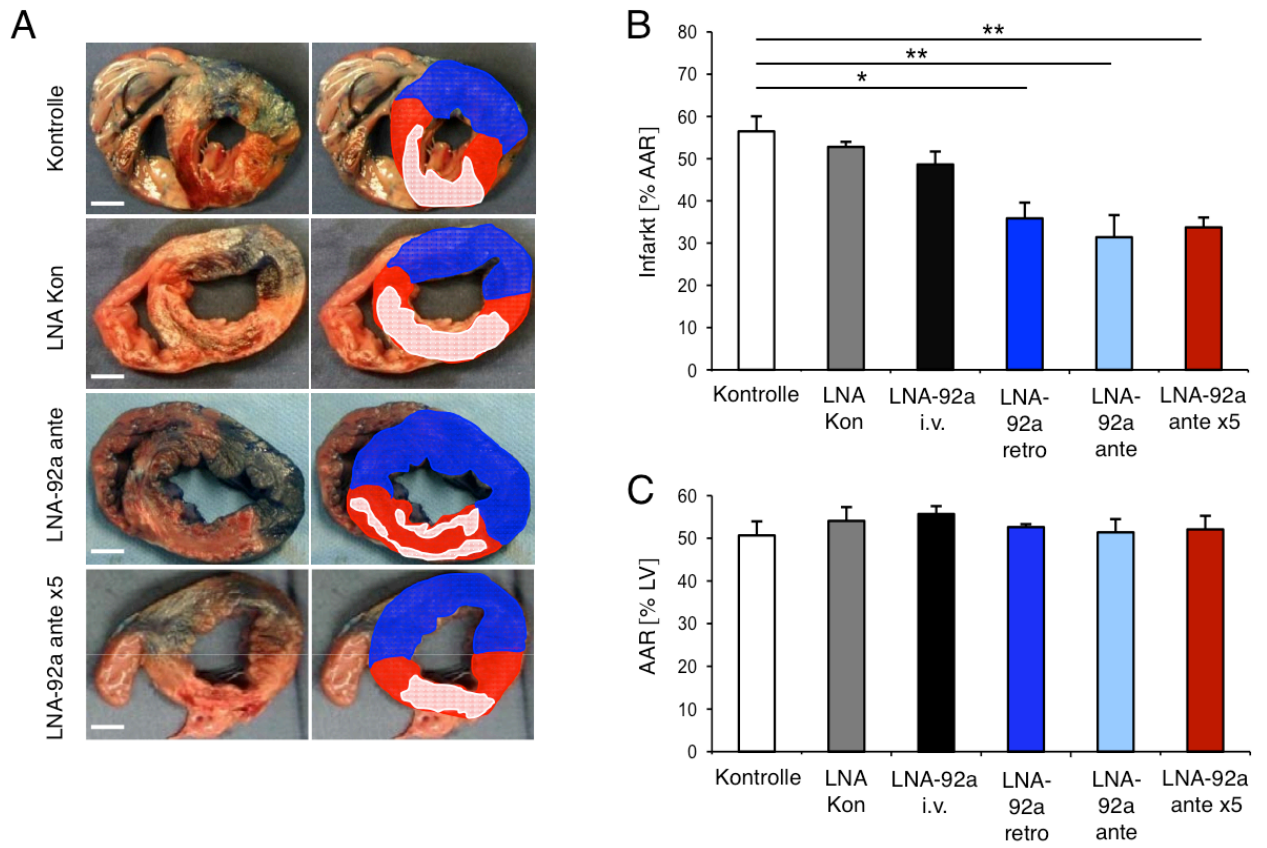


Abbildung 11: Slices auf Ventrikel Ebene (A) mit histochemisch angefärbten (linke Spalte) und zusätzlich verdeutlichten Perfusionsarealen (rechte Spalte; blau: RCx-Stromgebiet, rot: AAR, weiß: Infarktareal); Infarktgröße in Prozent der AAR angegeben (B); Größe des AAR-Areals, prozentual zur LV-Größe angegeben (C). *Mean ± SEM, *p < 0,05 bzw. **p < 0,01 vs. Kontrolle*

3.2.2 Globale linksventrikuläre Herzfunktion

Anhand der linksventrikulären Druckmessung und Erhebung der Auswurfraction auf Basis linksventrikulärer Angiographien erfolgte die Bestimmung der globalen Herzfunktion.

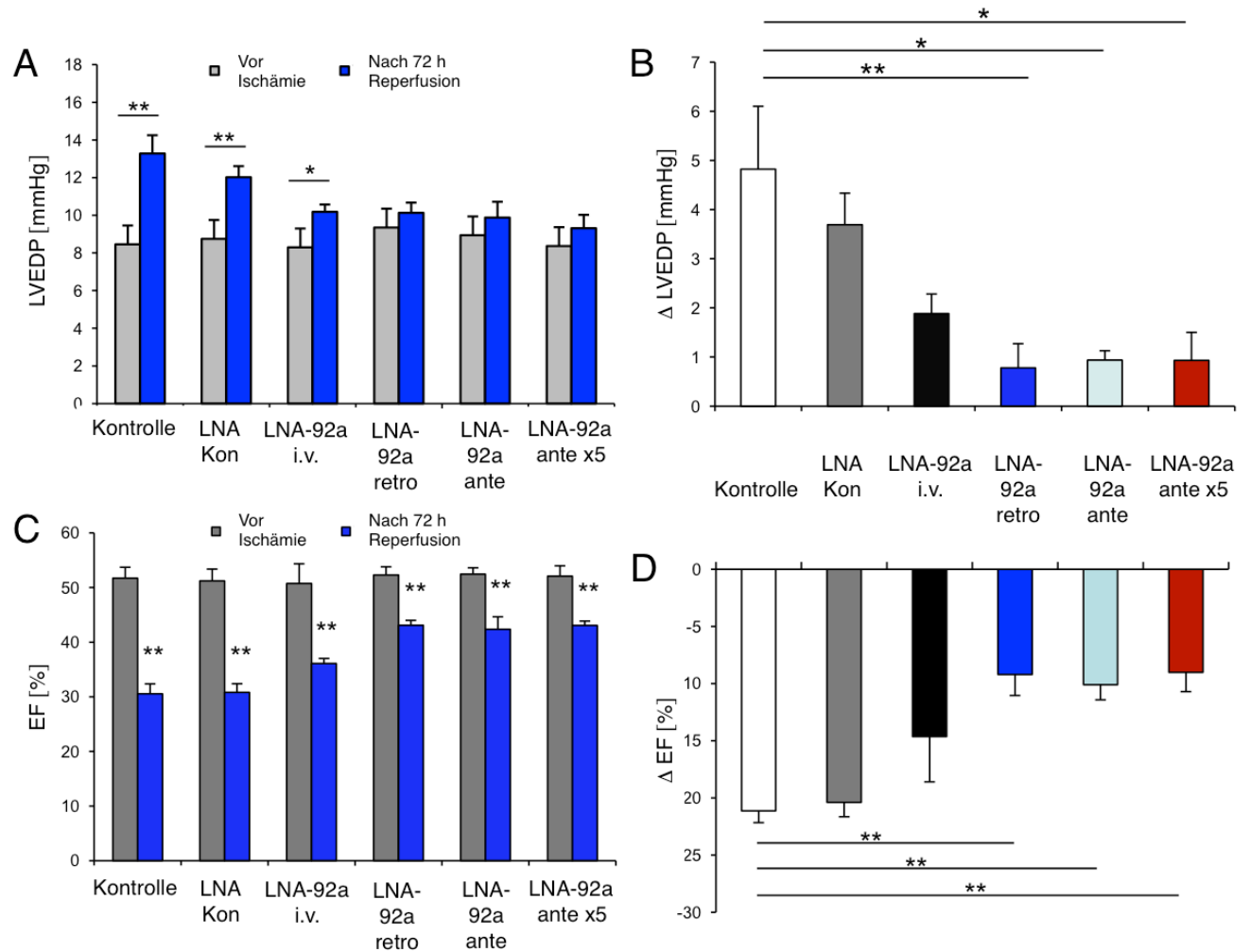


Abbildung 12: LVEDP vor und 72 h nach Ischämieinduktion absolut (A) und als Differenz der beiden Messzeitpunkte (B); Auswurfraction (EF) vor und 72 h nach Ischämieinduktion absolut (C) und als Differenz der beiden Messzeitpunkte (D). Mean \pm SEM, * p < 0,05 bzw. ** p < 0,01 vs. Kontrolle

Der Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) war nach 72-stündiger Reperfusion bei regional LNA-92a-behandelten Schweinen nicht signifikant verändert, während in den Kontrollgruppen (Kontrolle: 5 ± 1 mm Hg bzw. LNA Kon: 3 ± 1 mm Hg) hochsignifikante und in der Gruppe mit systemischer Applikation ein signifikanter Druckanstieg (LNA-92a i.v.: $2 \pm 0,5$ mm Hg) nach 72 Stunden verzeichnet wurden (Abb. 12 A). Die Druckdifferenz $\Delta d3 - d0$ zeigte sich in den regional behandelten Gruppen als signifikant vermindert (Abb. 12 B). Zusätzlich ergab die Auswertung der Auswurfraction nach 72 Stunden eine signifikante

Reduktion in allen Versuchsgruppen (Abb. 12 C), während die Differenz $\Delta d3 - d0$ der Auswurfraction jedoch in den Gruppen regionaler LNA-92a-Applikation im Vergleich zur Kontrolle signifikant verringert war (Abb. 12 D).

Die Druckentwicklung über die Zeit (dP / dt) erbrachte mit Ausnahme der antegraden LNA-92-Gruppe unter Ruhebedingung, bei der ein Anstieg der maximalen Kontraktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurde, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen. Auch die Vergleiche des maximalen linksventrikulären Drucks und des Drucks in der Aorta ergaben keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen.

	Kontrolle	LNA Kon	LNA-92a i.v.	LNA-92a retro	LNA-92a ante	LNA-92a ante x5
Arrhythmie [%]	0.33 ±0.21	0.33±0.22	0.33±0.20	0.20 ±0.18	0.16±0.16	0.20±0.18
LVP max [mmHg] (72h Reperfusion)	84±5.61	81±1.85	78±1.93	84±2.41	86±3.82	81±3.96
AP [mmHg] (72h Reperfusion)	102±5.61	97±3.10	104±2.5	99±2.95	102±3.10	98±1.89
dP/dt max (Ruhe 72h Reperfusion)	1208±80	1270±119	1202±50	1404±32	1667±112 *	1601±100
dP/dt min (Ruhe 72h Reperfusion)	-1054±63	-1077±101	-845±72	-1243±165	-1262±54	1268±111
dP/dt max (HF 130/min 72h Reperfusion)	1273±94	1313±53	1252±71	1529±105	1627±202	1786±152
dP/dt min (HF 130/min 72h Reperfusion)	-1040±60	-1092±106	-954±58	-1384±33	-1278±157	-1436±129
Hypokinetische Segmente	23.3±5.0	25.0±6.5	19.3±6.0	10.0±2.1*	7.6±1.5*	10.0±2.9*
Akinetische Segmente	20.0±4.5	17.0±2.9	19.3±7.0	7.3±2.2	4.3±1.76*	8.0±2.9

Tabelle 2: Zusammenfassung von Arrhythmierisiko, linksventrikulärer und zentralarterieller Druckentwicklung und Kontraktilität nach 72 h Reperfusion. *Mean ± SEM, *p < 0,05 vs. Kontrolle*

Die Anzahl hypokinetischer Segmente des linken Ventrikels ist nach regionaler LNA-92a-Applikation signifikant verringert, während dieses in Bezug auf die Verringerung akinetischer Segmente nur für die antegrade LNA-92a-Applikation der Fall ist.

Zusätzlich waren alle Versuchsgruppen hinsichtlich des Arrhythmierisikos stabil (Tabelle 2).

3.2.3 Regionale Herzfunktion

Die Analyse der regionalen Myokardfunktion via SES zeigte bereits eine tendenzielle Verbesserung der Kontraktilität nach LNA-92a-Behandlung unter Ruhebedingungen. Unter Funktionsreserve mit Herzfrequenzen von 150 Schlägen pro Minute war die Verbesserung signifikant und korrelierend mit der applizierten Dosis. Die regional LNA-92a-behandelten Gruppen wiesen unter erhöhter Herzfrequenz eine signifikant erhöhte Kontraktilität im Vergleich zur Kontrolle auf (LNA-92a ante: 28 ± 5 %, LNA-92a retro: 20 ± 4 %, LNA-92a ante x5: 33 ± 6 %), während die systemische Applikation keine signifikante Verbesserung der Kontraktilität (LNA-92a i.v.: 12 ± 5 %) beobachten ließ (Abb. 13).

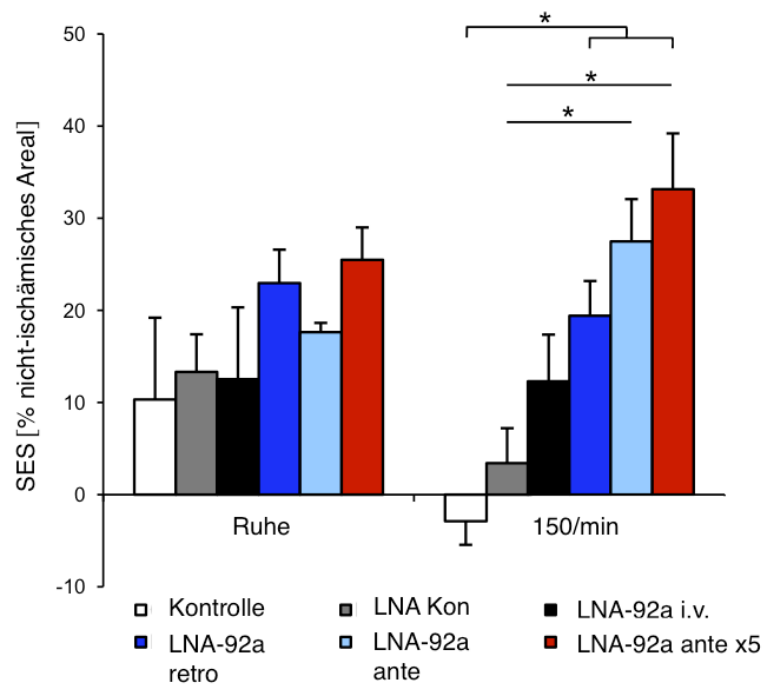
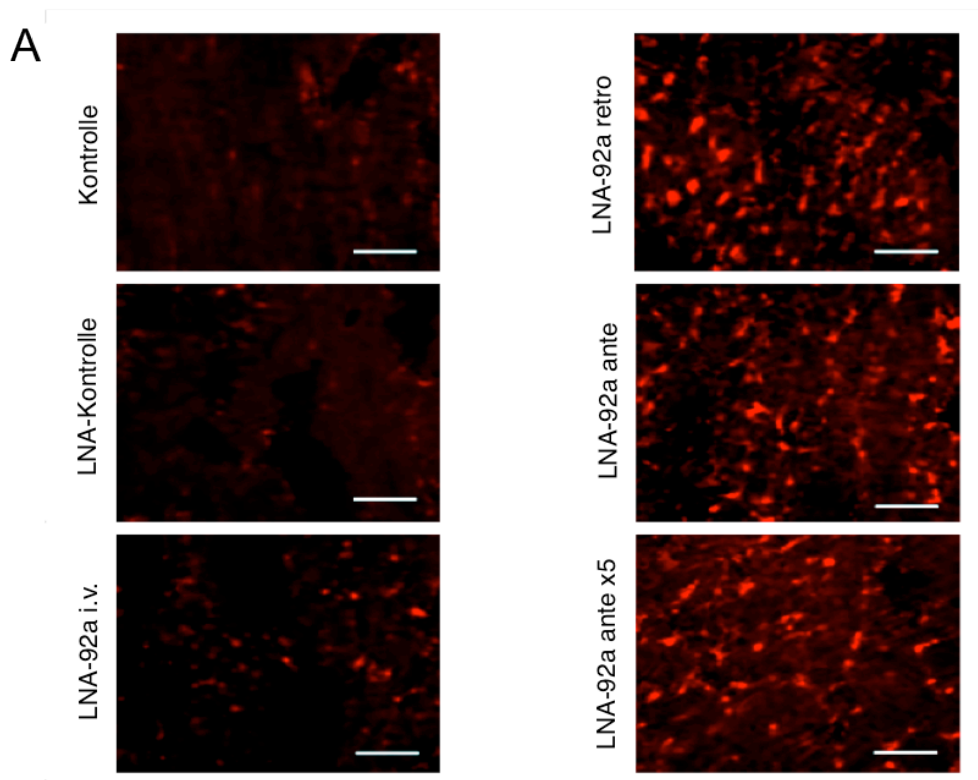


Abbildung 13: Subendotheliale Segmentverkürzung bei Ruheherzfrequenz und unter funktioneller Reserve (150 Schläge/min). Mean \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.3 Endothelprotektion

Die Quantifizierung von Kapillaren in der AAR erfolgte anhand der Auszählung PECAM-1- gefärbter Aufnahmen. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Kapillaren in allen regional LNA-92a-behandelten Gruppen (LNA-92a ante: 180 ± 11 , LNA-92a retro: 170 ± 9 , LNA-92a ante x5: 177 ± 10 Kapillaren / Gesichtsfeld) im Vergleich zur Kontrolle (LNA Kon: 70 ± 5 Kapillaren / Gesichtsfeld), jedoch nicht in der systemisch therapierten Gruppe (Abb. 14).



