

# Fast revascularization of the injured area is essential to support zebrafish heart regeneration

Rubén Marín-Juez<sup>a,1</sup>, Michele Marass<sup>a</sup>, Sebastien Gauthier<sup>a</sup>, Andrea Rossi<sup>a</sup>, Shih-Lei Lai<sup>a</sup>, Stefan C. Materna<sup>b</sup>, Brian L. Black<sup>b,c</sup>, and Didier Y. R. Stainier<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Department of Developmental Genetics, Max Planck Institute for Heart and Lung Research, 61231 Bad Nauheim, Germany; <sup>b</sup>Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco, CA 94143-3120; and <sup>c</sup>Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143

Edited by Margaret Buckingham, Pasteur Institute, Paris, France, and approved August 9, 2016 (received for review April 4, 2016)

[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1605431113](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1605431113)



# Themen

- Einführung
- Kardiomyopathien
- VEGFA als Revaskularisierung Regulierer
- Zielsetzung der Studie
- Ergebnisse
- Schlussfolgerung



# Einführung

- Zebrafisch hat ein beachtliches Potential zur Herzregeneration
- Komplexe Prozessreihe sind für die Cardiomyozyten (CM) Proliferation erforderlich
- Bis jetzt ist das Wissen über die Revaskularisierung Mechanismen im verletzten Bereich vom Herzen unklar

# Einführung

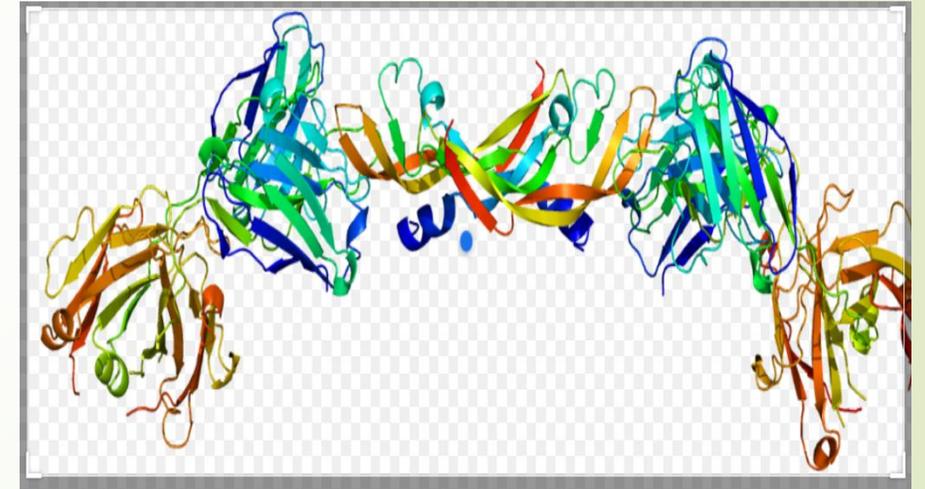
## Kardiomyopathien

- Kardiomyopathien sind Herzstörungen, welche besonders in Industrieländern zur Krankheitsanfälligkeit und Mortalität führen
- Eine Person von fünf daran leiden
- Steigerung der Krankenhausaufenthaltsrate > 20%
- Heilung ist verbunden mit einer fibrotischen Vernarbung → beeinträchtigt die Zusammenziehung und den Gewebeaufbau vom Herzen

# Einführung

## VEGFA (Vaskulär Endothelial Wachstumsfaktor A) als Revaskularisierung Regulierer

- Vegfa ist ein wichtiger Regulierer Faktor bei der Vaskulogenese und Revaskularisierung
- Verringerung der VEGFA durch die krankhafte Hypertrophie und Fortgeschrittene Phasen von Herzstörung





# Einführung

## Zielsetzung der Studie

Neue Studien zeigen, im Gegensatz zum langjährigen Dogma, das Herz von Säugetieren in der Lage ist, sich wieder zu erneuern

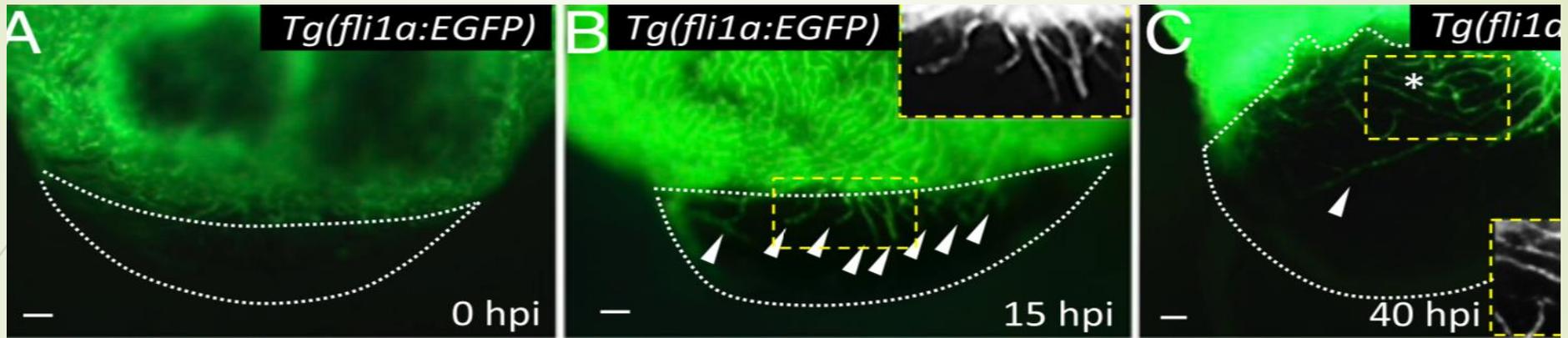
Auf welcher Art und Weise führt die Revaskularisierung und Regeneration von Herzen bei den Wirbeltieren durch, ist bis jetzt unklar

