

Projektfortschrittsbericht – Österreichischer Herzfonds

November 2020

Projektstitel: *Exosomal small non-coding RNA as a predictor of treatment outcome of allogeneic adipose-derived Stem Cell therapy in IschEmic non-treatable Cardiac disease and heart failure*

Projektleitung: Dr. med. univ. Denise Traxler-Weidenauer
Prof. Dr. Mariann Pavone-Gyöngyösi (Stv.)

Klinische Abteilung für Kardiologie
Universitätsklinik für Innere Medizin II
Medizinische Universität Wien

Projektfortschrittsbericht

Mit steigenden Überlebenschancen nach einem Myokardinfarkt ist folglich auch die Anzahl der Patientinnen und Patienten, welche an einer ischämischen Kardiomyopathie leiden gestiegen. Diese Patientinnen und Patienten weisen teils eine erhebliche Symptomatik mit großem Leidensdruck auf. Jedoch spricht ein Teil dieser Patientinnen und Patienten nicht auf etablierte Therapiekonzepte an. Die kardiale Regenerationstherapie mit Stammzellen stellt eine mögliche Therapieform für dieses PatientenInnenkollektiv dar.

In der SCIENCE Studie (Stem Cell therapy in IschEmic non-treatable Cardiac disease and heart failure; EU, Horizon 2020) wird die Therapie mit intramyokardial applizierten allogenen Stammzellen aus dem Fettgewebe bei Patientinnen und Patienten, welche an ischämischer Kardiomyopathie leiden und trotz optimaler Therapie laut aktuellen Leitlinien weiterhin Beschwerden haben, geprüft. Vorstudien zeigen, dass ein Teil der Zellen in den systemischen Kreislauf gelangt und dort Effekte auslöst, die für ein etwaiges Therapiemonitoring genutzt werden könnten. Weiters spricht ein Teil der Patientinnen und Patienten nicht auf die Therapie an, bisher existieren jedoch keine Parameter, welche das Ansprechen prognostizieren können und somit eine gezieltere Auswahl von Patientinnen und Patienten, welche von dieser Therapieoption profitieren, ermöglichen.

Das Ziel des Projektes ist mittels small non coding RNAs aus Plasmaexosomen ein mögliches Therapieansprechen von intramyokardial applizierten allogenen Stammzellen aus dem Fettgewebe (ASCs) bei ischämischen Kardiomyopathie PatientInnen und Patienten zu erforschen (SCIENCE Studie).

Der Rekrutierungszeitraum wurde aufgrund der schwierigen Rekrutierung der geplanten Patientenzahl seitens des Sponsors auf Juni 2019 verlängert. In Österreich wurden insgesamt 15 Patienten in die klinische Studie eingeschlossen. Mit Juni 2020 wurde trotz der deutlichen Reduktion des klinischen als auch Studienbetriebes aufgrund von Covid-19 das 12 Monats Follow up von 14 Patienten erreicht (ein Patient konnte aufgrund seines kritischen Zustandes nicht persönlich zum Termin erscheinen). Da in einem weiteren internationalen

Zentrum Patientinnen und Patienten bis Ende 2019 Patienten eingeschlossen wurden, kann eine Entblindung zum momentanen Zeitpunkt noch nicht erfolgen weshalb eine Verzögerung zu erwarten ist.

Bis dato wurden von allen eingeschlossenen Patienten bis zum letzten Follow up Zeitpunkt Blutproben gesammelt und für die finale Exosomenisolierung aufbereitet. Da das Feld der Exosomenforschung sich momentan mit rasantem Tempo weiterentwickelt wurde die Entscheidung zur Abkehr der initial geplanten Isolation mittels Ultrazentrifugation zu Gunsten des überlegenen „ExoQuick ULTRA EV Isolation Kit for Serum and Plasma“ getroffen. Unserer Analysen demonstrierten, dass selbst aus einer geringeren Plasmamenge ein höherer Ertrag an verwertbaren Exosomen sowie auch eine höhere Reinheit (ermittelt mittels Nanoparticle Tracking, Coomassie Assay und Western Blot – CD63, CD81, CD9, Albumin, Calnexin, ApoA1, Argo2) im Vergleich zur Ultrazentrifugation erzielt werden kann. Hierbei wurden verschiedenen Protokolle der Ultrazentrifugation (unterschiedliche Zentrifugationszeiten und Menge an Plasma aus welchem isoliert wurde) mit dem oben genannten Kit verglichen. Im Vorfeld wurde wie im letzten Bericht vermerkt auch das Protokoll für Proteinmessungen und Western Blots mit exosomal und nicht exosomal Markern für geringe Proteinmengen optimiert.

Somit konnten wir Exosomen aus 119 Proben von 15 Patienten zu 8 Zeitpunkten (bei einem Patienten wurde wie oben beschrieben Blut nur an 7 Zeitpunkten gewonnen) isolieren. Die Partikelgröße, -menge, und -konzentration wurde schließlich mittels Nanopartikel Tracking an der Core Facility Flow Cytometry bestimmt. Die Proteinmessung der Proben erfolgte mittels Coomassie Assay.

Weiters verglichen wir auch noch ein weiteres RNA Isolierungskit mit dem in unserer Arbeitsgruppe bisher verwendenden Kit. In den Messungen mittels Nanodrop als auch Agilent Bioanalyser zeigte sich dieses jedoch nicht überlegen. In den nächsten Wochen soll nun die Isolierung der RNA aus den gewonnen Proben sowie anschließende RNA Analyse erfolgen. Als letzter Schritt werden die Daten nach Entblindung statistisch ausgewertet. Es soll geprüft werden, ob die Menge, Größe oder Konzentration an Exosomen beziehungsweise deren Inhalt ein Therapieansprechen (Echokardiographie, MRI, 6 Minuten Gehstest, Lebensqualität, NT-proBNP) prognostizieren kann. Weiters wird der Verlauf der soeben genannten Parameter im Follow up Zeitraum evaluiert. Die Fertigstellung des Manuskripts und dessen Veröffentlichung ist für 2021 geplant.