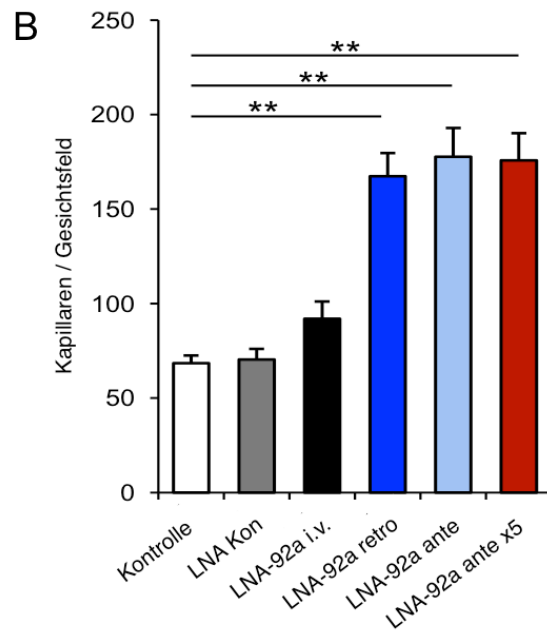
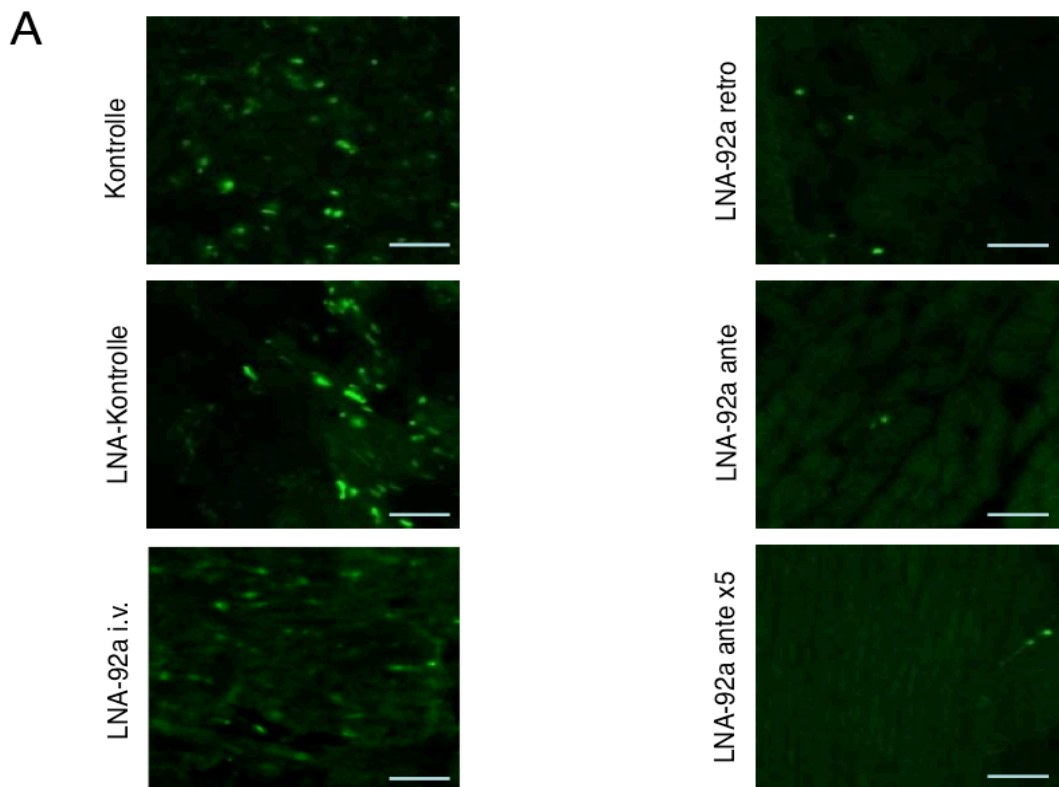


Abbildung 14: Fluoreszenzaufnahmen von Herzmuskelgewebe der AAR nach PECAM-1-Färbung (A; Balken = 50 μ m), Quantifizierung der Kapillaren (B);. *Mean \pm SEM, ** p < 0,01 vs. Kontrolle*

3.4 Apoptose

Apoptose wurde mittels TUNEL-Immunofluoreszenzfärbung sichtbar gemacht und die Anzahl apoptotischer Zellen anhand repräsentativer Aufnahmen bestimmt.



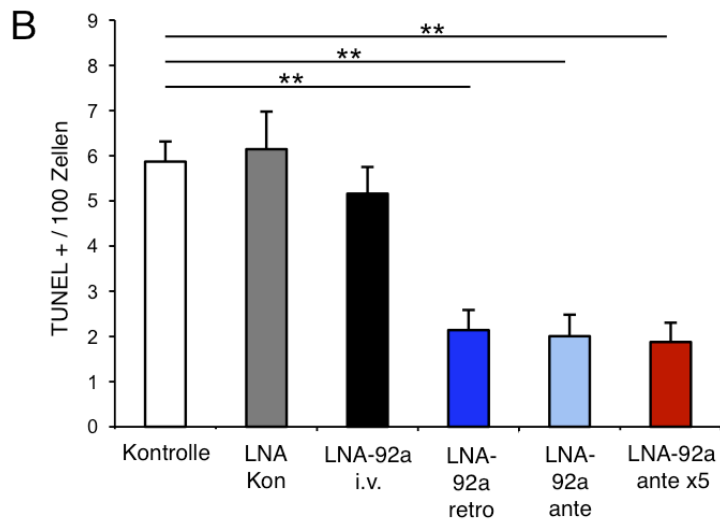


Abbildung 15: Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen; Fluoreszenzaufnahmen nach TUNEL-Färbung (B; Balken = 50 μ m). *Mean \pm SEM, ** p < 0,01 vs. Kontrolle*

Die Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen ergab eine signifikante Verminderung apoptotischer Zellen im ischämischen Areal in den regional behandelten Gruppen um über 50 % (LNA-92a ante: $2,1 \pm 0,5$ %, LNA-92a retro: $2,0 \pm 0,5$ %, LNA-92a i.v.: $1,9 \pm 0,4$ % TUNEL-positive Zellen) im Vergleich zur Kontrolle ($5,9 \pm 0,4$ % TUNEL-positive Zellen). Die systemische LNA-92a-Applikation erbrachte keine Reduktion der Apoptose (Abb. 15).

3.5 Entzündungsreaktion

Anhand von MPO-Aktivitätsmessungen wurde der Leukozyteneinstrom in das Gewebe bestimmt. Eine signifikante Reduktion des Leukozyten-Einstroms von knapp 50 % konnte in den regional LNA-92a-behandelten Gruppen (LNA-92a ante: 51 ± 9 %, LNA-92a retro: 48 ± 11 %, LNA-92a ante x5: 38 ± 10 % Inhibition) beobachtet werden. Der Effekt der systemischen Applikation war der regionalen Therapie leicht unterlegen (Abb. 16).

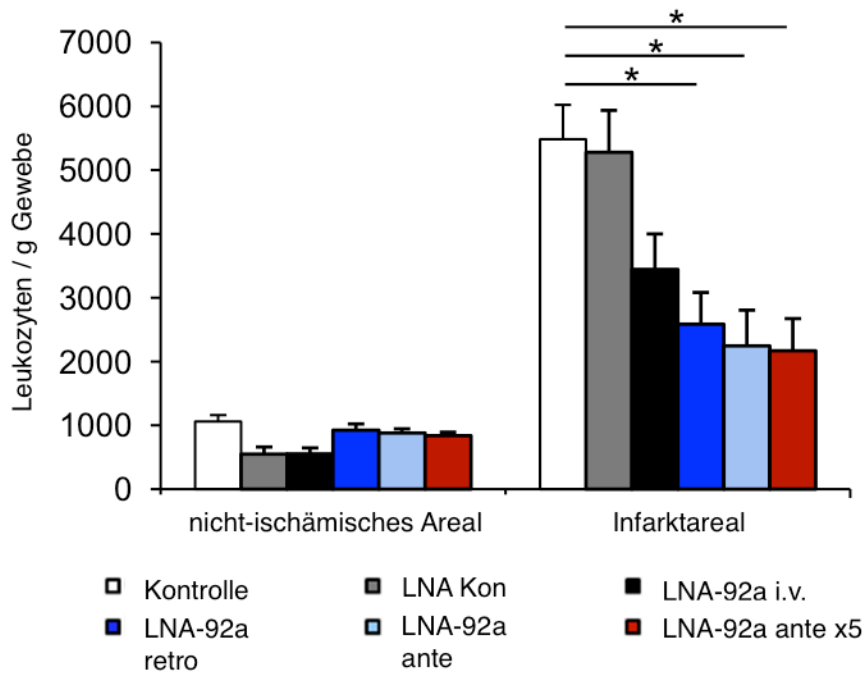


Abbildung 16: Leukozytenanzahl pro Gramm Gewebe im Infarkt- bzw. nicht-ischämischen Areal nach regionaler LNA-92a-Behandlung. *Mean ± SEM, *p < 0,05 vs. Kontrolle*

3.6 7-tägige Reperfusion

Nach einer Reperfusiondauer von sieben Tagen konnte beobachtet werden, dass nach retrograder LNA-92a-Applikation die Infarktgröße und LVEDP signifikant verringert, die Auswurfraction und Kontraktilität im Vergleich zur Kontrolle verbessert waren. Auch eine Abschwächung der Inflammation zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle. Im Infarktareal war nach sieben Tagen Reperfusion noch eine verstärkte Entzündungsreaktion verglichen mit dem nicht-ischämischen Areal vorhanden (Abb. 17).

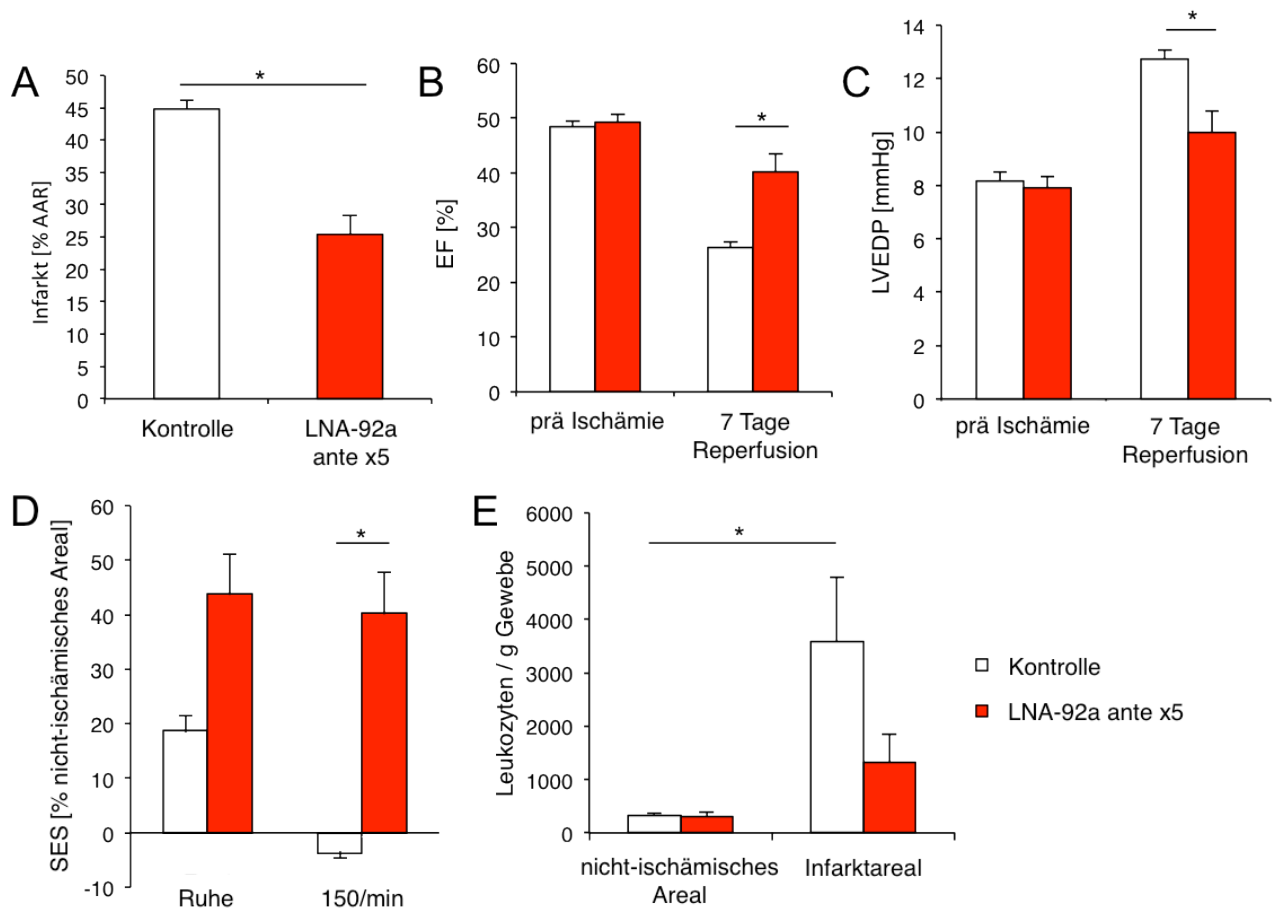


Abbildung 17: Infarktgröße (A), Herzfunktion (B-D) und Inflammation (E) nach 7-tägiger Reperfusion und Behandlung mit erhöhter Dosis der LNA-92a. Mean ± SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

3.7 In vitro-Versuche

3.7.1 Apoptose

Da bislang nur eine Wirkung der miRNA-92a-Suppression auf Endothelzellen, nicht aber auf Kardiomyozyten bekannt ist, wurden neben der Analyse des Herzgewebes ergänzende Hypoxie-/Reoxygenierungsversuche in vitro hinsichtlich des Zellüberlebens von Endothelzellen und insbesondere Kardiomyozyten durchgeführt. LNA-92a-Präinkubation reduzierte dabei die Apoptoserate von Endothelzellen (Überlebensrate von 45 ± 3 % Kontrolle vs. 78 ± 3 % LNA; Abb. 18 B) und Kardiomyozyten (Überlebensrate von 57 ± 6 % Kontrolle vs. 85 ± 4 % LNA; Abb. 18 C) signifikant nach Hypoxie und Reoxygenierung.