Die Kenntnisse über den Herz Heilungsprozess ist ein wesentlicher Faktor bei der Entwicklung neuer Therapien



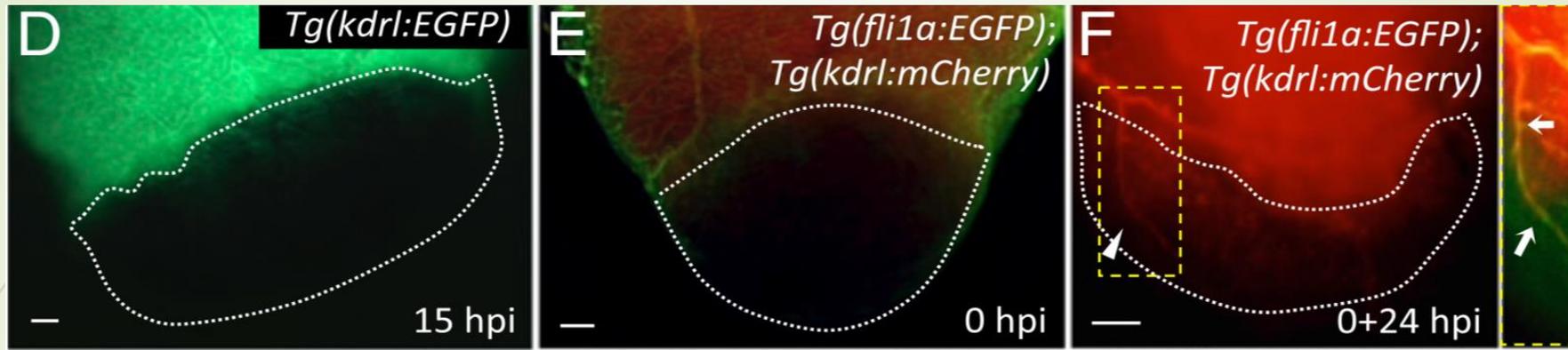
## **Ergebnisse 1**

**Koronargefäße dringen frühzeitig im verletzten Bereich ein**

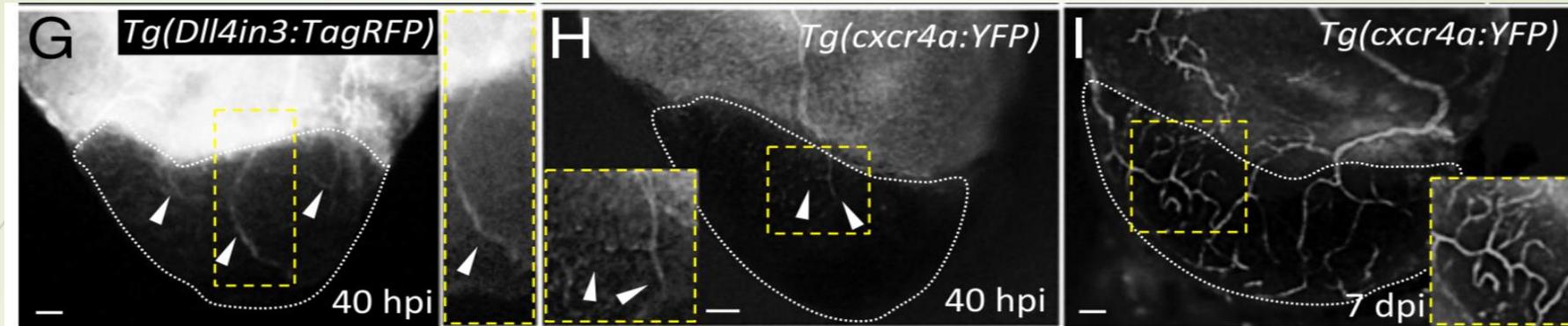


- Das Herz von adulten Fischen wurde durch Kryotechnik tiefgefroren
- 15 St. n. Verl.—> erste Gefäßsprosse
- 40 St. n. Verl.—> Gefäßgeflecht

➤ *Tg(fli1:EGFP)*: zeigt alle Blutgefäße in grün



- Bis 15 St. n. Verl. —> keine arterielle Gefäße
- Erst 24 St. n. Verl. —> Erste arterielle Gefäße
  
- *Tg(fli1:EGFP)* und *Tg(kdrl:EGFP)*: zeigen alle Blutgefäße in grün
- *Tg(kdrl:mCherry)*: zeigt nur arterielle Gefäße in rot



- Zur Bestätigung der Befunden wurde gleicher Versuch auf andere Zebrafisch Linien durchgeführt
- Ähnliche Ergebnisse:
  1. Erste arterielle Gefäße → 40 St. n. verl.
  2. Gut entwickeltes Koronargeflecht → 7 T. n. Verl.

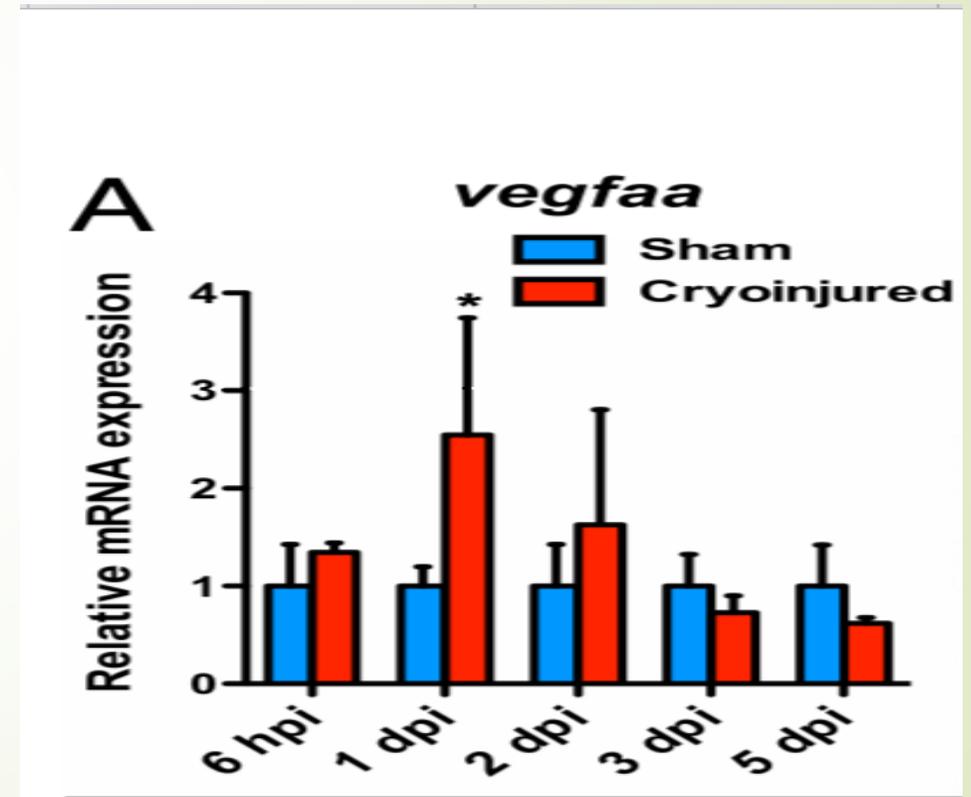


## **Ergebnisse 2**

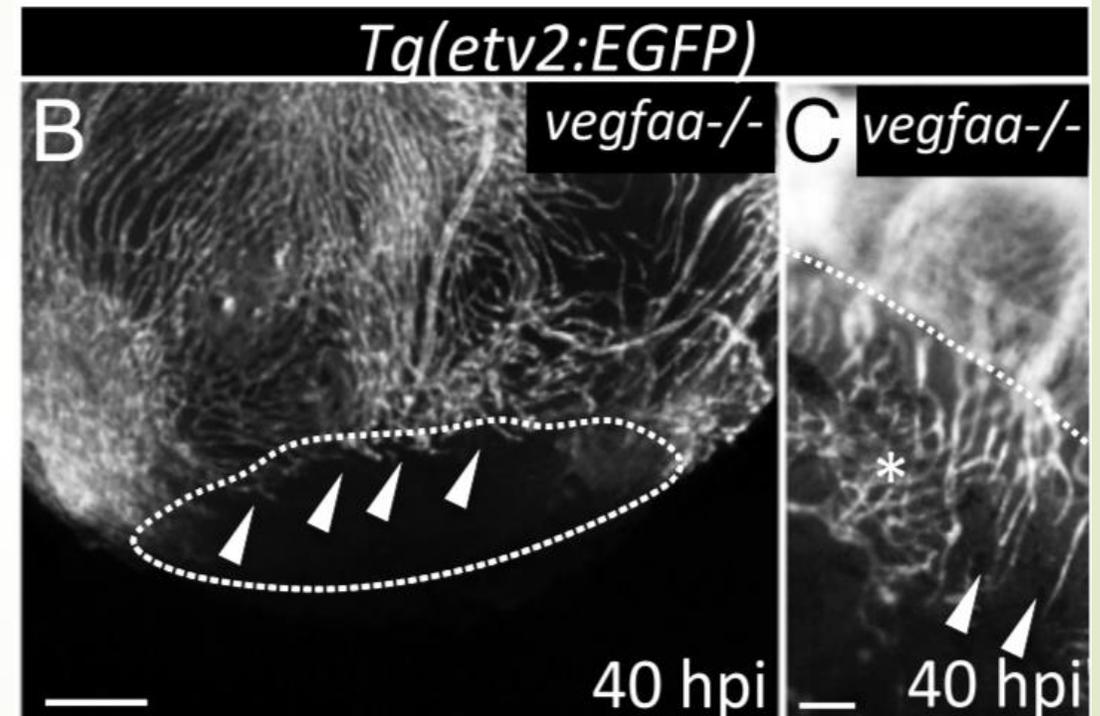
# **Koronargefäßentwicklung und Herzregeneration bei vegfaa Mutanten**

Um die grundlegende Mechanismen bei der schnellen Revaskularisierung besser zu erkennen, wurde die Expression von vegfaa und vegfab durch (qPCR) untersucht