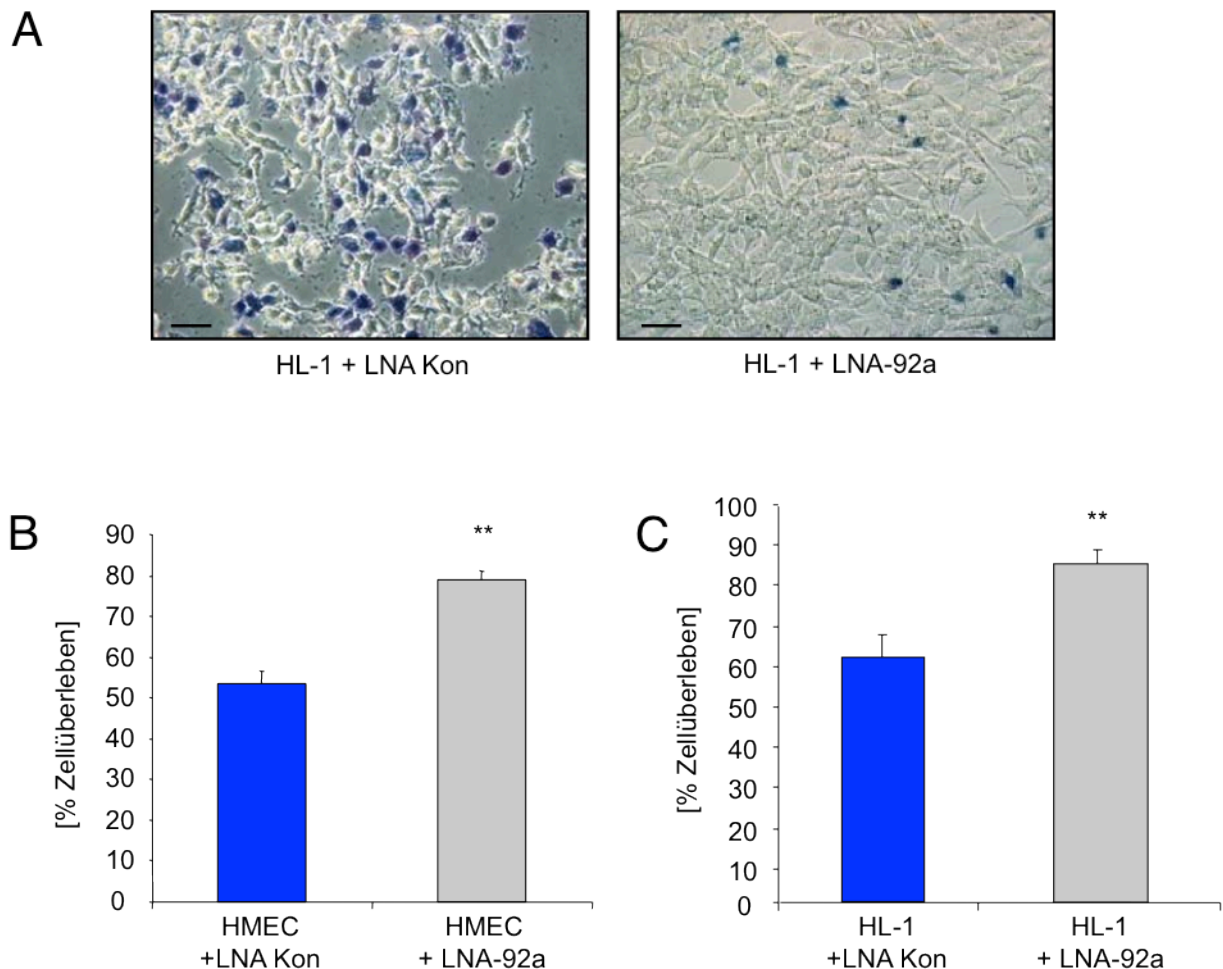


Abbildung 18: Aufnahmen repräsentativer Ausschnitte mit Anfärbung apoptotischer Kardiomyozyten mittels Trypanblau (A; Balken = 50 μ m); Endothelzellüberleben (B) und Überleben von Kardiomyozyten (C). Mean \pm SEM, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle

Die im Anschluss zur Erfassung der Nekroserate durchgeführten Versuche im Durchfluss-Zytometer wiesen eine Tendenz zum nekrotischen Zelltod in den Zellkulturversuchen im Verhältnis zur Apoptose auf. Nach LNA-92a-Behandlung der Zellen deuteten die Daten auf eine Reduktion des Auftretens sowohl von Apoptose als auch Nekrose hin (Abb. 19).

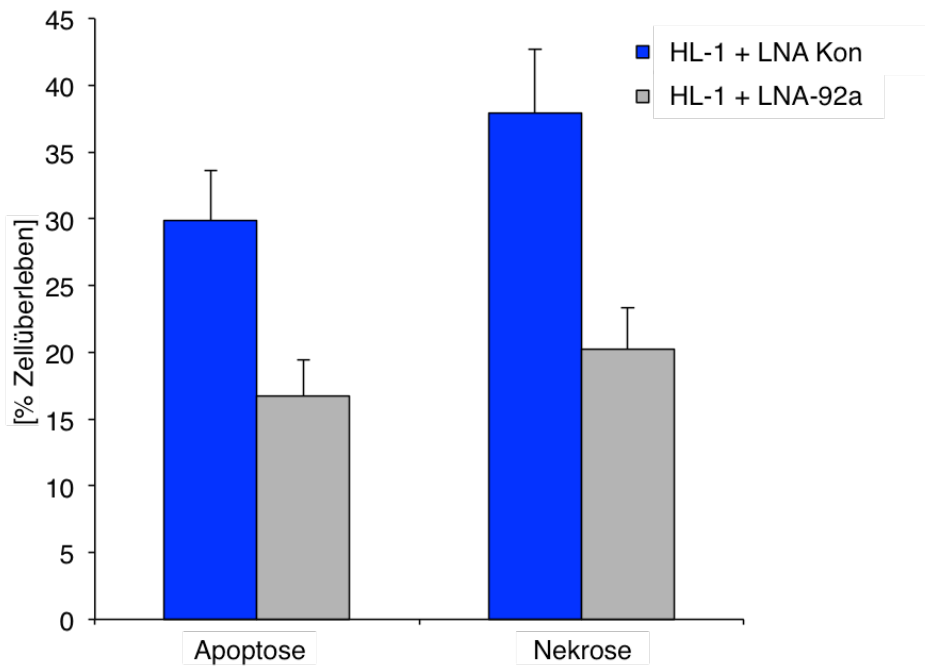


Abbildung 19: Zellüberleben nach LNA-Behandlung im Hinblick auf das Verhältnis Apoptose zu Nekrose *Mean ± SEM*

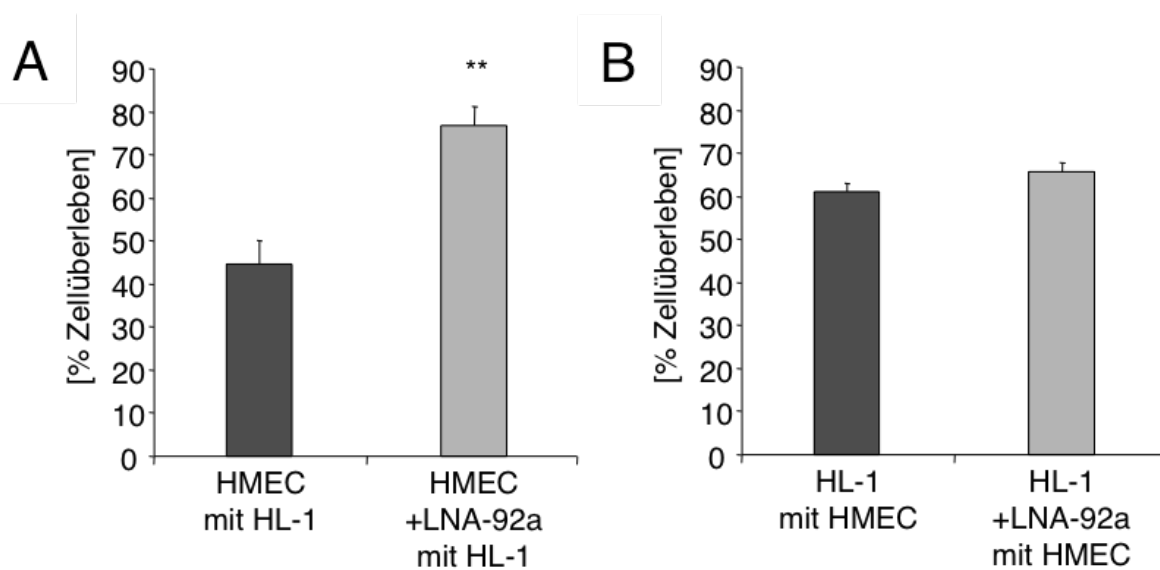


Abbildung 20: Quantifizierung apoptotischer Zellen in den Kokulturversuchen nach Vorbehandlung der Endothelzellen (A) bzw. der Kardiomyozyten (B) mit LNA-92a. *Mean ± SEM, **p < 0,01 vs. Kontrolle*

In Kokultursversuchen waren LNA-92a-vorbehandelte Endothelzellen in der Lage, das Überleben von unbehandelten Kardiomyozyten signifikant zu verbessern (Überlebensrate 44 ± 5 % Kontrolle vs. 76 ± 4 % LNA-92a; Abb. 20 A). Umgekehrt erbrachte die LNA-92a-Behandlung von Kardiomyozyten keinen Überlebensvorteil für unbehandelte Endothelzellen (62 ± 2 % Kontrolle vs. 68 ± 2 % LNA-92a; Abb. 20 B).

Basierend auf den Ergebnissen der Kokultursversuche wurden in einem weiteren Schritt indirekt protektive Faktoren für das Überleben von Kardiomyozyten unter Behandlung mit konditioniertem Endothelzell-Medium und Durchlauf von Hypoxie/Reoxygenierung untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass signifikant mehr Kardiomyozyten überlebten, wenn sie mit Medium von LNA-92a-vorbehandelten Endothelzellen inkubiert wurden (88 ± 2 % vs. Kontroll-LNA: 68 ± 1 %; Abb. 21 A und 78 ± 2 % vs. 55 ± 2 % Kontroll-LNA; Abb. 21 B).

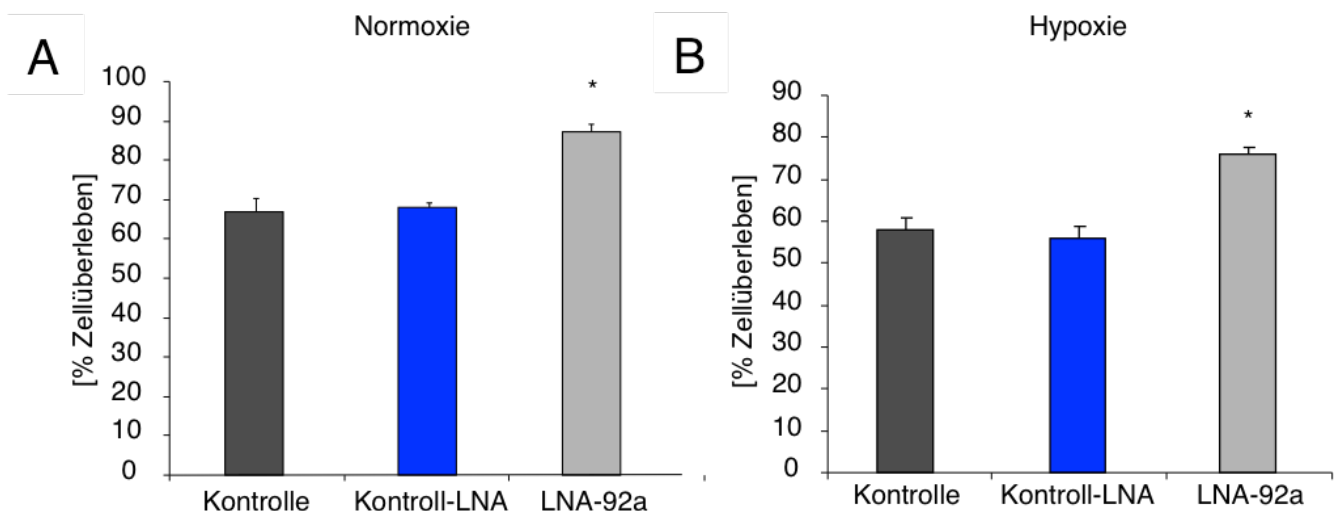


Abbildung 21: Quantifizierung des kardiomyozytären Überlebens nach Inkubation mit EC-Medium nach Normoxie (A) oder Hypoxie (B). *Mean \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Kontrolle*

3.7.2. Entzündungsreaktion

In einem weiteren Schritt wurde nach Bestimmung des Leukozyteneinstroms in das Herzgewebe die Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten auf einer Endothelzellschicht nach LNA-92a-Inkubation in vitro in der Flusskammer untersucht. Dabei wurde ein direkter Effekt der LNA-92a-Applikation auf Leukozyten untersucht. Dieser kann als

Erklärung für den isoliert anti-inflammatorischen Effekt bei der systemisch mit LNA-92a behandelten Gruppe (s.o.) dienen, der in vivo zu beobachteten war.

Die Quantifizierung adhärenter monozytärer THP-1-Zellen ergab eine deutliche Inhibition der Adhärenz, wenn HUVECs oder THP-1-Zellen mit LNA-92a vorbehandelt wurden (HUVEC + LNA-92a: $37 \pm 28 \%$, THP-1 + LNA-92a: $35 \pm 17 \%$ vs. Kontrollbedingung; Abb. 22).