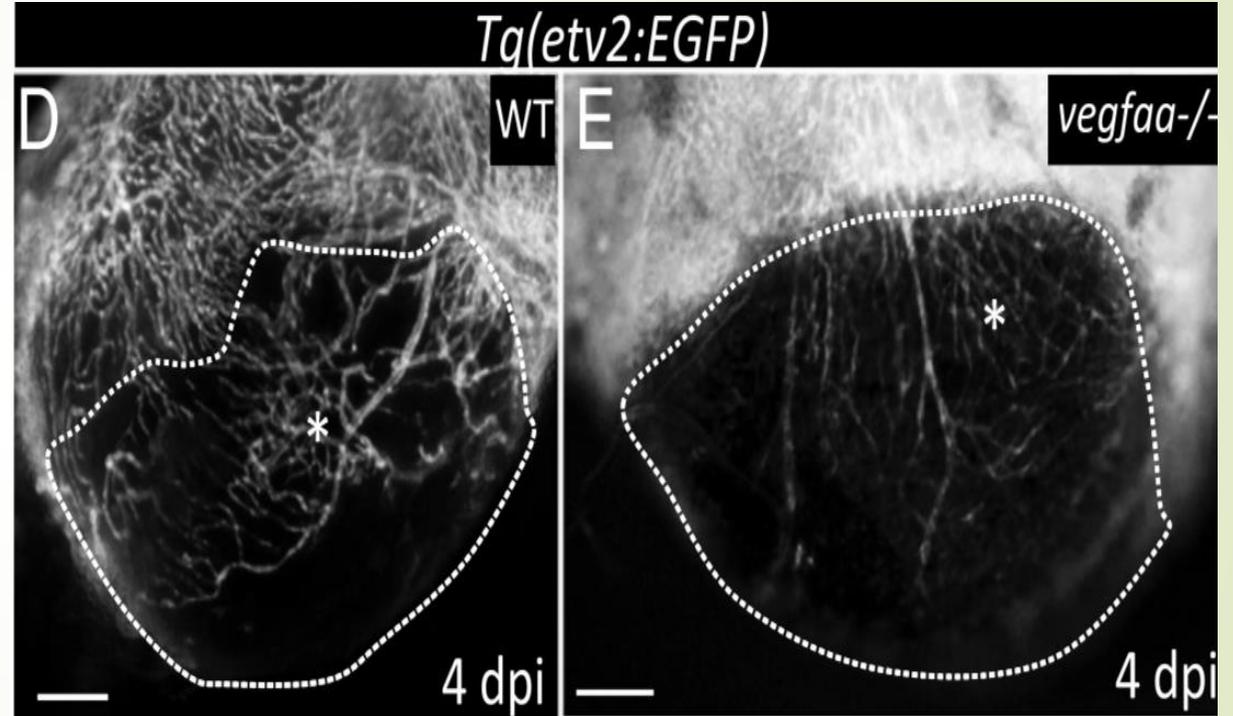
- Signifikante Erhöhung von Vegfaa
- Vegfab unverändert

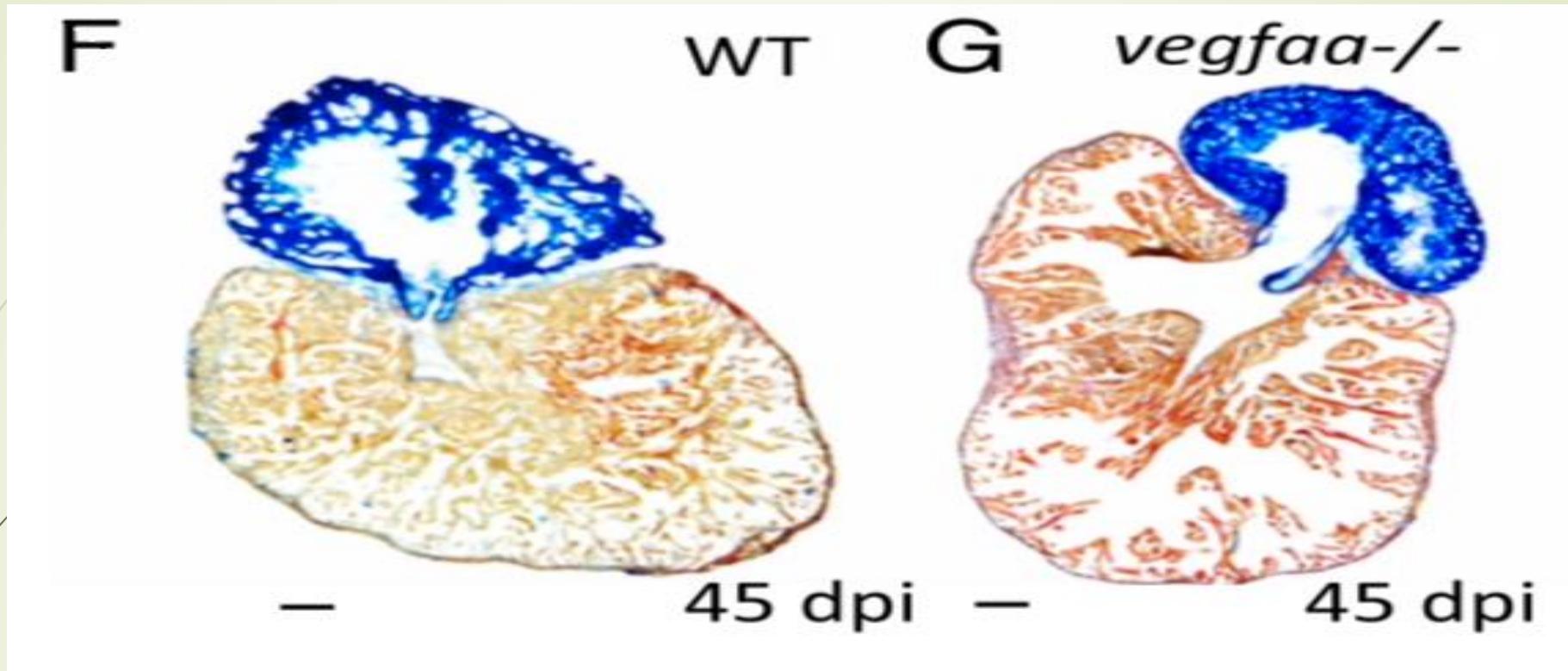


- Vegfaa Mutanten ( $Vegfaa^{-/-}$ ) —> zur Erkennung der Rolle von vegfaa bei Herzregeneration
- Herzverletzung durch Kryotechnik
- 40 St. n. Verl. —> verzögerte Revaskularisierung und ungeordnetes Gefäßgeflecht



- Kompensatorische Mechanismen
- 4 T. n. Verl. —> Expandiertes Gefäßgeflecht



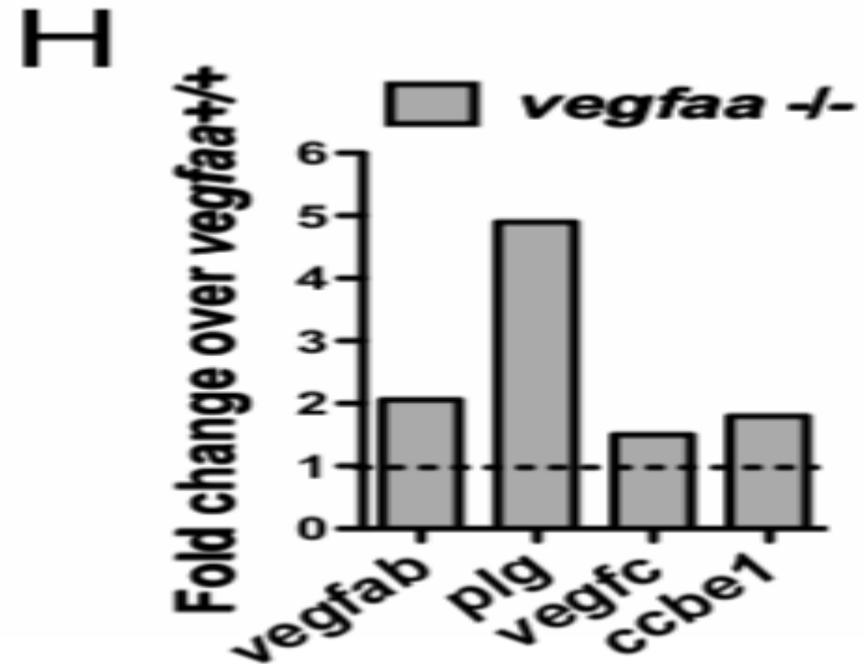


- 45 T. n. Verl. —> Narbengewebe verschwunden und durch neuen Muskeln ersetzt

Um diese kompensatorische Mechanismen in Abwesenheit von vegfaa zu erkennen, wurde transkriptomische Analyse durchgeführt

Hochregulierung von:

- vegfab
- Vegfac
- plasminogen (plg)
- Collagen und calcium binding EGF domains 1 (ccbe1)





## **Ergebnisse 3**

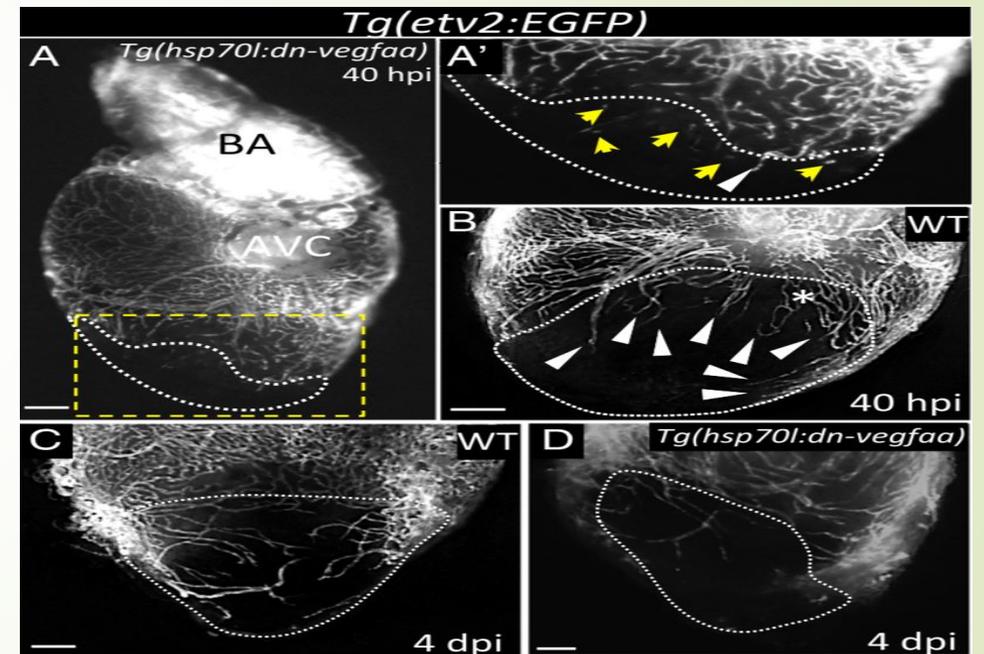
**Revaskularisierung Blockade durch Induzierung dominant negativ vegfaa (dn-vegfaa) Expression**