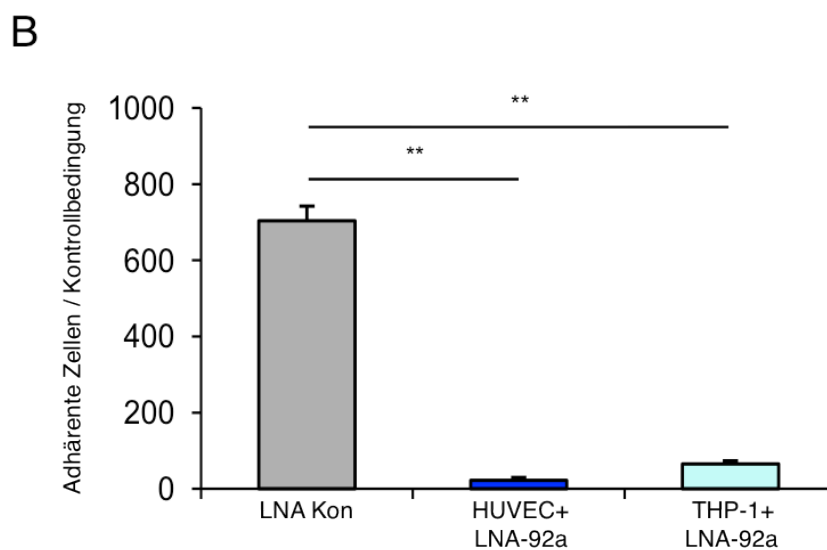
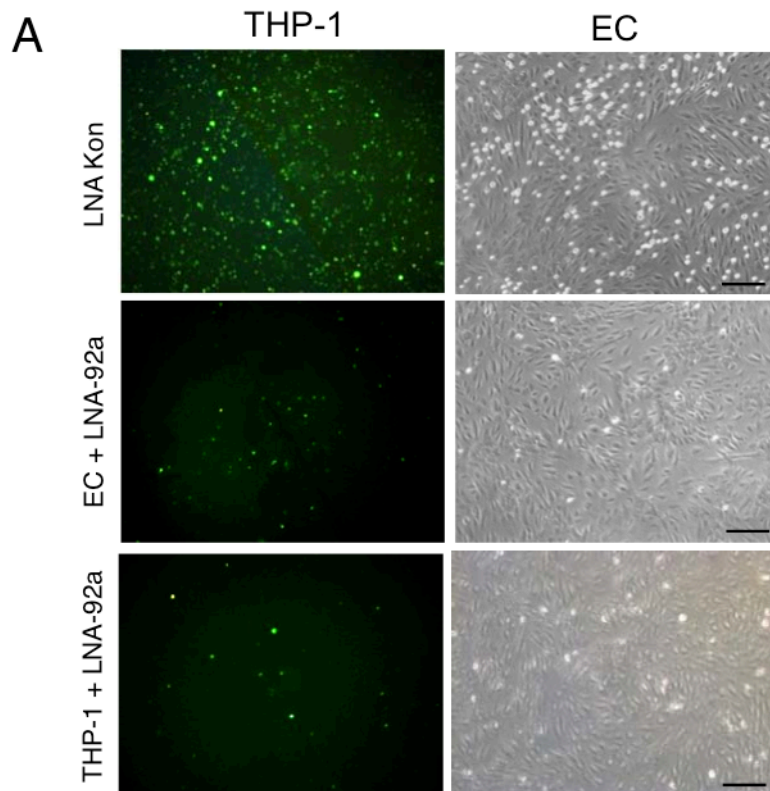


Abbildung 22: repräsentativen Aufnahmen in Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie (A, Balken = 50 μ m) und Quantifizierung adhärenter THP-1-Zellen, relativ zur Kontrollbedingung angegeben (B). Mean \pm SEM, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle

4 Diskussion

4.1 LNA-92a-vermittelte Reduktion der miR-92a-Expression

LNA-92a-vermittelt wurde eine signifikante und spezifische miR-92a-Suppression in allen LNA-92a-behandelten Gruppen beobachtet. Zudem war die miR-92a-Expression im infarzierten Kontrollgewebe nach PBS- (1,19-fach) und Kontroll-LNA-Behandlung (1,50-fach), in Übereinstimmung mit bisherigen Ergebnissen nach Ischämie [12], erhöht. Erstmals kann mit den vorliegenden Daten gezeigt werden, dass die miR-92a-Expression auch nach stattgehabtem Reperfusionsschaden erhöht ist.

Generell ist die Selektivität der miR-92a-Expression von großer Bedeutung, da der miRNA-17~92a-Cluster allgemein als Tumorangio-genese fördernder Faktor via Myc, E2F1-3 und Nkx sowie downstream unter anderem via TGF- β , PTEN, SMAD2 und 4, Tsp1, CTGF bekannt ist [33, 112, 165]. Insbesondere das Verhältnis von miR-19 zu miR-92a scheint dabei aufgrund ihrer teils entgegengesetzten Funktion eine Rolle zu spielen: So wird beispielsweise durch Unterdrückung des Enzyms Fbw7 durch die miR-92a eine hohe Produktion von c-Myc und damit eine ungehemmte Zellproliferation erreicht. Allerdings wird auch der p53-Signalweg durch die miR-92a aktiviert und so der programmierte Zelltod initiiert, was insbesondere der onkogenen Funktion der miR-19 gegenübersteht [121, 122, 165]. Zudem regulieren, wie eingangs beschrieben, die ebenfalls dem Cluster zugehörigen miR-17 und miR-20a Transkriptionsfaktoren des Clusters selbst und erlauben so eine negative Feedbackregulation.

Zusammenfassend veranschaulichen die vorstehend skizzierten regulatorischen Mechanismen und das sensible Expressionsgleichgewicht des miR-17~92-Clusters die Bedeutsamkeit der selektiven LNA-92a-Behandlung und weisen auf die Notwendigkeit von Langzeitversuchen mit einer genauen Analyse von Nebeneffekten der miR-92a-Suppression auf das Herz und andere Organe hin.

Ebenfalls von Interesse in Langzeitversuchen ist die Beobachtung der Wirkung der miR-92a-Suppression auf die Angiogenese: Die Zusammenschau von dem in dieser Arbeit gezeigten Nachweis einer signifikant verstärkten Expression des miR-92a-Zielgens Integrin α 5 und Daten, die Integrin α 5 als einen bedeutenden Faktor der

Angiogenese herausstellen [16, 17, 158], deutet darauf hin, dass über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg der miR-92a-Suppression via Integrin $\alpha 5$ eine angiogenetische Wirkung nach stattgehabter Ischämie auch in unserem Modell zukommt. Bislang konnte dies nur im Mausmodell [12] beobachtet werden.

Die Spezifität der LNA-92a für die miR-92a wurde mittels Expressionsanalyse des miR-17~92-Clusters untersucht. Lediglich die Expression der im Aufbau sehr ähnlichen miR-25 wurde nach LNA-92a-Gabe zusätzlich beeinflusst. Da miR-25 und miR-92a sich in nur zwei Basen unterscheiden, ist dieses ein möglicher Grund für die simultane Suppression der miR-25, die einem zum miRNA-17~92a-Cluster paralogen Cluster entstammt [112].

Der miR-25 wird für das kardiovaskuläre System bislang nur im Rahmen der Herzinsuffizienz eine Rolle zugeschrieben: Über SMAD3, Nfat und SERCA vermittelt modifiziert die miR-25 die Hypertrophie- und Fibroseentstehung [35, 34, 157]. Eine zusätzliche Suppression der miR-25 hat einerseits synergistische Effekte hinsichtlich der Verhinderung der Ausbildung einer Herzinsuffizienz durch die vorteilhafte Beeinflussung der SERCA und der verminderten Kollagenbildung [35, 157]. Andererseits wurde auch eine durch miR-25-Suppression induzierte kardiale Dysfunktion beschrieben [34], sodass eine Aussage über die Auswirkung der zusätzlich zur miR-92a supprimierten miR-25 im Herzen schwer zu treffen ist und abzuwarten bleibt. Weitaus wichtiger als für das kardiovaskuläre System scheint die miR-25 allerdings für die Entstehung gastrointestinaler Tumore, unter anderem durch die direkte Expressionsmodifikation von p53, Smad7, Bim, Desmocollin-2, sowie MCU (mitochondrial calcium uniporter) und RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs) zu sein [2, 86, 167, 44, 96, 103, 169]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Bezug auf das gastrointestinale System lediglich die miR-92a-Expression in der Leber untersucht, sodass über gastrointestinale Nebeneffekte der LNA-92a-Behandlung hier keine Aussage getroffen werden kann.

4.2 Kardioprotektiver Einfluss auf Mechanismen des Reperfusionsschadens

Apoptose und Inflammation sind zwei bedeutende Mechanismen des Reperfusionsschadens, welcher nach Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes stattfindet und bis zu 50 % zur Infarktgröße beiträgt [136, 171, 11, 163, 61]. Sowohl

Apoptose als auch Inflammation konnten in dieser Arbeit durch LNA-92a-Gabe im Sinne der Kardioprotektion beeinflusst werden.

Dabei sind die gezeigten Ergebnisse der miR-92a-Suppression als ein Zusammenspiel von direktem Endothelzellschutz einerseits, direktem Kardiomyozytenschutz andererseits und einer Kombination, bestehend aus Endothelzell-vermitteltem, indirektem Kardiomyozytenschutz zu interpretieren und lassen die LNA-92a-Applikation so als besonders attraktive Methode zur Verringerung des Ischämie/Reperfusionsschadens erscheinen.

4.2.1 Verminderung der Apoptose

Anhand der TUNEL-Immunofluoreszenzfärbung wurde nach regionaler LNA-92a-Behandlung eine signifikante Verminderung der Apoptose im Randgebiet des Infarktareals um über 50 % beobachtet, wie dies auch in anderen Arbeiten beobachtet wurde [170, 66]. Die miR-92a-Suppression zeigt sich somit bezüglich des programmierten Zelluntergangs im Rahmen des Reperfusionsschadens als vorteilhaft.

Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass die Reduktion des Apoptose-Liganden Fas die Infarktgröße um über 60 % [92] senkt. Dieses verdeutlicht die grundsätzliche Bedeutung der Apoptose im Zusammenhang mit dem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Apoptose und Nekrose sind jedoch im Rahmen des Reperfusionsschadens keineswegs als voneinander separiert zu betrachten, da Schnittpunkte beider Kaskaden oder gar Übertritte vom einen in das andere Stadium vorkommen können [170, 159]. Ergänzende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Zellnekrose in vitro nach Hypoxie/Reoxygenierung ließen in FACS-Analysen zusätzlich zur Verminderung der Apoptose auch eine Reduktion nekrotischer Zellen nach LNA-92a-Behandlung beobachten. So erwies sich die LNA-92a-Applikation auch hinsichtlich der Nekrose-Entwicklung als protektiv.

Zur differenzierteren Analyse der von einer LNA-92a-Behandlung im Überleben profitierenden Zelltypen wurden in vitro Hypoxie-/Reoxygenierungsversuche durchgeführt. Dabei zeigte sich nach miR-92a-Suppression ein direkt protektiver Einfluss auf das Zellüberleben in Endothelzellen und etwas weniger stark ausgeprägt

in Kardiomyozyten. Deren Überleben wird vermutlich durch die miR-92a via Smad7 beeinflusst [166]. Jedoch scheint das Kardiomyozytenüberleben in größerem Umfang durch miR-15 reguliert zu sein, wie Hypoxie-/Reoxygenierungsversuche an HeLa-Zellen und Ischämie-/Reperfusionversuche an Mäusen und Schweinen zeigen konnten [71].

Mittels Kokultur- und conditioned-medium-Versuchen wurden in der Folge auch indirekte Effekte auf das Zellüberleben untersucht. Ein protektiver Effekt auf das Zellüberleben war in Kokultur-Versuchen nur vorhanden, wenn Endothelzellen mit LNA-92a behandelt wurden und so das Zellüberleben von Kardiomyozyten nach Hypoxie/Reoxygenierung verbesserten. Nach LNA-92a-Behandlung von Kardiomyozyten konnte kein positiver Effekt auf das Überleben kokultivierter Endothelzellen beobachtet werden.

In einem weiteren Schritt erfolgten Versuche mit LNA-konditioniertem Endothelzellmedium mit dem Ergebnis eines indirekt protektiven Effektes von Endothelzellen auf das Überleben von Kardiomyozyten nach Hypoxie/Reoxygenierung. Die Steigerung der Überlebensrate von Kardiomyozyten war allerdings unabhängig davon, ob das konditionierte Medium von Endothelzellen stammte, die vorher selbst eine Hypoxie durchlaufen hatten oder nicht. Daraus lässt sich ableiten, dass Endothelzellen kontinuierlich oder zumindest Hypoxie-unabhängig protektive Faktoren für das Überleben von Kardiomyozyten sezernieren. Ergebnisse von Bonauer et al. zeigen, dass die Antagomir-92a-Behandlung die Apoptose von Kardiomyozyten in vivo signifikant reduzieren, jedoch nicht direkt das Überleben von Kardiomyozyten in Zellkulturversuchen beeinflussen konnte [12]. Das deutet in Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten darauf hin, dass die miR-92a-bedingte Reduktion der Apoptose von Kardiomyozyten vor allem über indirekte, beispielsweise parakrine Mechanismen [12, 13, 94] reguliert wird.

Als weiterer, jedoch indirekter Hinweis auf ein verbessertes Endothelzellüberleben kann die mittels PECAM-1-Färbung detektierte Erhöhung der Kapillardichte in regional LNA-92a-behandelten Tieren interpretiert werden. Obwohl die Zahl der Kapillaren keinen direkten Schluss auf die Perfusion zulässt [15, 32], ist eine funktionelle Korrelation anhand der vorliegenden Daten naheliegend (s. auch unten). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die kardiale Funktion im Ischämie-/Reperfusionsschaden des Schweinmodells durch die Wirkung proangiogenetische Faktoren wie eNOS und Thymosin β 4 verbessert wird. Dies geschieht durch eine

Begrenzung der Endothelzellaktivierung, des Endothelzellverlustes und in der Folge unter anderem durch die Verringerung mikrozirkulatorischer Beeinträchtigungen [8, 89, 66, 67, 94].

Nach einer Reperusionszeit von 72 Stunden kann allerdings nicht von der abgeschlossenen Neubildung maturierter Kapillaren ausgegangen werden. Zwar führen selbst stark angiogenetisch wirksame Faktoren wie VEGF zwar bereits nach 6 - 24 Stunden nach Okklusion zu einer Gefäßaussprossung [104, 48], doch ist zu diesem Zeitpunkt die Kapillar-Maturisierung noch nicht abgeschlossen. In der Angiogeneseforschung wird Tag 7 nach Intervention als erster Zeitpunkt zur Bewertung der Angiogenese-basierten Ausbildung reifer Gefäße angesehen [22, 88, 12, 90], wie auch in dieser Arbeit untersucht. Eine deutliche Neubildung reifer Kapillaren im Sinne einer Angiogenese nach 72 Stunden Reperfusion, wie bei den vorliegenden Daten beobachtet, ist daher unwahrscheinlich. Allerdings werden durch die miR-92a-Suppression selektiv Endothelzellmigration und -proliferation durch die Zielgene Integrin $\alpha 5$ [12], Sirtuin1 und damit den Notch-Signalweg bzw. MMPs [56, 95], die anti-inflammatorisch, anti-thrombotisch wirksamen Transkriptionsfaktoren KLF2 und KLF4 [162, 45, 65, 153] und eNOS beeinflusst [115, 12, 29].