Zum Verstehen Revaskularisierung Blockierungsmechanismen wurde dominant negativ vegfaa (dn-vegfaa) Expression Induziert

- Zuerst Kryotechnik
- ab 24 St. n. Verl. tägl. Hitzeschocks zur Induzierung (dn-vegfaa) Expression

40 St. N. Verl.:

- (dn-vegfaa) Zebrafisch: Revaskularisierung wesentlich blockiert und Gefäße waren getrennt voneinander, bis 4 T. n. Verl. unverändert
- WT: gut entwickeltes Gefäßgeflecht und große Gefäße ansehbar

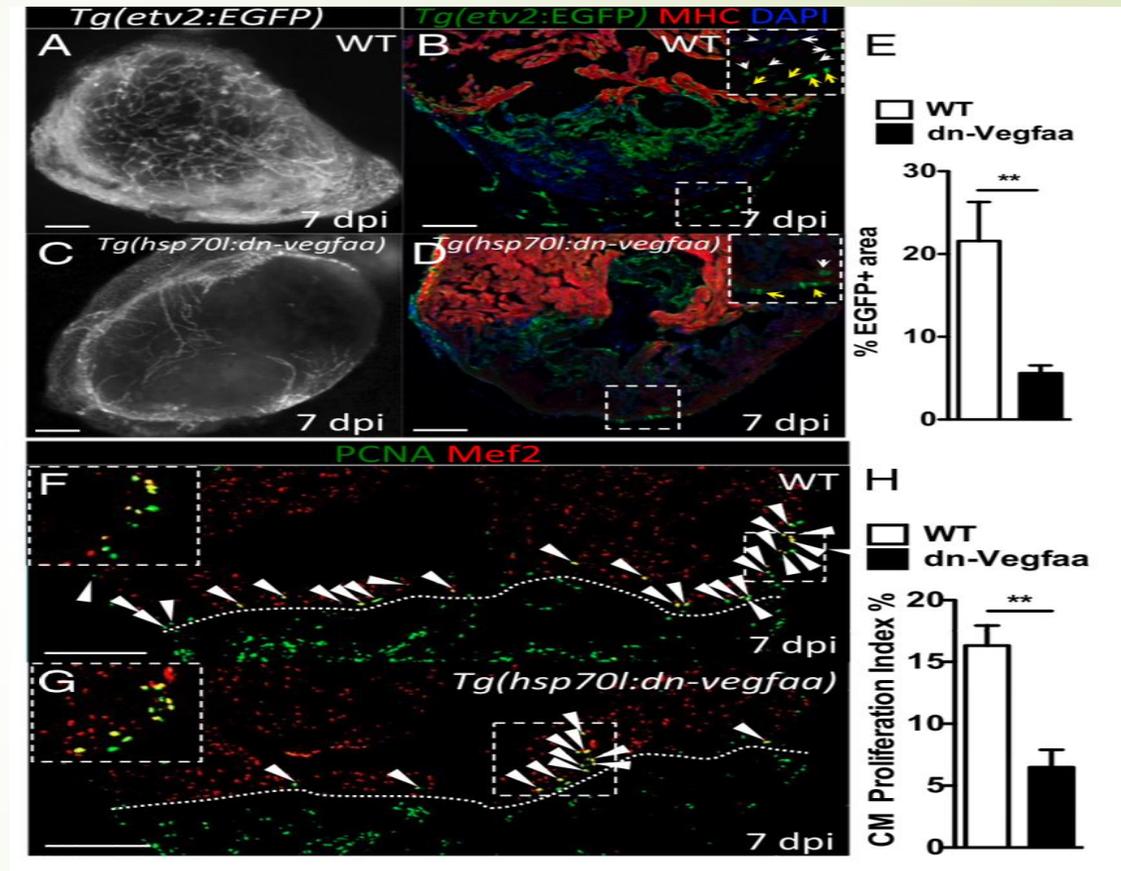




## **Ergebnisse 4**

**Einfluss von Revaskularisierung Blockade auf  
Cardiomyozyten (CM) Proliferation**

- (dn-vegfaa) Zebrafische zeigten im Vergleich zu WT, eine bedeutende Reduzierung bei der Revaskularisierung (75% geringer) Cardiomyozyten (CM) Proliferation (6,48% vs. 16,32%)





## Ergebnisse 5

**Negative Auswirkungen von Frühzeitiger  
Revaskularisierung Blockade auf  
Gefäßentwicklung und Herzregeneration**



➤ Zum Schluss wurde die Frage gestellt, ob Revaskularisierung im Herzen zeitlich begrenzt ist oder nicht!

Um diese Frage beantworten zu können, wurde nach Verletzung der Fische Hitzeschock Regimen verwendet und Ventrikel 21, 45, 75 und 150 T. n. Verl. untersucht

21 T. n. Verl.:

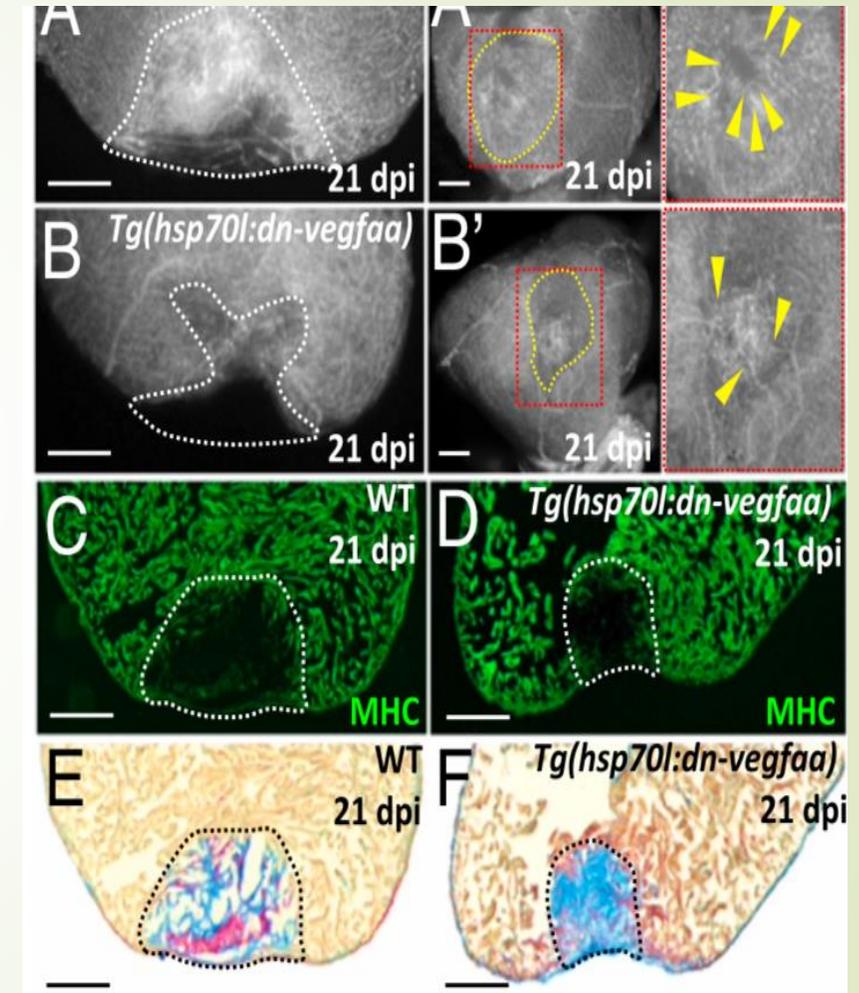
- (dn-vegfaa) Zebrafisch: mangelhafte Revaskularisierung mit signifikant geringer Anzahl von Gefäße

Keinen offenbaren Unterschied in Muskelersatz, aber!

—> Muskelaufbau unterschiedlich

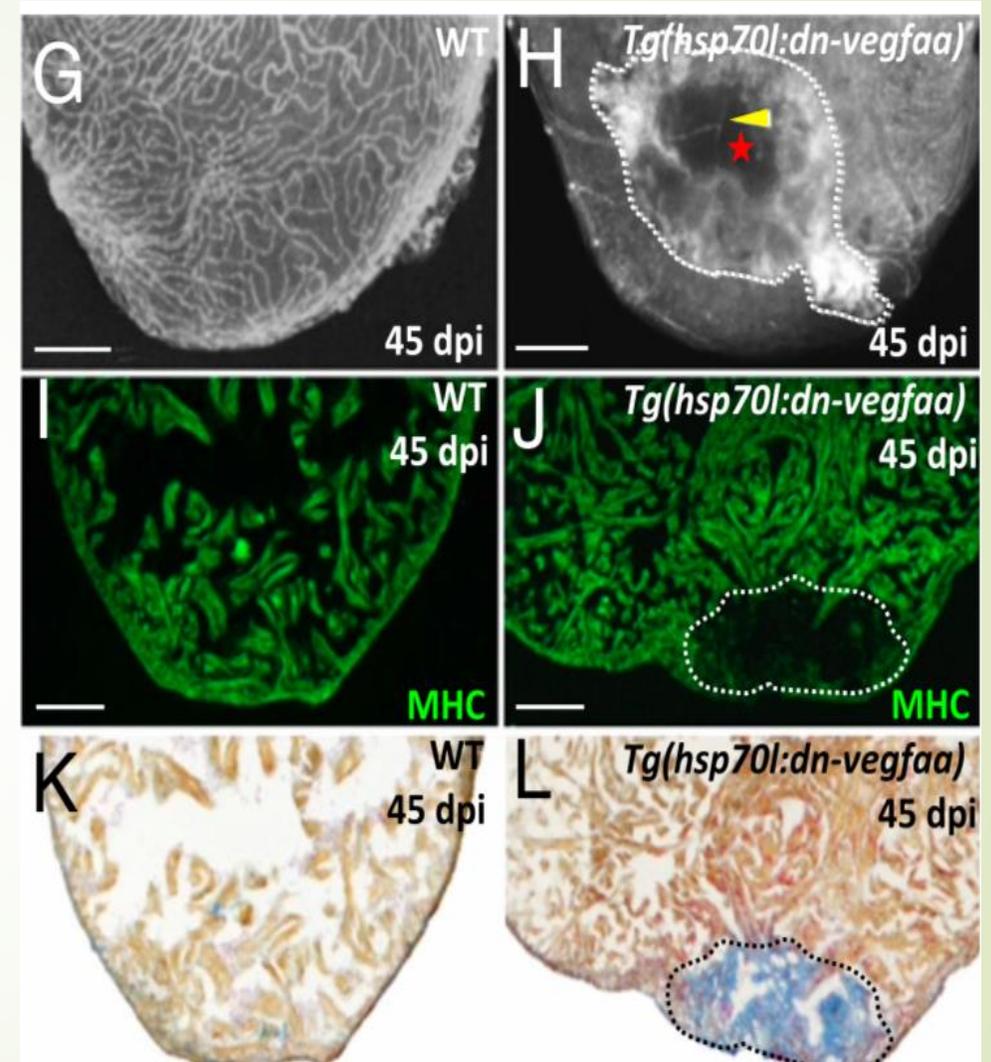
- WT: Fibrin in großen Mengen statt Kollegen ersetzt
- (dn-vegfaa) Zebrafisch: das verletzte Gewebe großteils mit Kollegen gefüllt, fibrotische Vernarbung