Im Hinblick auf die hier gezeigten Ergebnisse der Akutversuche ist also zusammenfassend von einem Endothelzellschutz durch Verhinderung des Zelluntergangs (möglicherweise durch Beeinflussung der angioproliferativen Zielgene) und nicht von einer Gefäßneubildung auszugehen. Das gilt auch im Hinblick auf den beschriebenen Einfluss von Endothelzellen auf das Überleben von Kardiomyozyten. Eine protektive Wirkung der miR-92a-Suppression ist somit mehrfach vorhanden: sowohl auf Seiten des Endothels und damit indirekt auf das Myokard, als auch direkt auf die Kardiomyozyten. Zusammengefasst kann in dieser Arbeit folglich eine Verminderung des Reperfusionsschadens hinsichtlich der verminderten Apoptoserate und erhöhten Kapillardichte, respektive Verbesserung der Mikrozirkulation besonders durch lokale Katheter-basierte LNA-92a-Applikation beobachtet werden.

4.2.2 Verminderung der Entzündungsreaktion

Die Entzündungsreaktion wurde mittels MPO-Aktivitätsmessung erhoben und erlaubt, wie eingangs beschrieben, eine quantitative und qualitative Aussage bezüglich des Reperfusionen-bedingten Gewebsschadens. Der Einstrom neutrophiler Granulozyten war in allen LNA-92a-therapierten Gruppen im Infarktreal signifikant abgeschwächt. Damit zeigt die miR-92a-Suppression im Hinblick auf die potentiell schädliche Entzündungsreaktion im Kontext des Reperfusionsschadens einen protektiven Effekt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei Inhibition der Einwanderung neutrophiler Granulozyten eine signifikante Verringerung der Infarktgröße nach Reperfusion vorhanden ist [99], während die Stimulation von Granulozyten mittels G-CSF mit der Ausbreitung des Infarkts korreliert [100]. In einer klinischen Studie verhielt sich die Infarktgröße gleichsinnig mit der Höhe der Leukozytenkonzentration im Blut [6]. Dieses veranschaulicht die Bedeutung inflammatorischer Zellen in Bezug auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden. Jedoch darf im Rahmen der Abräum- und Synthesefunktion im ischämischen Gewebe die Rolle anderer leukozytärer Zelltypen, wie beispielsweise der ebenfalls der myeloiden Reihe entstammenden Monozyten [116, 117], nicht unbeachtet bleiben. Die Unterdrückung pro-inflammatorischer Signale scheint nämlich die Rekrutierung anti-inflammatorisch wirksamer Monozyten zu induzieren, die ihrerseits Angiogenese und Gewebeheilung vermitteln [3]. Daher muss der Beitrag der Monozyten zum Ischämie-/Reperfusionsschaden für die weitere Aufklärung der miR-92a-Funktion in diesem Zusammenhang noch detaillierter betrachtet werden.

Die Beobachtung, dass es in allen LNA-92a-Therapiegruppen zu einer deutlichen Reduktion der Entzündungsreaktion kam, deutet auf einen systemischen Effekt der LNA-92a im Sinne einer direkten Beeinflussung der Leukozyten hin. Allerdings wurde bislang noch keine pro-inflammatorischen Eigenschaften der miR-92a beschrieben. Vor diesem Hintergrund erfolgten in vitro Versuche an Endothel- und monozytären Zellen in der Flusskammer. Die stark eingeschränkten Adhäsion, die nach LNA-92a-Behandlung je einer der beiden Zellarten zu beobachten war, zeigte einen direkten Effekt der miR-92a-Suppression auf das Adhäsionsverhalten sowohl für Endothelzellen, als auch THP-1-Zellen.

Bereits beschrieben wurde, dass die Transkriptionsfaktoren KLF2 und KLF4 Wandschubspannungs- und damit Endothelzell-abhängig via miR-92a-Reduktion

(und so erhöhter KLF2-Expression) bei hoher laminärer Strömung im Gefäß reguliert werden [162, 65, 153]. Somit scheint der beim Flusskammerversuch erzeugte laminäre Fluss ein Faktor für die deutlich reduzierte Zelladhäsion zu sein. Diese Tatsache erklärt jedoch nicht den im Tiermodell beobachteten anti-inflammatorischen Effekt der LNA-92a, sodass von einer bislang nicht bekannten Wirkung der miR-92a-Suppression auszugehen ist.

Die LNA-92a-vermittelte miR-92a-Suppression vermindert also im Rahmen des Reperfusionsschadens auch, wie die gezeigten Daten implizieren, die inflammatorische Komponente durch direkte Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens von Endothelzellen und Leukozyten. Neben einer günstigen Beeinflussung von Endothel und Myokard zeigt sich also auch für die Entzündungsreaktion als dritter wichtiger Komponente des Ischämie-/Reperfusionsschadens ein vorteilhafter Einfluss der LNA-92a-Behandlung.

4.3 Hämodynamische und funktionelle Verbesserung

Nachdem dargelegt wurde, dass die LNA-92a-Behandlung die miR-92a-Suppression induziert und sich konsekutiv auf den Reperfusionsschaden durch Verringerung von Apoptose und Gewebsschädigung durch Inflammation auswirkt, ist weiterführend der Einfluss auf Hämodynamik und Myokardfunktion besonders vor einem translationalen Hintergrund von Bedeutung. Makroskopisch ließ sich nach regionaler (ante- oder retrograder) LNA-92a-Therapie eine Verminderung der Infarktgröße um etwa 40 % feststellen, die sich in der Folge funktionell im Sinne einer verbesserten globalen und regionalen Myokardfunktion auswirkte. Bei systemischer LNA-92a-Therapie konnte ein Trend zur Verringerung, jedoch trotz deutlicher Suppression der miR-92a keine signifikante Veränderung der Infarktgröße beobachtet werden, sodass hier von einem Grenzphänomen im Hinblick auf die miR-92a-Expression ausgegangen werden muss.

Die Funktionssteigerung in Bezug auf die Kontraktilität, die mittels subendothelialer Segmentverkürzung erhoben wurde, lässt unter Ruhfrequenz tendenzielle und unter funktioneller Reserve eine signifikante Verbesserung der Funktion regional LNA-92a-therapierter Herzen erkennen. Zudem wurde eine signifikante Steigerung der globalen Herzfunktion erzielt. Diese wurde anhand von LVEDP-Veränderungen als

Marker der beginnenden Herzinsuffizienz und EF als Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion ermittelt. Für die Erhebung der Ejektionsfraktion, die als geeigneter Parameter zur Erhebung von linksventrikulärer Dysfunktion, Kontraktilität und Remodeling beschrieben wird [73], konnte in Studien gezeigt werden, dass sich bereits die Verbesserung der Ejektionsfraktion von 10 %, wie in dieser Arbeit erzielt, als prognostisch günstig in der klinischen Situation erweist [160, 84].

Im Hinblick auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz als Langzeitfolge des Myokardinfarktes weisen die vorliegenden Daten aufgrund der ausgeprägten Verminderung der Infarktgröße und funktionellen Verbesserung auf eine Verringerung des Herzinsuffizienzrisikos hin. Um diesbezüglich eine genaue Aussage treffen zu können, sind jedoch Langzeitversuche nötig. Die nach Versuchstag 7 erhobenen Daten deuten allerdings bereits einen länger währenden Effekt der regionalen LNA-92a-Behandlung an: Die Infarktgröße bleibt vermindert, während sich die Herzfunktion weiterhin als verbessert darstellt.

Zusammenfassend können die funktionellen Auswirkungen des Reperfusionsschadens durch regionale LNA-92a-Applikation abgemildert werden und weisen auf eine klinische Relevanz hin.

4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

4.4.1 Rolle der miRNA-Therapie in der Medizin

Die zunehmende Erforschung von Grundlagen der miRNA-Synthese, Wirkung und Möglichkeiten gezielter miR-Modifikation ist wegweisend für einen therapeutischen Einsatz der miRNA-Modifikation in der Klinik. Erste Veröffentlichungen klinischer Untersuchungen weisen hauptsächlich zwei Anwendungsgebiete der miRNAs auf.

Zum einen erscheint die Analyse von im Blut zirkulierenden miRNAs als Biomarker, auch im kardiovaskulären System in Bezug auf Myokardinfarkt bzw. Herzinsuffizienz, als vielversprechend [111, 76, 1, 147]. So konnten Fichtlscherer et al. [46] zeigen, dass Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung (CAD) erniedrigte Spiegel von im Endothel stark exprimierten miRNAs, unter anderem miR-92a, im Blut aufwiesen, während in Kardiomyozyten angereicherte miRNAs verstärkt nachgewiesen werden konnten. Für die Autoren war die in Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung

detektierte reduzierte Konzentration zirkulierender endothelialer miRNAs überraschend, da eine Aktivierung des Endothels erwartet wurde. Es wurde argumentiert, dass experimentelle Studien die Aufnahme miRNA enthaltender apoptotischer Partikel in atherosklerotischen Läsionen zeigten und somit ein erhöhtes Anfallen von zirkulierenden miRNAs reduzierten [46]. Jedoch kann anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls vermutet werden, dass eine intrinsische, kompensatorische und kardioprotektive Gegenregulation und Angiogeneseförderung und damit Adaption an den verminderten Blutfluss stattfindet, die bei CAD durch Suppression der miR-92a zu einer Verringerung der miRNA-Konzentrationen im Plasma führt. Die CAD-Entwicklung ist in ihrem chronischen, mit Anpassungsprozessen behaftetem Verlauf vom Akutereignis des Myokardinfarkts mit Erhöhung der miR-92a-Konzentration 72 Stunden nach dem Ereignis abzugrenzen. Aufgrund der einleitend als „Feintuning“ beschriebenen miRNA-Funktion erscheint die Deutung der Ergebnisse als Anpassungsprozess nach akuter Ischämie zumindest theoretisch denkbar.

Anhand der vorstehenden Ausführung der aktuellen Literatur zeigt sich auch, dass mit genauer Kenntnis der Expressionsmuster miRNAs in Zukunft möglicherweise die Bestimmung von miRNA-Konzentrationen im Blut zur Bestätigung und / oder Prognoseabschätzung nicht nur kardiovaskulärer, sondern beispielsweise maligner Erkrankungen [111] dienen können.

Neben der Rolle als Biomarker kann die im Krankheitsfall veränderte miRNA-Expression wie in der vorliegenden Untersuchung zum anderen als therapeutischer Angriffspunkt dienen. Dieser ist momentan besonders hinsichtlich miRNA-supprimierender Antisense-Moleküle wie LNAs von Bedeutung. Ihre Effizienz und Wirkung wurde bereits in vielen Kleintiermodellen, Primaten und kürzlich auch am Menschen untersucht [42, 74]. So ist die klinische Anwendung von LNAs im Rahmen von Studien bereits Realität geworden. Unter anderem ist dies in der einfachen Handhabung als wasserlösliche und stabile Substanz in Kombination mit deutlichen Auswirkungen auf die miRNA-Expression und damit verbundenen biologischen Effekten begründet. Einzelne miRNAs besitzen multiple Ziel-mRNAs, sodass mit Modifikation einzelner miRNAs starke zelluläre Wirkungen erzielt werden können. Basierend auf den Voraussetzungen, dass die jeweiligen AntimiRs zu einer effizienten miRNA-Inhibition in vivo führen und von funktioneller Bedeutung sind,

werden AntimiR-Oligonukleotide auch im kardiovaskulären System als künftige Therapeutika dienen [151].

4.4.2 miR-92a-Haltbarkeit und Nebeneffekte im Organismus

Die Funktionsfähigkeit der LNA-92a im Organismus konnte in der vorliegenden Arbeit auf Basis der miRNA-Expression nach Gabe einer Einzeldosis für 72 Stunden gezeigt werden.

In anderen Arbeiten wurde eine Haltbarkeit von 6 Wochen nach Applikation einer Einzeldosis [114] gezeigt und die Normalisierung der miRNA-Expression nach fünffacher LNA-Applikation wurde für einen Zeitpunkt 12 Wochen nach erster Gabe anhand der Halbwertszeit errechnet [74], sodass auch aufgrund der eingangs beschriebenen Stabilität der LNAs von einer weit über die Dauer der Applikation hinausgehenden Persistenz der Substanz im Organismus ausgegangen werden muss.

Der große Vorteil einer längerfristigen LNA-92a-Wirkung und der damit einhergehenden verbesserten Angiogenese in der Spätphase nach Myokardinfarkt besteht sich insbesondere in einer verbesserten Blutversorgung, die zum einen die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten erneuter Ischämien und zum anderen adversen Remodelings des Herzmuskels und damit langfristig die Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermeiden kann [70, 9, 3, 23]. Allerdings werden über eine lange Wirkdauer auch mögliche Nebeneffekte der LNA-92a-Applikation über lange Zeit aufrechterhalten.

In diesem Zusammenhang lässt das miR-92a-Expressionsprofil Dosis- und Applikationsart-abhängige Off-Target-Effekte der LNA-92a hinsichtlich der miR-92a-Suppression in den zusätzlich untersuchten Organen Lunge, Leber, Milz und Niere beobachten. Zusätzlich zeigt sich eine miR-25-Suppression im Herzgewebe, auf die bereits oben eingegangen wurde. Die Applikation der fünffach erhöhten LNA-92a-Konzentration führte bei antegrader Applikation zu einer vollständigen Suppression der miR-92a in allen Geweben. Lunge und Leber konnten jedoch zum Teil durch regionale Applikation geschont werden und wiesen eine weniger starke Reduktion der miR-92a-Konzentration auf. In den Versuchen zeigten sich keine makroskopischen oder mikroskopischen Gewebeveränderungen. Allerdings stellt ein

Beobachtungszeitraum von 3 bzw. 7 Tagen einen zu kurzen Zeitrahmen dar, sodass Langzeitbeobachtungen im Sinne eines sicheren Einsatzes der LNA-92a zur besseren Beurteilung von langfristigen Nebeneffekten nötig sind.

Als mögliche Folgen der verminderten miR-92a-Expression muss von pro-angiogenetischen und anti-inflammatorischen Effekten ausgegangen werden. Die Veränderung der miR-92a-Expression im Sinne einer Herunterregulation inflammatorischer und Heraufregulation angiogener Prozesse wurde bereits im Rahmen verschiedener maligner Krankheitsbilder gezeigt [33, 118, 119, 164].

Experimentelle Studien zeigen zudem kontroverse Ergebnisse hinsichtlich einer Hepatotoxizität bei LNA-Applikation [144, 153, 96]. Während bei Einsatz der LNA an Primaten und in der klinischen LNA-Studie bislang von keinerlei Nebeneffekten berichtet [42, 74] wurde, sind experimentelle Daten zur Hepatotoxizität durch LNA-Applikation publiziert worden [144]. Diese ist bereits bei einer einmalig verabreichten Dosis von etwa 5 mg / kg hepatotoxisch. In dieser Arbeit wurde eine Dosis von 5 mg / kg Herzgewicht, also 0,03 mg / kg Körpergewicht appliziert und liegt somit weit unter den untersuchten [144] und zuvor in Schweinen im Rahmen LNA-basierter miR-15-Inhibitoren [71] und Primaten zur miR-122-Inhibition [42] applizierten Konzentrationen. Dadurch könnte die tendenziell schwächere Wirkung der miR-92a-Suppression nach systemischer LNA-92a-Gabe erklärt werden. Die auf Hepatotoxizität hinweisenden Daten wurden zudem anhand einer in vier Basen inkomplementären LNA erhoben und die Toxizität schien mit Erhöhung des Mismatches anzusteigen [144]. Die LNA-92a ist hingegen von Base 2 bis 17 vollständig zu miR-92a komplementär. Regionale LNA-92a-Applikation zeigte in den hier durchgeführten Untersuchungen zudem eine relative geringfügige Beeinflussung der miR-92a-Expression in der Leber.