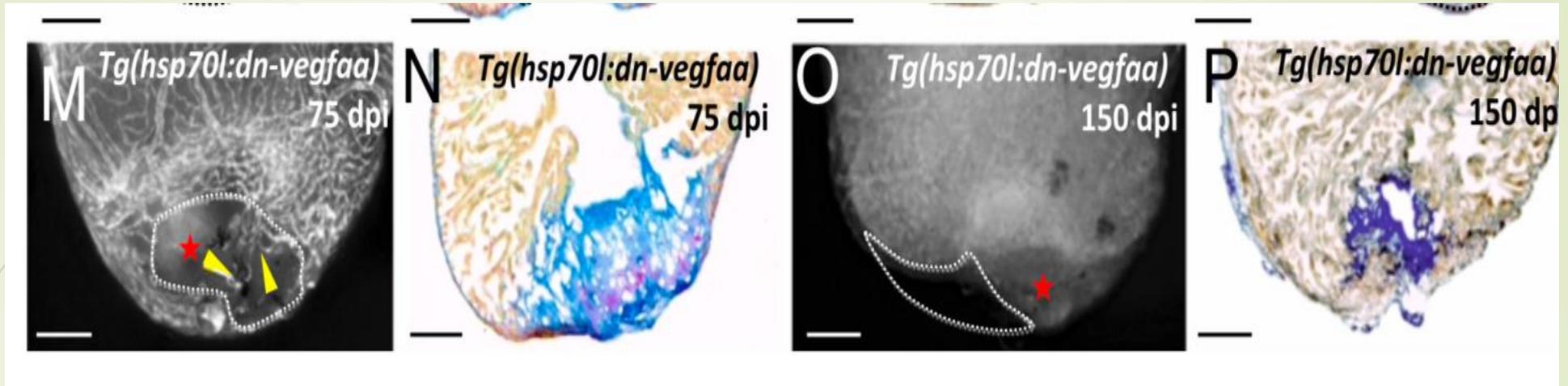
- Anti-MHC antibodies (grün)—> Cardiomyozyten
- Acid fuchsin orange G/AFOG (blau) —> Kollagen
- Acid fuchsin orange G/AFOG (rot)—> Fibrin



45 T. nach Verl.:

- WT: Ventrikel mit Koronarnetz und neuen Muskel statt Narbe
- (dn-vegfaa) Zebrafisch: Ventrikel nicht regeneriert und nur einige Gefäße im verletzten Bereich,  
Keine Herzmuskel-Heilung,  
eine fibrotische Vernarbung, bestehend vor allem aus Kollegen





75 und 150 T. n. Verl.: Keine signifikante Veränderungen, d.h. (dn-vegfaa) Zebrafische zeigten eine immer noch fehlerhafte Revaskularisierung und eine große Vernarbung, bestehend wesentlich aus Kollegen

- 
- Insgesamt diese Daten zeigten, dass frühzeitige Revaskularisierung Blockade die Regenerationsfähigkeit von Zebrafisch-Herzen verhindert

# Schlussfolgerung

- In dieser Studie wurde gezeigt, dass Revaskularisierung bei den Zebrafischen sehr früh nach Herzverletzung beginnt
- Mit Ausnutzung (dn-vegfaa) Zebrafische, welche Revaskularisierung Blockade ausüben, wurde gut erklärt, wie frühzeitige Blockierung von Gefäße zu sprossen, auf Herzregeneration negativ beeinflussen kann!
- Die Ergebnisse haben darauf hingewiesen:
  - der Revaskularisierungsprozess zeitlich begrenzt ist
  - frühzeitige Revaskularisierung Blockade in den ersten Stunden n. Verl. Verhindert, Revaskularisierung optimal zu beenden und am Ende der Heilung eine fibrotische Vernarbung bleibt
  - daher können wir es interpretieren;  
„rechtzeitige Revaskularisierung für eine effiziente Herzheilung von großer Bedeutung ist“



**Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!**