Dennoch verdeutlicht der Hinweis auf Hepatotoxizität, dass die Applikation möglichst schonend, also regional begrenzt und mit möglichst geringer Dosis, stattfinden sollte. Genauere Kenntnis der Zielgene der miR-92a werden zusätzliche Einblicke zur Abschätzung von Nebeneffekten der LNA-92a-Therapie geben müssen. Generell bedarf es bei Applikation therapeutischer Substanzen wie LNAs immer eines Schutzes des umliegenden Organismus durch möglichst niedrig dosierte und regional Applikation [153].

Zusammenfassend ist die regional begrenzte LNA-92a-Applikation bezüglich Effektivität der miR-92a-Expression im Zielgebiet, funktioneller Verbesserung und

extrakardialer Beeinflussung der miR-92a-Expression der systemischen Gabe überlegen.

4.4.3 Bewertung der vorliegenden Daten im Hinblick auf den klinischen Einsatz

4.4.3.1 Anforderungen an präklinische Studien

Die Translation zahlreicher in präklinischen Studien als kardioprotektiv im Sinne der Eindämmung des Ischämie-/Reperfusionsschadens beschriebener Faktoren ist nicht nur im Kontext des Myokardinfarkts, sondern auch für andere von Ischämie und Reperfusion betroffene Organe, wie beispielsweise für Skelettmuskulatur im Rahmen des Kompartmentsyndroms oder das Gehirn nach Apoplex, attraktiv. Therapeutische Ansätze sind deshalb von hoher Relevanz, jedoch weisen sie Schwierigkeiten in der Translation in die Klinik auf [11, 163, 61]. Gründe dafür sind vor allem in

1. der fehlgeschlagenen Entwicklung von Interventionen in klinischen Studien, die gegen validierte Ziele gerichtet sind
2. inadäquater oder insuffizienter präklinische Testung der therapeutischen Intervention vor klinischer Testung
3. dem Design der klinischen Kardioprotektionsstudien

zu suchen [61].

Die vorliegenden Ergebnisse basieren auf präklinischen Versuchen, die die Mehrzahl der postulierten Forderungen zur erfolgreichen Translation erfüllen [11, 163, 61].

So wurde mit dem Schwein ein Großtiermodell gewählt. Das Schweineherz ist in Struktur und Perfusion mit dem des Menschen vergleichbar, das arrhythmogene Potential sogar erhöht [102]. Obwohl die Infarktdauer in unseren Versuchen lediglich 60 Minuten beträgt, während in der klinischen Realität oft die „Golden Hour“ überschritten wird, zeigen experimentelle Daten, dass die Progression des Infarktareals im Tiermodell schneller als beim Menschen vonstattengeht [63]. Mit humanen Werten verglichene Ratten-, Schweine- und Hundedaten ließen ein signifikant früheres Absterben von Herzgewebe nach Ischämieinduktion und damit ein vorzeitiges Erreichen des definierten Infarktareals von 50 % der gesamten AAR beobachten. Beim Schwein wurde dieser Wert bereits nach 38-minütiger Ischämie,

beim Patienten nach 288 Minuten erreicht [63]. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Modell überschätzt somit die Infarktentwicklung vom Zeitverlauf her tendenziell. Zudem wurde zur Koronarokklusion ein Angioplastie-Ballon verwendet und entweder über diesen (OTW-Katheter), mittels SSR-Katheter oder systemisch die LNA-Behandlung durchgeführt. Im Rahmen potentiell klinischer Anwendung der LNA-92a könnte diese direkt, wie in unserem Versuchsablauf, antegrad in das betroffene Koronargefäß mittels OTW-Katheter und basierend auf gezeigten Daten möglichst simultan zur Reperfusion erfolgen.

Des Weiteren wurde in vorliegender Arbeit die Infarktgröße in Abhängigkeit von der Area at Risk und in Zusammenhang mit der Myokardfunktion betrachtet.

Hinsichtlich Infarktdauer, damit korrespondierend Infarktausmaß und auch der Möglichkeit primärer therapeutischer Intervention ist das in dieser Arbeit untersuchte präklinische Schweinemodell folglich durchaus geeignet, um einen translationalen Ansatz zu verfolgen.

Eine detailliertere Klärung der molekularen Auswirkungen der miR-92a-Suppression ist auch im Langzeitverlauf für das Verständnis der Wirkmechanismen von Bedeutung.

Diese Studie wurde an jungen, gesunden Tieren durchgeführt, sodass der kardioprotektive Nutzen der LNA-92a für den älteren Patienten mit multiplen kardiovaskulären Risikofaktoren durch weitere Untersuchungen im präklinischen Modell mit zusätzlichen Faktoren wie Hyperlipidämie [27], Diabetes mellitus oder arteriellem Hypertonus im Sinne eines translationalen Ansatzes [91, 61] zusätzlich abgeklärt werden muss.

4.4.3.2 Vergleich kardioprotektiver Therapieansätze

Ein Vergleich der LNA-92a-vermittelten miR-92a-Suppression mit ebenfalls auf Kardioprotektion abzielenden Therapieoptionen wie induzierter Hypothermie, ischämischer Postkonditionierung, Cyclosporin A- und Thymosin β 4-Behandlung bietet sich hinsichtlich möglicher Vorteile gegenüber diesen präklinisch erprobten Strategien an.

Die induzierte Hypothermie bei Patienten mit Myokardinfarkt ist ausgehend von experimentellen Studien durchaus vielversprechend [58, 52] mit einer

Infarktreaktion im Schweinmodell von über 45 % [28, 52]. Der protektive Effekt der Hypothermie ist vermutlich durch eine generelle Verlangsamung des Zellstoffwechsels bedingt. Zudem wurde eine verbesserte Mikrozirkulation bei Hypothermie beobachtet [52]. Klinische Ergebnisse sind jedoch trotz einer positiven Tendenz gemischt [36, 55, 53].

Für die Postkonditionierung, die sich mit Beginn der Reperfusion durch wiederkehrende kurze Ischämie-Episoden auszeichnet, konnte in Hunden eine Reduktion der Infarktgröße um bis zu 40 % erzielt werden. Dies hatte allerdings keine funktionelle Verbesserung zur Folge [171]. In einem Schweinmodell wurde eine Verminderung der Apoptose, Schonung von etwa 50 % der AAR und Verbesserung der Ejektionsfraktion um 30 % im Vergleich zu alleiniger Reperfusion beobachtet [154]. In klinischen Studien wurden bislang jedoch widersprüchliche Ergebnisse erzielt [139, 50]. So konnte in einer Studie mit 79 Patienten kein Vorteil der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden, was unter anderem mit koronarer Mikroembolisation durch häufige In- und Deflation des Ballons erklärt wurde [50]. Positive Ergebnisse konnten hingegen in einer kleineren klinischen Studie mit 30 Patienten erzielt werden [139]. Dort verringerte sich die auf Kreatinkinase-Konzentration basierend geschätzte Infarktgröße um etwa ein Drittel. Allerdings wurde eine Verbesserung der Myokardfunktion respektive das klinische Outcome der Patienten nicht erhoben [61].

Mittels pharmakologischer Präkonditionierung zu Beginn der Reperfusion konnte durch Cyclosporin A-Behandlung eine Reduktion der Infarktgröße um 45 % in Rattenherzen erzielt werden [60]. In einer klinischen Studie an 58 Patienten wurde eine ebenfalls auf Kreatinkinase-Konzentration basierend geschätzte Infarktgrößenverringering von 44 % nach 72 Stunden und 28 % nach sechs Monaten erzielt, während die Troponin-I-Werte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe aufwiesen. MRT-Untersuchung ergab eine Reduktion der Größe des hyperintensiven Areals um 20 % nach 72 Stunden bzw. 28 % nach sechs Monaten [128]. Somit war in dieser ersten klinischen Studie, die 58 Patienten einschloss, ein kardioprotektiver Effekt im Vergleich zur Kontrollbehandlung zu beobachten.

In der CIRCUS-Studie konnte jedoch kein verbessertes klinisches Outcome bei Patienten beobachtet werden, die mit intravenösem Cyclosporin vor Rekanalisierung behandelt wurden [24].

Eine Behandlung mit Thymosin β 4 als präklinisch untersuchter, kardioprotektiver Substanz konnte im Schweinmodell eine Reduktion der Infarktgröße um knapp 20 % und eine ebenso starke Verbesserung der regionalen Myokardfunktion erzielen [66, 68]. Klinische Phase I- und Phase II-Studien fehlen allerdings bislang.

Die Reduktion der Infarktgröße betreffend ist die LNA-92a-Applikation der Hypothermie, Postkonditionierung, Cyclosporin A- und Thymosin β 4-Behandlung hinsichtlich der Reduktion der Infarktgröße etwa gleichwertig. Außerdem konnte funktionell die Ejektionsfraktion ebenso um etwa als 30 % (relativ) und die Kontraktilität auf 30 % (absolut) und im Vergleich zur Kontrolle damit um das 300-fache gesteigert werden. Die LNA-92a-Behandlung stellt zudem bezüglich der wenig aufwendigen Applikation und des längeren Wirkprofils im Vergleich zur Applikation von Peptiden und Proteinen eine mögliche Alternative zu den bisher klinisch untersuchten kardioprotektiven Strategien dar.

4.4.3.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten des akuten und subakuten Ischämie-/ Reperfusionsschadens im präklinischen Schweinmodell, dass die regionale LNA-92a-Behandlung im präklinischen Akutmodell der Ischämie/Reperfusion aufgrund der Verminderung des Reperfusionsschadens auf Basis eines kombinierten Endothelzell- und Kardiomyozytenschutzes kardioprotektiv ist. Sie erweitern die von Bonauer et al. [12] publizierten Ergebnisse bezüglich der anti-angiogenetischen Funktion der miR-92a im kardiovaskulären System um den translationalen Aspekt sowie um zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der miR-92a-Wirkung auf die Mechanismen des Reperfusionsschadens. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die lokale, Katheter-basierte Gabe der LNA-92a einen stärker kardioprotektiven Effekt als die systemische Applikation erzielt.

Die auf den Reperfusionsschaden abzielenden LNA-92a-vermittelten Kardioprotektion ist ein vielversprechender neuer Therapieansatz und folgt dem Paradigma der Prognoseverbesserung nach Myokardinfarkt: *Reperfusion der verschlossenen Arterie - Erhalt des Myokards - Aufrechterhaltung der regionalen Funktion - Aufrechterhaltung der globalen linksventrikulären Funktion - verbessertes Überleben des Patienten* [81].

Die vorliegende Arbeit kommt bereits zum Großteil den vorstehend beschriebenen Forderungen zur erfolgreichen Translation präklinischer Ergebnisse in der Klinik nach. Im Vergleich mit den wenigen anderen auf den Reperfusionsschaden abzielenden potentiellen Therapeutika wie Thymosin β 4 oder Cyclosporin A stellt die LNA-92a aufgrund des pleiotropen Ansatzes und der Wirkdauer, eine geeignetere Therapieoption dar.

Dennoch ist die Durchführung von Versuchen der chronischen Reperfusion und mit zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktoren in der Folge unabdingbar, um langfristige Auswirkungen der LNA-92a-Behandlung beobachten zu können und den Ziel-Patienten gerecht zu werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das miRNA-Expressionsprofil ist in verschiedenen Erkrankungen, u.a. im akuten Myokardinfarkt verändert und verspricht so im Hinblick auf deren Modifikation einen Nutzen als neuer therapeutischer Angriffspunkt. Inhibition der miR-92a durch Antisense-Moleküle verbesserte die Neovaskularisierung bei chronischer Ischämie und reduzierte die Infarktgröße nach LAD-Verschluss im Mausmodell. Um eine Aussage über den Nutzen der miR-92a-Suppression bezüglich Kardioprotektion im Ischämie-/Reperfusionsschaden treffen zu können, wurde die vorliegende präklinische Studie im Schweinemodell durchgeführt. Zudem wurden verschiedene Applikationsarten der LNA-92a verglichen. Die Reduktion der miR-92a-Expression via regionaler LNA-92a-Applikation im akuten und subakuten Ischämie-/Reperfusionmodell reduzierte die Infarktgröße und verbesserte die Myokardfunktion; Verminderung der Apoptose und Entzündungsreaktion wurden beobachtet. In Zellkulturversuchen der Hypoxie/Reoxygenierung war nach LNA-92a-Präinkubation ein direkt protektiver Effekt auf Endothelzell- und Kardiomyozytenüberleben und einen indirekt protektiven Effekt auf kardiomyozytäres Überleben durch Endothelzell-Behandlung zu verzeichnen. Flusskammerversuche ergaben eine deutlich verminderte Adhäsionsfähigkeit von monozytären Zellen auf einer Endothelzellschicht nach LNA-92a-Präinkubation je einer der Zellarten. Zusammenfassend konnten eine Verminderung des Reperfusionsschadens auf Basis eines Endothelzell- und Kardiomyozytenschutzes im Sinne der Kardioprotektion beobachtet werden. Die regionale miR-92a-Inhibition stellt somit eine neuartige therapeutische Option zur Verbesserung der kardialen Funktion nach Ischämie/Reperfusion dar. Aufgrund der längeren LNA-92a-Wirkdauer im Vergleich zu anderen auf den Reperfusionsschaden abzielenden Ansätzen wie Cyclosporin A oder mechanische Postkonditionierung ist die LNA-92a diesen Strategien bei vergleichbaren präklinischen Ergebnissen im Langzeitverlauf potentiell überlegen, da sie auf die akute und subakute Phase der Reperfusion abzielt. Weitere Untersuchungen im präklinischen Modell bieten sich hinsichtlich eines Langzeitmodells zur Evaluierung der Entwicklung von Herzinsuffizienz nach Ischämie/Reperfusion ebenso an wie die Kombination von Ischämie/Reperfusion mit zusätzlichen kardiovaskulären Risikofaktoren.

6 Abkürzungen

AAR	Area at Risk
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AIV	Vena interventricularis anterior
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Aortic Pressure
bzw.	beziehungsweise
CABG	Coronary Artery Bypass Graft
CAD	Coronary Artery Disease
CAM	Cellular Adhesion Molecule
DAG	Diacylglycerol
dLVP/dt	Ableitung des linksventrikulären Drucks nach der Zeit
dLVP/dt _{max}	maximalen Anstieg des linksventrikulären Drucks
dLVP/dt _{min}	maximalen Abfall des linksventrikulären Drucks
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDL	enddiastolische Länge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EDV	enddiastolisches Volumen
ESL	endsystolische Länge
ESC	European Society of Cardiology
ESV	endsystolisches Volumen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GFP	Green Fluorescence Protein
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrochlorid
HRP	horseradish peroxidase
HTAB	Hexadecyltrimethylammonium-Bromid
HUVEC	Human Umbilical Endothelial Cell
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICF	Institut für Chirurgische Forschung

IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
KLF2	Krüppel-like Factor 2
KG	Körpergewicht
KOH	Kaliumhydroxid
Kon	Kontrolle
LAD	Left Anterior Descending (Coronary) Artery
LNA	Locked Nucleic Acid
LV	linker Ventrikel
LVEDP	Left Ventricular Enddiastolic Pressure
LVP	Left Ventricular Pressure
miRNA	micro Ribonucleic Acid
MKK4	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4
MPO	Myeloperoxidase
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natrium-Chlorid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSTEMI	Non ST Elevation Myocardial Infarction
NYHA	New York Heart Association
OTW	Over The Wire
PBS	Phosphate buffered Saline
PCI	Percutaneous Coronary Intervention
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
RCx	Ramus circumflexus (der linken Koronararterie)
SES	Subendothelial Segment Shortening
S1P ₁	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1
SPP	Sphingosin-1-Phosphat
SSC	Saline Sodium Citrate
SSR	Synchronized Suction and Retroinfusion
STEMI	ST Elevation Myocardial Infarction
TBS	Tris Buffered Saline
TdT	terminale Desoxynukleotid-Transferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan

TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
TUNEL	Terminal UDP Nick End Labeling
% SS	prozentuale Veränderung der Segmentlänge

7 Literaturverzeichnis

1. Adachi, T, Nakanishi, M, Otsuka, Y, Nishimura, K, et al., *Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction*. Clin Chem, 2010. **56**(7): p. 1183-5.
2. Anton, R, Chatterjee, S S, Simundza, J, Cowin, P, et al., *A systematic screen for micro-RNAs regulating the canonical Wnt pathway*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26257.
3. Anzai, T, *Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword*. Circ J, 2013. **77**(3): p. 580-7.
4. Argaud, L, Gateau-Roesch, O, Raisky, O, Loufouat, J, et al., *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition*. Circulation, 2005. **111**(2): p. 194-7.
5. Baan, J, van der Velde, E T, de Bruin, H G, Smeenk, G J, et al., *Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter*. Circulation, 1984. **70**(5): p. 812-23.
6. Barron, H V, Harr, S D, Radford, M J, Wang, Y, et al., *The association between white blood cell count and acute myocardial infarction mortality in patients > or =65 years of age: findings from the cooperative cardiovascular project*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(6): p. 1654-61.
7. Bicer, A, Karakurt, O, Akdemir, R, Erden, G, et al., *Thymosin beta 4 is associated with collateral development in coronary artery disease*. Scand J Clin Lab Invest, 2011. **71**(8): p. 625-30.
8. Bock-Marquette, I, Saxena, A, White, M D, Dimaio, J M, et al., *Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair*. Nature, 2004. **432**(7016): p. 466-72.
9. Böcker, D, Heitz, Moch et al., *Pathologie*. 4 ed, ed. Böcker. 2008, München: Urban & Fischer Elsevier
10. Boekstegers, P, Diebold, J, and Weiss, C, *Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs*. Cardiovasc Res, 1990. **24**(6): p. 456-64.
11. Bolli, R, Becker, L, Gross, G, Mentzer, R, Jr., et al., *Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy*. Circ Res, 2004. **95**(2): p. 125-34.
12. Bonauer, A, Carmona, G, Iwasaki, M, Mione, M, et al., *MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1710-3.
13. Bonauer, A and Dimmeler, S, *The microRNA-17-92 cluster: still a miRacle?* Cell Cycle, 2009. **8**(23): p. 3866-73.

14. Boyer, N H and Gerstein, M M, *Induced hypothermia in dogs with acute myocardial infarction and shock*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1977. **74**(2): p. 286-94.
15. Breisch, E A, White, F C, Nimmo, L E, McKirnan, M D, et al., *Exercise-induced cardiac hypertrophy: a correlation of blood flow and microvasculature*. J Appl Physiol, 1986. **60**(4): p. 1259-67.
16. Brooks, P C, Clark, R A, and Cheresh, D A, *Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis*. Science, 1994. **264**(5158): p. 569-71.
17. Brooks, P C, Stromblad, S, Klemke, R, Visscher, D, et al., *Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin*. J Clin Invest, 1995. **96**(4): p. 1815-22.
18. Buja, L M and Entman, M L, *Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease*. Circulation, 1998. **98**(14): p. 1355-7.
19. Bundesamt, S, *Statistisches Jahrbuch, 2012*, Statistisches Bundesamt: Wiesbaden. p. 117.
20. Bundesamt, S, *Die 20 häufigsten Hauptdiagnosen der vollstationär behandelten Patienten (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) nach der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 2010 (ICD-10)*. 2012.
21. Chrzanowska-Wodnicka, M, Kraus, A E, Gale, D, White, G C, 2nd, et al., *Defective angiogenesis, endothelial migration, proliferation, and MAPK signaling in Rap1b-deficient mice*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2647-56.
22. Cleutjens, J P, Blankesteyn, W M, Daemen, M J, and Smits, J F, *The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(2): p. 232-41.
23. Cochain, C, Channon, K M, and Silvestre, J S, *Angiogenesis in the infarcted myocardium*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(9): p. 1100-13.
24. Cung, T T, Morel, O, Cayla, G, Rioufol, G, et al., *Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2015. **373**(11): p. 1021-31.
25. D'Alessandra, Y, Devanna, P, Limana, F, Straino, S, et al., *Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2010. **31**(22): p. 2765-73.
26. D'Alessandra, Y, Pompilio, G, and Capogrossi, M C, *MicroRNAs and myocardial infarction*. Curr Opin Cardiol, 2012. **27**(3): p. 228-35.
27. D'Annunzio, V, Donato, M, Buchholz, B, Perez, V, et al., *High cholesterol diet effects on ischemia-reperfusion injury of the heart*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(9): p. 1185-96.

28. Dae, M W, Gao, D W, Sessler, D I, Chair, K, et al., *Effect of endovascular cooling on myocardial temperature, infarct size, and cardiac output in human-sized pigs*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. H1584-91.
29. Daniel, J M, Penzkofer, D, Teske, R, Dutzmann, J, et al., *Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(4): p. 564-72.
30. Danielson, L S, Park, D S, Rotllan, N, Chamorro-Jorganes, A, et al., *Cardiovascular dysregulation of miR-17-92 causes a lethal hypertrophic cardiomyopathy and arrhythmogenesis*. FASEB J, 2013. **27**(4): p. 1460-7.
31. De Caterina, R, Libby, P, Peng, H B, Thannickal, V J, et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
32. Deussen, A, *Blood flow heterogeneity in the heart*. Basic Res Cardiol, 1998. **93**(6): p. 430-8.
33. Dews, M, Homayouni, A, Yu, D, Murphy, D, et al., *Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster*. Nat Genet, 2006. **38**(9): p. 1060-5.
34. Dirkx, E, Gladka, M M, Philippen, L E, Armand, A S, et al., *Nfat and miR-25 cooperate to reactivate the transcription factor Hand2 in heart failure*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(11): p. 1282-93.
35. Divakaran, V, Adrogué, J, Ishiyama, M, Entman, M L, et al., *Adaptive and maladaptive effects of SMAD3 signaling in the adult heart after hemodynamic pressure overloading*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(6): p. 633-42.
36. Dixon, S R, Whitbourn, R J, Dae, M W, Grube, E, et al., *Induction of mild systemic hypothermia with endovascular cooling during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(11): p. 1928-34.
37. Doebele, C, Bonauer, A, Fischer, A, Scholz, A, et al., *Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells*. Blood, 2010. **115**(23): p. 4944-50.
38. Dreyer, W J, Michael, L H, West, M S, Smith, C W, et al., *Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion*. Circulation, 1991. **84**(1): p. 400-11.
39. Duilio, C, Ambrosio, G, Kuppusamy, P, DiPaula, A, et al., *Neutrophils are primary source of O₂ radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2649-57.

40. Durig, J, Duhrsen, U, Klein-Hitpass, L, Worm, J, et al., *The novel antisense Bcl-2 inhibitor SPC2996 causes rapid leukemic cell clearance and immune activation in chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 2011. **25**(4): p. 638-47.
41. Eefting, F, Rensing, B, Wigman, J, Pannekoek, W J, et al., *Role of apoptosis in reperfusion injury*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 414-26.
42. Elmen, J, Lindow, M, Schutz, S, Lawrence, M, et al., *LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates*. *Nature*, 2008. **452**(7189): p. 896-9.
43. Elrod, J W, Greer, J J, Bryan, N S, Langston, W, et al., *Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. 1517-23.
44. Fang, W K, Liao, L D, Li, L Y, Xie, Y M, et al., *Down-regulated desmocollin-2 promotes cell aggressiveness through redistributing adherens junctions and activating beta-catenin signalling in oesophageal squamous cell carcinoma*. *J Pathol*, 2013. **231**(2): p. 257-70.
45. Fang, Y and Davies, P F, *Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(4): p. 979-87.
46. Fichtlscherer, S, De Rosa, S, Fox, H, Schwietz, T, et al., *Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease*. *Circ Res*, 2010. **107**(5): p. 677-84.
47. Forrester, J S, Wyatt, H L, Da Luz, P L, Tyberg, J V, et al., *Functional significance of regional ischemic contraction abnormalities*. *Circulation*, 1976. **54**(1): p. 64-70.
48. Frangogiannis, N G, Smith, C W, and Entman, M L, *The inflammatory response in myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(1): p. 31-47.
49. Frangogiannis, N G, *Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(2): p. 635-88.
50. Freixa, X, Bellera, N, Ortiz-Perez, J T, Jimenez, M, et al., *Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(1): p. 103-12.
51. Go, A S, Mozaffarian, D, Roger, V L, Benjamin, E J, et al., *Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. *Circulation*, 2012. **127**(1): p. e6-e245.
52. Gotberg, M, Olivecrona, G K, Engblom, H, Ugander, M, et al., *Rapid short-duration hypothermia with cold saline and endovascular cooling before reperfusion reduces microvascular obstruction and myocardial infarct size*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2008. **8**: p. 7.
53. Gotberg, M, Olivecrona, G K, Koul, S, Carlsson, M, et al., *A pilot study of rapid cooling by cold saline and endovascular cooling before reperfusion in patients*

- with ST-elevation myocardial infarction*. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010. **3**(5): p. 400-7.
54. Griffiths, E J and Halestrap, A P, *Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion*. *Biochem J*, 1995. **307 (Pt 1)**: p. 93-8.
 55. Gruberg, L, *COOL-MI: Cooling as an Adjunctive Therapy to Percutaneous Intervention in Patients With Acute Myocardial Infarction*. Medscape, 2003.
 56. Guarani, V, Deflorian, G, Franco, C A, Kruger, M, et al., *Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase*. *Nature*, 2011. **473**(7346): p. 234-8.
 57. Gupta, S K, Bang, C, and Thum, T, *Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease*. *Circ Cardiovasc Genet*, 2010. **3**(5): p. 484-8.
 58. Hale, S L and Kloner, R A, *Myocardial hypothermia: a potential therapeutic technique for acute regional myocardial ischemia*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999. **10**(3): p. 405-13.
 59. Haunstetter, A and Izumo, S, *Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease*. *Circ Res*, 1998. **82**(11): p. 1111-29.
 60. Hausenloy, D J, Maddock, H L, Baxter, G F, and Yellon, D M, *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(3): p. 534-43.
 61. Hausenloy, D J, Erik Botker, H, Condorelli, G, Ferdinandy, P, et al., *Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology*. *Cardiovasc Res*, 2013. **98**(1): p. 7-27.
 62. Hearse, D J, Humphrey, S M, and Chain, E B, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. *J Mol Cell Cardiol*, 1973. **5**(4): p. 395-407.
 63. Hedstrom, E, Engblom, H, Frogner, F, Astrom-Olsson, K, et al., *Infarct evolution in man studied in patients with first-time coronary occlusion in comparison to different species - implications for assessment of myocardial salvage*. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2009. **11**: p. 38.
 64. Heimisch, W, Schad, H, Mendler, N, and Sebening, F, *Cyclic motion of ischemic ventricular wall area and hydrodynamics of the blood during ejection*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1991. **39 Suppl 3**: p. 205-10.
 65. Hergenreider, E, Heydt, S, Treguer, K, Boettger, T, et al., *Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs*. *Nat Cell Biol*, 2012. **14**(3): p. 249-56.

66. Hinkel, R, El-Aouni, C, Olson, T, Horstkotte, J, et al., *Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection*. Circulation, 2008. **117**(17): p. 2232-40.
67. Hinkel, R, Bock-Marquette, I, Hatzopoulos, A K, and Kupatt, C, *Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1194**: p. 105-11.
68. Hinkel, R, Boekstegers, P, and Kupatt, C, *Adjuvant early and late cardioprotective therapy: access to the heart*. Cardiovasc Res, 2012. **94**(2): p. 226-36.
69. Hinkel, R, Trenkwalder, T, and Kupatt, C, *Molecular and cellular mechanisms of thymosin beta4-mediated cardioprotection*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1269**: p. 102-9.
70. Horie, H, Takahashi, M, Minai, K, Izumi, M, et al., *Long-term beneficial effect of late reperfusion for acute anterior myocardial infarction with percutaneous transluminal coronary angioplasty*. Circulation, 1998. **98**(22): p. 2377-82.
71. Hullinger, T G, Montgomery, R L, Seto, A G, Dickinson, B A, et al., *Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury*. Circ Res, 2012. **110**(1): p. 71-81.
72. Hunter, M P, Ismail, N, Zhang, X, Aguda, B D, et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.
73. Ishikawa, K, Chemaly, E R, Tilemann, L, Fish, K, et al., *Assessing left ventricular systolic dysfunction after myocardial infarction: are ejection fraction and dP/dt(max) complementary or redundant?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(7): p. H1423-8.
74. Janssen, H L, Reesink, H W, Lawitz, E J, Zeuzem, S, et al., *Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA*. N Engl J Med, 2013.
75. Jayawardena, T M, Egemnazarov, B, Finch, E A, Zhang, L, et al., *MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes*. Circ Res, 2012. **110**(11): p. 1465-73.
76. Ji, X, Takahashi, R, Hiura, Y, Hirokawa, G, et al., *Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury*. Clin Chem, 2009. **55**(11): p. 1944-9.
77. Jolly, S R, Kane, W J, Bailie, M B, Abrams, G D, et al., *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase*. Circ Res, 1984. **54**(3): p. 277-85.
78. Jugdutt, B I, *Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough?* Circulation, 2003. **108**(11): p. 1395-403.

79. Kalogeris, T, Bao, Y, and Korthuis, R J, *Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 702-14.
80. Khosravi-Far, R and Esposti, M D, *Death receptor signals to mitochondria*. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(11): p. 1051-7.
81. Kim, C B and Braunwald, E, *Potential benefits of late reperfusion of infarcted myocardium. The open artery hypothesis*. Circulation, 1993. **88**(5 Pt 1): p. 2426-36.
82. Klinke, A, Nussbaum, C, Kubala, L, Friedrichs, K, et al., *Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces*. Blood, 2011. **117**(4): p. 1350-8.
83. Kostin, S, Pool, L, Elsasser, A, Hein, S, et al., *Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts*. Circ Res, 2003. **92**(7): p. 715-24.
84. Kruk, M, Kadziela, J, Reynolds, H R, Forman, S A, et al., *Predictors of outcome and the lack of effect of percutaneous coronary intervention across the risk strata in patients with persistent total occlusion after myocardial infarction: Results from the OAT (Occluded Artery Trial) study*. JACC Cardiovasc Interv, 2008. **1**(5): p. 511-20.
85. Krutzfeldt, J, Rajewsky, N, Braich, R, Rajeev, K G, et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.
86. Kumar, M, Lu, Z, Takwi, A A, Chen, W, et al., *Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs*. Oncogene, 2011. **30**(7): p. 843-53.
87. Kupatt, C, Hinkel, R, Horstkotte, J, Deiss, M, et al., *Selective retroinfusion of GSH and cariporide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in a preclinical pig model*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 530-7.
88. Kupatt, C, Horstkotte, J, Vlastos, G A, Pfosser, A, et al., *Embryonic endothelial progenitor cells expressing a broad range of proangiogenic and remodeling factors enhance vascularization and tissue recovery in acute and chronic ischemia*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1576-8.
89. Kupatt, C, Hinkel, R, von Bruhl, M L, Pohl, T, et al., *Endothelial nitric oxide synthase overexpression provides a functionally relevant angiogenic switch in hibernating pig myocardium*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(14): p. 1575-84.
90. Kupatt, C, *Nonviral intercellular adhesion molecule-1 small interfering ribonucleic acid sequences transfection in vivo how ultrasound bursts into therapy*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(9): p. 914-6.
91. Lahtenvuo, J and Rosenzweig, A, *Effects of aging on angiogenesis*. Circ Res, 2012. **110**(9): p. 1252-64.
92. Lee, P, Sata, M, Lefer, D J, Factor, S M, et al., *Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(2): p. H456-63.

93. Lee, R C, Feinbaum, R L, and Ambros, V, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
94. Leucker, T M, Bienengraeber, M, Muravyeva, M, Baotic, I, et al., *Endothelial-cardiomyocyte crosstalk enhances pharmacological cardioprotection*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(5): p. 803-11.
95. Li, L, Zhang, H N, Chen, H Z, Gao, P, et al., *SIRT1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice*. Circ Res, 2011. **108**(10): p. 1180-9.
96. Li, Q, Zou, C, Zou, C, Han, Z, et al., *MicroRNA-25 functions as a potential tumor suppressor in colon cancer by targeting Smad7*. Cancer Lett, 2013. **335**(1): p. 168-74.
97. Lindow, M and Kauppinen, S, *Discovering the first microRNA-targeted drug*. J Cell Biol, 2012. **199**(3): p. 407-12.
98. Litt, M R, Jeremy, R W, Weisman, H F, Winkelstein, J A, et al., *Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury*. Circulation, 1989. **80**(6): p. 1816-27.
99. Ma, X L, Weyrich, A S, Lefer, D J, Buerke, M, et al., *Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium*. Circulation, 1993. **88**(2): p. 649-58.
100. Maekawa, Y, Anzai, T, Yoshikawa, T, Sugano, Y, et al., *Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(7): p. 1510-20.
101. Majno, G and Joris, I, *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 3-15.
102. Mandel, C R, *Untersuchungen zum Einfluss von Erythropoietin auf die myokardiale Funktion des ischämischen Schweineherzens, in Institut für Tierpathologie Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie*. 2005, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
103. Marchi, S, Lupini, L, Patergnani, S, Rimessi, A, et al., *Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25*. Curr Biol, 2013. **23**(1): p. 58-63.
104. Marti, H J, Bernaudin, M, Bellail, A, Schoch, H, et al., *Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia*. Am J Pathol, 2000. **156**(3): p. 965-76.
105. Meerbaum, S, Lang, T W, Osher, J V, Hashimoto, K, et al., *Diastolic retroperfusion of acutely ischemic myocardium*. Am J Cardiol, 1976. **37**(4): p. 588-98.

106. Meijer, H A, Kong, Y W, Lu, W T, Wilczynska, A, et al., *Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation*. Science, 2013. **340**(6128): p. 82-5.
107. Merchant, F M, Dec, G W, and Singh, J P, *Implantable sensors for heart failure*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2010. **3**(6): p. 657-67.
108. Mewton, N, Bochaton, T, and Ovize, M, *Postconditioning the heart of ST-elevation myocardial infarction patients*. Circ J, 2013. **77**(5): p. 1123-30.
109. Micallef, L, Vedrenne, N, Billet, F, Coulomb, B, et al., *The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5 Suppl 1**: p. S5.
110. Minicucci, M F, Azevedo, P S, Polegato, B F, Paiva, S A, et al., *Heart failure after myocardial infarction: clinical implications and treatment*. Clin Cardiol, 2011. **34**(7): p. 410-4.
111. Mitchell, P S, Parkin, R K, Kroh, E M, Fritz, B R, et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
112. Mogilyansky, E and Rigoutsos, I, *The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease*. Cell Death Differ, 2013. **20**(12): p. 1603-14.
113. Mohl, W, Glogar, D H, Mayr, H, Losert, U, et al., *Reduction of infarct size induced by pressure-controlled intermittent coronary sinus occlusion*. Am J Cardiol, 1984. **53**(7): p. 923-8.
114. Montgomery, R L, Hullinger, T G, Semus, H M, Dickinson, B A, et al., *Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure*. Circulation, 2011. **124**(14): p. 1537-47.
115. Murohara, T, Asahara, T, Silver, M, Bauters, C, et al., *Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2567-78.
116. Nahrendorf, M, Swirski, F K, Aikawa, E, Stangenberg, L, et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 3037-47.
117. Nahrendorf, M, Pittet, M J, and Swirski, F K, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
118. Namlos, H M, Meza-Zepeda, L A, Baroy, T, Ostensen, I H, et al., *Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48086.

119. Nilsson, S, Moller, C, Jirstrom, K, Lee, A, et al., *Downregulation of miR-92a is associated with aggressive breast cancer features and increased tumour macrophage infiltration*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e36051.
120. Ohyashiki, M, Ohyashiki, J H, Hirota, A, Kobayashi, C, et al., *Age-related decrease of miRNA-92a levels in human CD8+ T-cells correlates with a reduction of naive T lymphocytes*. Immun Ageing, 2011. **8**(1): p. 11.
121. Olive, V, Bennett, M J, Walker, J C, Ma, C, et al., *miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92*. Genes Dev, 2009. **23**(24): p. 2839-49.
122. Olive, V, Sabio, E, Bennett, M J, De Jong, C S, et al., *A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis*. eLife, 2013. **2**.
123. Olivetti, G, Abbi, R, Quaini, F, Kajstura, J, et al., *Apoptosis in the failing human heart*. N Engl J Med, 1997. **336**(16): p. 1131-41.
124. Paik, J H, Chae, S, Lee, M J, Thangada, S, et al., *Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins*. J Biol Chem, 2001. **276**(15): p. 11830-7.
125. Park, C Y, Choi, Y S, and McManus, M T, *Analysis of microRNA knockouts in mice*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R169-75.
126. Petri, B, Phillipson, M, and Kubes, P, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
127. Pfeffer, M A and Braunwald, E, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-72.
128. Piot, C, Croisille, P, Staat, P, Thibault, H, et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.
129. Potente, M, Ghaeni, L, Baldessari, D, Mostoslavsky, R, et al., *SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth*. Genes Dev, 2007. **21**(20): p. 2644-58.
130. Pritchard, C C, Montano, M, Baker, A, and Sanders, S. *DETECTING DISEASE IN BLOOD*. Science Webinar Series. 2012; Available from: [http://webinar.sciencemag.org/files/transcripts/1357773112/Transcript_Detecting Disease Biomarkers webinar on 30 May 2012.pdf](http://webinar.sciencemag.org/files/transcripts/1357773112/Transcript_Detecting_Disease_Biomarkers_webinar_on_30_May_2012.pdf).
131. Raake, P, von Degenfeld, G, Hinkel, R, Vachenaer, R, et al., *Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(5): p. 1124-9.

132. Rahimtoola, S H, *The hibernating myocardium*. Am Heart J, 1989. **117**(1): p. 211-21.
133. Roger, V L, Weston, S A, Redfield, M M, Hellermann-Homan, J P, et al., *Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population*. JAMA, 2004. **292**(3): p. 344-50.
134. Romson, J L, Hook, B G, Kunkel, S L, Abrams, G D, et al., *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog*. Circulation, 1983. **67**(5): p. 1016-23.
135. Sapra, P, Wang, M, Bandaru, R, Zhao, H, et al., *Down-modulation of survivin expression and inhibition of tumor growth in vivo by EZN-3042, a locked nucleic acid antisense oligonucleotide*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2010. **29**(2): p. 97-112.
136. Sharp, B R, Jones, S P, Rimmer, D M, and Lefer, D J, *Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(6): p. H2422-6.
137. Somel, M, Liu, X, Tang, L, Yan, Z, et al., *MicroRNA-driven developmental remodeling in the brain distinguishes humans from other primates*. PLoS Biol, 2011. **9**(12): p. e1001214.
138. Spiegel, S and Milstien, S, *Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25851-4.
139. Staat, P, Rioufol, G, Piot, C, Cottin, Y, et al., *Postconditioning the human heart*. Circulation, 2005. **112**(14): p. 2143-8.
140. Staszal, T, Zapala, B, Polus, A, Sadakierska-Chudy, A, et al., *Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology*. Pol Arch Med Wewn, 2011. **121**(10): p. 361-6.
141. Stein, C A, Hansen, J B, Lai, J, Wu, S, et al., *Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents*. Nucleic Acids Res, 2009. **38**(1): p. e3.
142. Suarez, Y, Fernandez-Hernando, C, Pober, J S, and Sessa, W C, *Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells*. Circ Res, 2007. **100**(8): p. 1164-73.
143. Sugden, P H, *Signaling in myocardial hypertrophy: life after calcineurin?* Circ Res, 1999. **84**(6): p. 633-46.
144. Swayze, E E, Siwkowski, A M, Wancewicz, E V, Migawa, M T, et al., *Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(2): p. 687-700.

145. Takemura, G, Nakagawa, M, Kanamori, H, Minatoguchi, S, et al., *Benefits of reperfusion beyond infarct size limitation*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 269-76.
146. Thum, T, *MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine*. EMBO Mol Med, 2011. **4**(1): p. 3-14.
147. Tijssen, A J, Creemers, E E, Moerland, P D, de Windt, L J, et al., *MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1035-9.
148. Urbich, C, Dernbach, E, Reissner, A, Vasa, M, et al., *Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(1): p. 69-75.
149. Vachenauer, R, *Reduktion des Reperfusionsschadens am Schweineherz durch retrograde koronar-venöse Transfektion mit VEGF in Medizinische Klinik und Poliklinik I - Grosshadern*2009, Ludwig-Maximilians-Universität: München.
150. van Rooij, E, Sutherland, L B, Liu, N, Williams, A H, et al., *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18255-60.
151. van Rooij, E, *The art of microRNA research*. Circ Res, 2011. **108**(2): p. 219-34.
152. van Rooij, E, *Introduction to the series on microRNAs in the cardiovascular system*. Circ Res, 2012. **110**(3): p. 481-2.
153. van Rooij, E and Olson, E N, *MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(11): p. 860-72.
154. Vilahur, G, Cubedo, J, Casani, L, Padro, T, et al., *Reperfusion-triggered stress protein response in the myocardium is blocked by post-conditioning. Systems biology pathway analysis highlights the key role of the canonical aryl-hydrocarbon receptor pathway*. Eur Heart J, 2012.
155. Visser, M E, Witztum, J L, Stroes, E S, and Kastelein, J J, *Antisense oligonucleotides for the treatment of dyslipidaemia*. Eur Heart J, 2012. **33**(12): p. 1451-8.
156. von Degenfeld, G, Giehl, W, and Boekstegers, P, *Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion*. Cardiovasc Res, 1997. **35**(2): p. 233-40.
157. Wahlquist, C, Jeong, D, Rojas-Munoz, A, Kho, C, et al., *Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 531-5.
158. Weis, S M and Cheresh, D A, *alphaV integrins in angiogenesis and cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006478.

159. Whelan, R S, Kaplinskiy, V, and Kitsis, R N, *Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 19-44.
160. White, H D, Norris, R M, Brown, M A, Brandt, P W, et al., *Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction*. Circulation, 1987. **76**(1): p. 44-51.
161. Wightman, B, Ha, I, and Ruvkun, G, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans**. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
162. Wu, W, Xiao, H, Laguna-Fernandez, A, Villarreal, G, Jr., et al., *Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a*. Circulation, 2011. **124**(5): p. 633-41.
163. Yellon, D M and Hausenloy, D J, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
164. Yoshizawa, S, Ohyashiki, J H, Ohyashiki, M, Umezu, T, et al., *Downregulated plasma miR-92a levels have clinical impact on multiple myeloma and related disorders*. Blood Cancer J, 2012. **2**(1): p. e53.
165. Zeitels, L R and Mendell, J T, *When 19 is greater than 92*. Elife, 2013. **2**: p. e01514.
166. Zhang, B, Zhou, M, Li, C, Zhou, J, et al., *MicroRNA-92a inhibition attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by targeting Smad7*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e100298.
167. Zhang, H, Zuo, Z, Lu, X, Wang, L, et al., *MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer*. Oncol Rep, 2012. **27**(2): p. 594-8.
168. Zhang, Y, Qu, Z, Kim, S, Shi, V, et al., *Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection*. Gene Ther, 2010. **18**(4): p. 326-33.
169. Zhao, H, Wang, Y, Yang, L, Jiang, R, et al., *miR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RECK*. Mol Cell Biochem, 2013.
170. Zhao, Z Q and Vinten-Johansen, J, *Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 438-55.
171. Zhao, Z Q, Corvera, J S, Halkos, M E, Kerendi, F, et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **285**(2): p. H579-88.
172. Zhu, S, Cao, L, Zhu, J, Kong, L, et al., *Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects*. Clin Chim Acta, 2013. **424**: p. 66-72.

173. Zweier, J L and Talukder, M A, *The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 181-90.

8 Danksagung

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.

Johann Wolfgang von Goethe

Angelehnt an diesen Aphorismus möchte ich mich dennoch mit einigen Worten der von mir empfundenen Dankbarkeit annähern.

Zuvörderst gilt Prof. Dr. med. Christian Kupatt mein Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die mit ihr verbundene Einführung in die wissenschaftliche Denk- und Arbeitsweise sowie alle mit ihr verbundenen Erfahrungen, die ich im Laufe meiner Zeit als Doktorandin machen durfte.

Frau Dr. med. vet. Rabea Hinkel danke ich für die sehr gute Betreuung, Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung bei meiner Arbeit, insbesondere Cuong Kieu und Elisabeth Raatz für ihre kompetente Hilfe und Assistenz im Labor danken.

Mein Dank gilt außerdem den Organisatoren des FöFoLe-Programms und Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Möglichkeiten, einerseits meine Doktorarbeit in diesem besonderen Rahmen erstellen und andererseits alle Tierversuche in den Räumlichkeiten des Walter-Brendel-Zentrums durchführen zu können.

Am wichtigsten ist mir schließlich der Dank, den ich meinen Eltern für ihre über das gewöhnliche Maß hinausgehende, unermüdliche Unterstützung und Toleranz aussprechen möchte.

Vi er alle oppdagelsesreisende i livet, hvilken vei vi så enn følger.

Fridtjof Nansen

Eidesstattliche Versicherung

Zühlke, Stephanie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Kardioprotektives Potential der LNA-vermittelten microRNA-92a-Suppression im präklinischen Ischämie-/Reperusionsmodell

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, 1.6.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand