

Viraler Gentransfer des ischämischen Myokards unter Verwendung magnetischer Nanopartikel

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (PhD)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Miriam Schiffer

aus Aachen

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Wilhelm Röll
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wilhelm Bloch

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.06.2023

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. F. Bakhtiary

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Der Myokardinfarkt (MI)	8
1.2	Komplikationen Nach MI	10
1.3	Erregungsbildung im Herzen und ventrikuläre Tachykardien (VTs)	11
1.4	Wundheilung und kardiales Remodeling	16
1.5	Experimentelle Infarktmodelle in der kardiovaskulären Forschung	18
1.6	Das Transmembranprotein Connexin 43	20
1.7	Virale Gentherapie	22
1.8	Anti-VT Therapie mittels Gentransfer	24
1.9	Kardiale Fibroblasten	25
1.10	Magnetische Nanopartikel	27
1.11	Zielsetzung	29
2	Verwendete Materialien	32
2.1	Chemikalien und gekaufte Lösungen	32
2.2	Verbrauchsmaterialien	35
2.3	Geräte	37
2.4	Software	39
2.5	Puffer und Lösungen	40
2.6	Kits	44
2.7	Zelllinien	44
2.8	Zellkulturmedium und Zusätze	45
2.9	Zusammensetzung des Zellkulturmediums	45
2.10	Versuchstiere	45
2.11	Retrovirale Vektoren	46
2.11.1	Lentivirale Vektoren	46
2.11.2	Muriner Moloney Leukämie Virus (MMLV)	46
2.12	Magnetische Nanopartikel (MNP)	47
2.13	Verwendete Magnete	49
2.14	Verwendete Primer	50
2.15	Verwendete TaqMan™ Sonden	51
2.16	Antikörper	51

2.16.1	Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen	51
2.16.2	Primäre Antikörper zur Western Blot Detektion	52
2.16.3	Sekundäre Antikörper	53
3	Methoden	54
3.1	Zellbiologische Methoden	54
3.1.1	Auftauen von Zellen	54
3.1.2	Passagieren von Zellen	54
3.1.3	Einfrieren von Zellen	54
3.1.4	Gewinnung und Kultivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (eCF)	55
3.1.5	MNP-Beladung der eCF für die Transplantationsversuche	57
3.1.6	Bestimmung der Magnetisierungseffizienz verschiedener MNPs	57
3.1.7	Transduktion der Zellen mit Virus/MNP Komplexen	57
3.1.7.1	Globale Transduktion von kardialen Fibroblasten mit Virus/MNP Komplexen	57
3.1.7.2	Lokale Transduktion von kardialen Fibroblasten mit Virus/MNP Komplexen	58
3.1.8	Bestimmung der Funktionalität von Gap junctions	59
3.1.9	Vorbereitung der Primärzellen (eCF) für die intramyokardiale Injektion	60
3.2	Operative Techniken	61
3.2.1	Kryoläsion als myokardiales Infarktmodell	61
3.2.2	Intramyokardiale Injektion mit und ohne Magnetapplikation	63
3.2.3	Analyse der Herzfunktion	64
3.2.4	Echokardiographische Untersuchung	65
3.2.5	Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)	66
3.2.6	Herzentnahme und Aufbereitung der Proben	71
3.3	Molekularbiologische Methoden	71
3.3.1	RNA Isolation von Zellen	71
3.3.2	RNA Isolation von Gewebe	72
3.3.3	Qualitätsbestimmung der RNA für die RNA Sequenzierung (RNA-Seq)	72
3.3.4	Library Generierung und RNA Seq Analyse	72
3.3.5	Reverse Transkription	73
3.3.6	TaqMan™ qPCR	73
3.3.7	PCR	75

3.3.8	Gelelektrophorese	75
3.4	Biochemische Methoden	76
3.4.1	Proteinisolation von Zellen	76
3.4.2	Proteinisolation von Herzen	76
3.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	76
3.4.4	Western Blotting	77
3.4.4.1	SDS Page	77
3.4.4.2	Tank blot	77
3.4.4.3	Immundetektion	78
3.5	Immunhistochemische und histologische Methoden	79
3.5.1	Fixierung von Zellen	79
3.5.2	Fixierung von Gewebe	79
3.5.3	Kryokonservierung von Gewebe	79
3.5.4	Anfertigung von Kryoschnitten	79
3.5.5	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Gewebe	80
3.5.6	Sirius-red/Fast-green Färbung	81
3.5.7	Zell-Quantifizierung	81
3.5.8	Infarktgrößenbestimmung	82
3.5.8.1	Flächenbestimmung	82
3.5.8.2	Volumenbestimmung	82
3.5.9	Preußisch-Blau Färbung	82
3.6	Mikroskopie	83
3.7	Statistik	83
3.8	Kooperationen	85
4	Ergebnisse	86
4.1	Transplantation von primären embryonalen kardialen Fibroblasten	86
4.1.1	Charakterisierung der eCF <i>in vitro</i>	87
4.1.2	Auswirkungen der Zelltransplantation auf die kardiale Funktion innerhalb der ersten zwei postoperativen Wochen	96
4.1.3	Auswirkung der Zelltransplantation auf die kardiale Funktion im Langzeitverlauf	100
4.1.4	Morphologische Analyse der eingewachsenen Zellen, sowie der Cx43 Expression auf Zell-Protein- und Genexpressionsebene	106
4.1.5	Immunhistochemische Charakterisierung des Infarktareals im Bereich der integrierten transduzierten eCF und Verbleib der Nanopartikel	112

4.1.6	Infarktgrößenbestimmung	117
4.1.7	Analyse des Magneteffektes	119
4.2	Transduktionseffizienz des murinen moloney Leukämievirus (MMLV) in Abhängigkeit von der Viruskonzentration und Verwendung des MNP/Magnet Systems in Fibroblasten	123
4.2.1	<i>In vitro</i> Analyse des MMLV an 3T3 Fibroblasten	123
4.2.2	<i>In vitro</i> Testung der neu generierten MMLV Konstrukte unter besonderer Berücksichtigung der Cx43 Expression	126
4.2.3	<i>In vitro</i> Transduktion von primären kardialen Fibroblasten mit MMLV/SoMag5	130
4.2.4	Analyse der Funktionalität mittels des MMLV-Cx43 generierten Gap junctions	134
5	Diskussion	138
5.1	Transplantation von Cx43 überexprimierenden kardialen Fibroblasten in die Infarktnarbe	138
5.2	Cx43 als therapeutisches Target für eine (Myo-) Fibroblasten vermittelte anti-VT Therapie	147
5.3	Optimierung der Transduktionseffizienz kardialer Fibroblasten	148
5.3.1	MMLV in der Gentherapie	149
5.4	Verwendung magnetischer Nanopartikel in Gen- bzw. Zellersatztherapien	151
5.5	Ausblick	152
6	Zusammenfassung	154
7	Abbildungsverzeichnis	156
8	Tabellenverzeichnis	160
9	Literaturverzeichnis	161
10	Anhang	176
10.1	Publikationsliste	176
10.2	Vorträge und Posterbeiträge auf Konferenzen	176
10.3	Danksagung	177

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno assoziierter Virus
AP	Aktionspotential
aSMA	α -Smooth muscle actin
AWT	Anterior wall thickening
BZ	Borderzone
CD45	Cluster of differentiation 45 (Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale)
cFB	Kardiale Fibroblasten
CM	Kardiomyozyten
cTn	Kardiales Troponin
CXCL	Chemokine
Cx43	Connexin 43
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eCF	Embryonale kardiale Fibroblasten
eCM	Embryonale Kardiomyozyten
ECM	Extrazelluläre Matrix
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ES	Embryonale Stammzellen
FB	Fibroblasten

FGF	Fibroblast growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
Frap	Fluorescence recovery after photobleaching
FS	Fractional shortening
Gj	Gap junction
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
ICD	Implantierbarer Kardioverter Defibrillator
IL	Interleukin
i.p.	Intra peritoneal
i.v.	Intra venös
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock out
LAD	Linke absteigende Koronararterie
LTR	Long terminal repeats
LV	Lentivirus
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVIDd	Left ventricular internal diameter end diastole
LVIDs	Left ventricular internal diameter end systole
LVSD	linksventrikuläre Dysfunktionen
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
mFB	Myofibroblasten
MI	Myokardinfarkt
miR	Micro RNA

MMLV	Muriner Leukämievirus (Moloney murine leukemia virus)
MMP	Metalloproteinasen
MNP	Magnetische Nanopartikel
MOI	Multiplizität der Infektion
MRTF	Myocardin-related transcription factor
NP	Nanopartikel
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
RNA Seq	RNA Sequenzierung
s.c.	Subcutan
SRF	Serum response factor
TGFb	Transforming growth factor beta
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteases
TNFa	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRCP	Transducin repeats-containing proteins
ü.N.	Über Nacht
VG	Virus Genom Kopien
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WB	Western blot
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt (MI)

Der plötzliche Herztod ist das abrupte Versagen des Herz-Kreislaufsystems mit natürlicher Todesfolge. Ein plötzlicher Herztod beginnt mit einer ventrikulären Tachykardie (VT), die je nach Alter des Patienten verschiedene Ursachen haben kann. Insbesondere bei älteren Patienten führen vorwiegend strukturelle Herzerkrankungen (z.B. koronare Herzkrankheit) zum plötzlichen Herztod. Bei jüngeren Patienten (< 40 Jahre) spielen vor allem Erkrankungen der kardialen Ionenkanäle und Myokarditiden eine tragende Rolle beim plötzlichen Herztod, da sie VTs triggern können (Eckardt 2017). Die wohl größte Ursache für VTs ist der Myokardinfarkt (MI). Er entsteht in den meisten Fällen als Komplikation der sog. koronaren Herzkrankheit (KHK) und weist in höheren Altersgruppen eine größere Sterblichkeit auf (Institut 2006). Die KHK, definitionsgemäß die Manifestation der Arteriosklerose im Bereich der Koronararterien, ist eine chronische Erkrankung der Koronararterien und ist durch eine Verengung oder den kompletten Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien charakterisiert. Dies hat eine verringerte Durchblutung des Herzmuskels zur Folge (Ischämie, siehe Abb. 1). Der MI ist ein akutes Ereignis, bei welchem durch Minderperfusion und dem dadurch bedingten Sauerstoffmangel (Ischämie) Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten, CM) absterben. Ein MI kann lebensbedrohlichen Folgen für die Patienten haben und stellt nach wie vor, mit 16 % aller Todesfälle, die häufigste Todesursache weltweit dar (Stand: Dezember 2020, ((WHO) 2020)). Demnach verzeichnet der MI ebenfalls den stärksten Anstieg der Todeszahlen aller Krankheiten von 2 Millionen (im Jahr 2000) bis zu 8,9 Millionen (im Jahr 2019) weltweit ((WHO) 2020)). Dies ist nicht zuletzt auf den demografischen Wandel der Gesellschaft, als auch auf die zunehmende Industrialisierung der Weltländer zurückzuführen.

Symptomatisch bedeutet ein MI, das Auftreten von belastungsbedingten Brustschmerzen (Angina pectoris, Engegefühl), Atemnot, Übelkeit und ein allgemeines Schwächegefühl bei den Patienten (Institut 2006, Kardiologie.org 2020). Infolgedessen wird eine Myokardschädigung mit vorausgehender Ischämie durch Veränderungen im EKG, Entstehung von pathologisch veränderten Q-Zacken, Wandbewegungsstörungen oder

Nachweis eines intrakoronaren Thrombus durch Koronarangiografie diagnostiziert (Kardiologie.org 2020). Inzwischen wurde eine gemeinsame Definition aus biochemischen und klinischen Merkmalen von der European Society of Cardiology (ESC) und dem American College of Cardiology (ACC) aufgestellt. Dementsprechend wird der MI als von Biomarkern nachgewiesene Myokardschädigung im Umfeld einer akuten Myokardischämie definiert (Cardiology 2018). Einer der wichtigsten Biomarker ist hierbei ein erhöhter kardialer Troponin (cTn) Wert. Kardiales Troponin ist ein bedeutender Bestandteil der kontraktile Einheit des Herzmuskels. Liegt eine Schädigung dessen vor, werden vermehrt Troponinpeptide ins Blut freigesetzt und ein erhöhter Serumspiegel kann im Blut des Patienten gemessen werden. Seit 2018 wird zwischen einer akuten Myokardschädigung (cTn-Dynamik vorhanden, Abfall oder Anstieg der cTn-Werte innerhalb weniger Stunden) und einer chronischen Myokardschädigung (über mehrere Messungen konstante cTn-Werte) unterschieden (Kardiologie.org 2020). Zudem weisen Parameter, wie verringertes Glykogen in den Zellen und Relaxation der Myofibrillen auf einen MI hin (Cardiology 2018). Bei Patienten wird mit erhöhten cTn- Werten zwischen den einzelnen MI-Subtypen unterschieden (Anderson and Morrow 2017). Pathologisch wird der MI als myokardialer Zelltod durch langanhaltende Ischämie definiert. So können bereits 10-15 min nach Ischämie erste ultrastrukturelle Veränderungen entdeckt werden: Verringertes Zellglykogen, Relaxation von Myofibrillen und Störung des Sarkolemms (Cardiology 2018). 4 bis 6 Stunden nach Ischämie zeigen sich auch erste mikroskopische Veränderungen, darunter die Nekrose der CM und die Hypereosinophilie des Myokardgewebes. Gut sichtbar ist ebenfalls die Hyperkontraktion der Sarkomere, sodass sog. „wavy fibers“ (gewellte Muskelfasern) entstehen. Bereits 6 Stunden nach Ischämie beginnt die Wundheilung durch Infiltration mit neutrophilen Granulozyten. Daraufhin wird ab dem 3. Tag nach Ischämie das vorübergehende Granulationsgewebe gebildet, Makrophagen zersetzen das nekrotische Gewebe und erstes kollagenhaltiges Narbengewebe wird durch Fibroblasten gebildet (Fishbein et al. 1978) (siehe Abschnitt 1.4). Durch das Absterben der CM nach MI kommt es zur gestörten Erregungsweiterleitung im Herzen, sodass eine inhomogene Reizweiterleitung in der Narbe entsteht. Dieses Reizleitungs-Defizit kann letztendlich zur Arrhythmie-Entstehung (Reentry-Mechanismus, siehe Abschnitt 1.3) führen. Das infarzierte Herz lässt sich klar in drei verschiedene Abschnitte abgrenzen: Das Remoteareal (gesundes Myokardgewebe),

die Infarktnarbe und die Borderzone (BZ) als sog. Übergangsregion zwischen Remote- und Infarktareal (Kung et al. 2018, Amoni et al. 2021). Die BZ besteht zum einen aus abgestorbenen CM und kollagenhaltigem Narbengewebe (inkl. Myofibroblasten (mFB)) und zum anderen aus überlebenden CM. Es wird deswegen angenommen, dass die BZ verantwortlich für die Entwicklung des sog. Reentry-Mechanismus und somit maßgeblich an der Entstehung von post-Infarkt Arrhythmien beteiligt ist. Der Mechanismus ist allerdings bis heute noch nicht vollständig geklärt (Mendonca Costa et al. 2018).

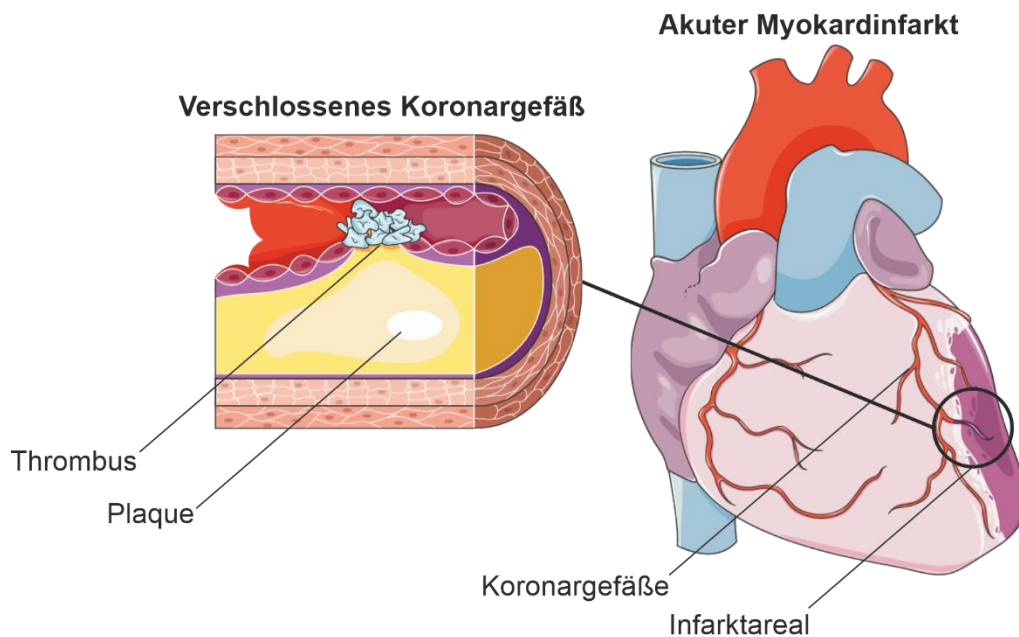


Abbildung 1: Entstehung eines Myokardinfarktes (MI). Durch einen thrombotischen Verschluss (Vergrößerung links) eines verengten Koronargefäßes (atherosklerotische Ablagerung „Plaque“) im Bereich der linken absteigenden Koronararterien (LAD) entsteht eine Ischämie. Die Ischämie (verringerte Durchblutung der Koronargefäße) kann einen akuten MI (lila Areal im rechten Bild) zur Folge haben. In diesem Bereich kommt es schließlich zum vermehrten Absterben von gesunden Kardiomyozyten (CM) durch Nährstoffmangel und Hypoxie. Längerfristig werden die abgestorbenen CM durch Narbengewebe ersetzt, welches mit einem erheblichen Funktionsverlust des Herzens einhergeht. Grundbausteine dieser Abbildung wurden verwendet von <https://smart.servier.com/>.

1.2 Komplikationen Nach MI

Die CM befinden sich im Myokard des Herzmuskels, wobei das Myokard zwischen Endokard (dünnes Epithelgewebe, das die innere Oberfläche des Herzens bedeckt, bildet auch die Herzklappen) und Epikard (äußere Schicht, fest mit Myokard verbunden, dünnes Epithelgewebe) liegt. Das gesamte Herz wird vom Perikard (Bindegewebe) als Schutz

umgeben. Bevor es zur Herzinsuffizienz als kritischste Komplikation nach MI kommt, durchläuft das infarzierte Myokard verschiedene Phasen mit dem sog. kardialen Remodeling als finale und langfristige Phase. Die Phasen sind definiert durch Inflammation, zelluläre Migration und Narbenbildung. Alle drei Aspekte spielen in der Forschung eine entscheidende Rolle, um letztendlich das Remodeling zu beeinflussen und die Ausbreitung der Narbe zu verhindern. In diesem Projekt spielt die Migration von kardialen Fibroblasten eine wichtige Rolle, da diese bedeutend bei der Narbenbildung und langfristig gesehen, der vorherrschende Zelltyp in der Narbe sind (siehe Punkt 1.4). Die für die Patienten gefährlichsten und potentiell letalen Komplikationen nach MI, sind ventrikuläre Arrhythmien (Rhythmusstörungen) wie z.B. ventrikuläre Tachykardien (VTs) oder im Extremfall Kammerflimmern bedingt durch die Narbe (Echt et al. 1991, Henkel and Henkel 2006). Durch die Wiederherstellung der Durchblutung nach einem Koronarverschluss können ebenfalls Arrhythmien entstehen, diese werden als Reperfusionarrhythmien bezeichnet und können beim Patienten zum plötzlichen Herztod führen (Pop et al. 1987, Thale et al. 1987).

Neben den arrhythmischen Komplikationen, können ebenfalls drastische Verschlechterungen der Pumpfunktion des Herzens durch Verlust von funktionalem Herzgewebe entstehen. Besonders kritisch ist dies bei großen Infarkten und wiederholenden Ereignissen. Insbesondere bei großen Infarkten besteht ebenfalls die Gefahr der Ventrikelwandruptur oder von Ventrikelwandaneurysmen. Bei den Komplikationen der Pumpfunktion handelt es sich um linksventrikuläre Dysfunktionen (LVSD), sowie eine verringerte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF). Als Folge solcher Dysfunktionen kann sich eine Herzinsuffizienz mit anschließendem Herzversagen entwickeln.

1.3 Erregungsbildung im Herzen und ventrikuläre Tachykardien (VTs)

Wichtige zelluläre Bestandteile des Erregungsleitungssystems im Herzen sind die CM, die durch Depolarisation elektrische Signale generieren und diese weiterleiten. Um einen koordinierten Kontraktionsablauf des Herzens, gegliedert in Systole (Kontraktion) und Diastole (Ruhe- bzw. Füllphase), zu ermöglichen, werden die elektrischen Signale stets in wiederkehrender Abfolge aktiviert. Diese funktioniert zwar autonom, unterliegt aber

dennoch sympathischen und parasympathischen Einflüssen, sodass Pumpleistung und Blutdruck angepasst werden können.

Die Erregung wird zunächst im Sinusknoten (rechtes Atrium, Einmündung Vena cava superior in den rechten Vorhof) gebildet und anschließend über beide Atrien an das Kammermyokard weitergeleitet (siehe Abb. 2). Dies führt dazu, dass zu Beginn der Systole eine Kontraktion der Atrien stattfindet. Eine Bindegewebsschicht zwischen Atrien und Ventrikel schützt vor einer vorzeitigen Kontraktion auf Ventrikelebene, führt aber zunächst zu einer Verzögerung der Erregungsweiterleitung. In diesem Bereich befindet sich der Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), der mit 0,14 m/s die geringste Leistungsgeschwindigkeit des Herzens besitzt. Die zeitliche verzögerte Erregung der Ventrikelmuskulatur führt zu einer optimalen Befüllung dieser während der Systole. Ein sog. AV-Block zweiten oder dritten Grades (z.B. im Rahmen eines Hinterwandinfarktes) führt durch Verlangsamung oder Blockade des AV-Knotens zu Herzrhythmusstörungen. Nach dem AV-Knoten erreicht die Erregung das His-Bündel (dies befindet sich distal am Septum zwischen Atrien und Ventrikel), geht von dort in die Tawara-Schenkel und anschließend in die Purkinje-Fasern über. Falls ein SA-Block (Sinuatrialer Block) oder ein AV-Block vorliegt, kann ebenfalls am His-Bündel eine Erregung gebildet werden, welche als Kammerersatzrhythmus bezeichnet wird. Eine VT entsteht distal des His-Bündels und geht von der Ventrikelmuskulatur aus. Auf Zellebene werden elektrische Signale über elektrische Synapsen (Gap junctions, G_j) von Zelle zu Zelle weitergeleitet. Dazu fließen bei einer Depolarisation der präsynaptischen Zelle (Potentialgefälle zwischen beiden Zellen entsteht) Kationen durch die G_j zur postsynaptischen Zelle. Wird durch den Ionenfluss bei der postsynaptischen Zelle ein Schwellenwert („Alles oder nichts Prinzip“) überschritten, wird ein Aktionspotential ausgelöst und das elektrische Signal innerhalb weniger Millisekunden weitergeleitet. Die G_j im Herzen bilden also physiologisch gesehen ein elektrisches Netzwerk, dass auch als elektrisches Synzidium bezeichnet wird. Erregbare Zellen weisen charakteristisch eine sog. Spontanaktivität auf, sodass ohne äußerliche Einflüsse Aktionspotentiale generiert werden. So können durch spontane elektrische Aktivität, Arrhythmien entstehen. Eine besondere Rolle spielt hierbei der Reentry-Mechanismus. Dieser beruht auf einer inhomogenen Erregbarkeit des Myokards durch z.B. die Infarkt Narbe. Im Normalfall (im gesunden Myokard) folgt auf eine

Depolarisation eine Refraktärzeit, in der keine Erregung stattfinden kann. Dies führt dazu, dass die Erregung der CM nach Aktivierung der Ventrikel auf refraktäres Gewebe trifft und ausklingt. Die heterogenen Leitungseigenschaften bei einer Infarktnarbe führen schließlich zu einem unidirektionalen Block mit verlangsamter Erregungsleitung und verkürzter Refraktärzeit. Die schnelle Depolarisation trifft also immer auf nicht-refraktäres Gewebe und kann letztendlich zu einer kreisenden Erregungsweiterleitung führen. Dies führt zu einer deutlich gesteigerten Herzfrequenz, die zu einer gestörten Ventrikelfüllung und -kontraktilität führt, welche im schlimmsten Fall (Kammerflimmern) funktionell einem Herzstillstand gleichkommt. Daraus resultierend entsteht ein kardiogener Schock, bei welchem es zu einer massiven Abnahme der kardialen Pumpleistung und schließlich zu einer Minderperfusion der Organe kommt. Eine VT wird nicht-invasiv via EKG durch einen verbreiterten QRS-Komplex diagnostiziert. Zusätzlich besteht die Möglichkeit eine VT mittels invasiver elektrophysiologischer Untersuchungen (EPU), kombiniert mit programmierter Ventrikelstimulation zu diagnostizieren. Dazu wird zunächst ein Stimulationskatheter über die rechte V. cava oder über die Leistenvene in das rechte Atrium gelegt und je nach Vorbefund bis in den rechten oder linken Ventrikel vorgeschoben. Der Katheter kann schließlich ein EKG messen und zugleich Elektrosignale für eine programmierte Stimulation aussenden. Die programmierte Stimulation wird zum Auslösen von „künstlichen“ Herzrhythmusstörungen (u.a. VTs) verwendet und trägt zur Diagnosestellung bei. Im Normalfall wird durch das Entfernen des elektrischen Reizes die „künstliche“ Herzrhythmusstörung beendet. Dennoch kann es während der EPU zum Auftreten von Kammerflimmern kommen, weshalb zu jeder EPU ein externer Defibrillator zur Verfügung steht.

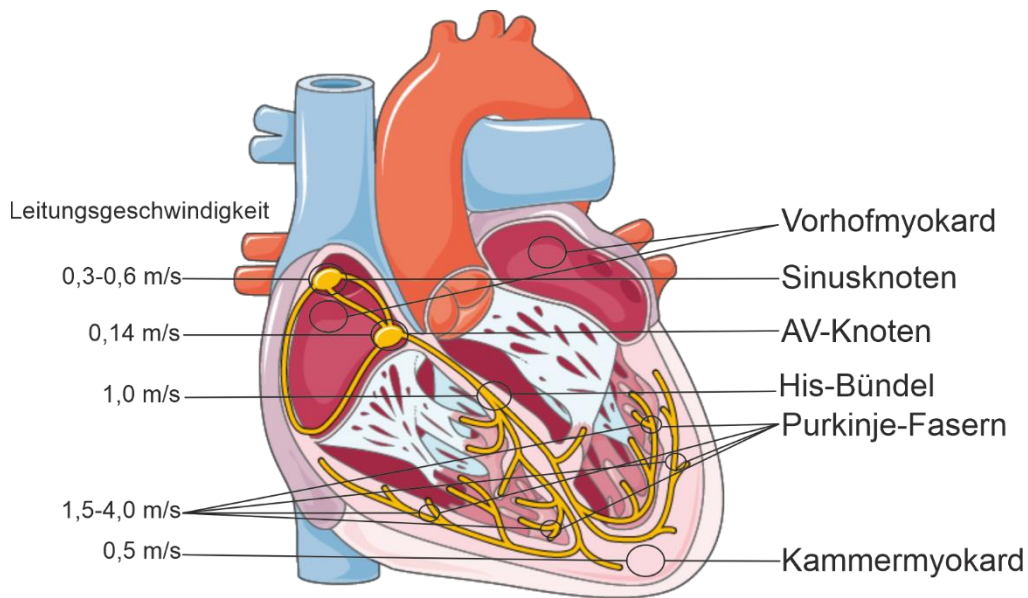


Abbildung 2: Reizweiterleitung im Herzen. Die Erregungsentstehung und Weiterleitung im Herzen wird in verschiedene Gewebeabschnitte (rechte Seite) unterteilt, sodass sich für diese Abschnitte ebenfalls unterschiedliche Leitungsgeschwindigkeiten (linke Seite) ergeben. Grundbausteine dieser Abbildung wurden verwendet von <https://smart.servier.com/>.

Bei einer VT (Beispiel siehe Abb. 3B) wird zwischen monomorphen (gleicher Ventrikelkomplex) und polymorphen VTs (Veränderung des Ventrikelkomplexes von Herzschlag zu Herzschlag) unterschieden. Man spricht außerdem von einer langanhaltenden VT, wenn diese länger als 30 s anhält. Eine akute VT-Therapie beinhaltet, falls dies der hämodynamische Status der Patienten zulässt, zum einen die pharmakologische Gabe von Antiarrhythmika (z.B. Amiodoron) oder β -Blocker. Nichtsdestotrotz zeigten pharmakologische Therapieansätze in der Vergangenheit meist pro-arrhythmische Effekte, sodass die meisten klinischen Versuche vorab beendet wurden (Echt et al. 1991). Bei hämodynamischer Instabilität muss eine Elektrokardioversion (d.h. eine EKG-getriggerte Abgabe von Elektroschocks oder eine Defibrillation), oder eine Ablation von pro-arrhythmischen Substrat durchgeführt werden. Dennoch fehlt bei den oben beschriebenen akuten Therapiemöglichkeiten, die eigentliche Behandlung der Grunderkrankung. Dieser Bereich ist stetig im Fokus kardiovaskulärer Forschungen, allerdings gibt es bis heute nur wenige Therapieansätze. Diagnostisch werden im Rahmen einer ischämischen Herzerkrankung verengte oder verschlossene Herzkranzgefäße mittels einer Herzkatheteruntersuchung (Koronarangiographie) dargestellt. Diese Herzkranzgefäße werden entweder mittels Kathedertechniken dilatiert oder

wiedereröffnet, falls dies nicht möglich ist kann eine koronare Bypass-Operation unter Verwendung autologer arterieller oder venöser Gefäße durchgeführt werden. Bei Patienten mit stark reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion (Primärprophylaxe) und/oder wiederkehrenden VTs (Sekundärprophylaxe) wird zusätzlich eine ICD- (Implantierbarer Kardioverter Defibrillator) Therapie empfohlen. Ein ICD erkennt VTs und führt das Herz durch Abgabe von elektrischen Impulsen (Overdrive-Pacing, Defibrillation) in den normalen Herzrhythmus zurück. Durch den Einsatz von ICDs als anti-VT Therapie kann die Mortalität der Patienten nach MI erheblich reduziert werden (Moss et al. 2002). Nichtsdestotrotz hat eine ICD Implantation auch negative Auswirkungen auf die Patienten, sodass ICDs auch sog. inadäquate Impulse aussenden können und es zu Infektionen im Bereich des ICD Aggregates sowie der Sonden kommen kann. Zudem hat die Abgabe von Defibrillationsimpulsen auch psychologische Auswirkungen auf die Patienten (Sesselberg et al. 2007).

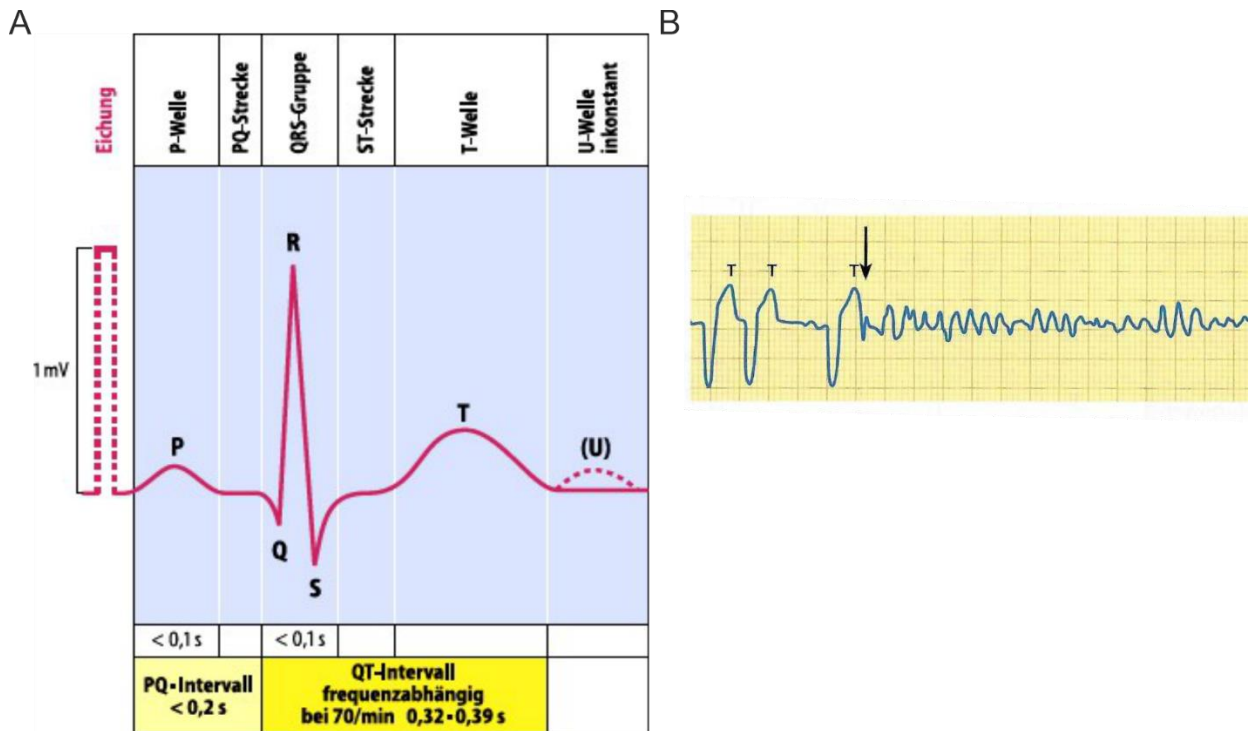


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines normalen EKG und beispielhafter VT. Normales EKG nach Einthoven II. Ableitung (A) (Schmidt 2004). Die P-Welle zeigt die Erregungsausbreitung in den Atrien mit darauffolgender Erregung in den Ventrikeln (QRS-Komplex). Die nachfolgende T-Welle zeigt die Erregungsrückbildung (Repolarisationsphase) in den Ventrikeln. Beispielhafte Darstellung des Übergangs von ventrikulären Extrasystolen (B) in Kammerflimmern. Die vulnerable Phase (Pfeil) findet während der T-Welle statt. (Speckmann 2013).

1.4 Wundheilung und kardiales Remodeling

Wenige Stunden nach dem MI, beginnt die Phase der kardialen Wundheilung, die ein Teil des kardialen Remodelings ist (Eaton and Bulkley 1981, Hochman and Bulkley 1982, Korup et al. 1997). Das Remodeling bezeichnet eine Veränderung des Herzmuskels, die sowohl strukturell, als auch funktionell erfolgt und zur Herzinsuffizienz führen kann. Auch Veränderung der Genexpression durch Aktivierung verschiedener Signalwege spielen beim Remodeling eine Rolle. Diese haben Auswirkungen auf die molekulare und zelluläre Zusammensetzung der post-Infarkt Narbe. Das Remodeling kann neben den pathologischen Ursachen (z.B. MI, chronischer Bluthochdruck, Myokarditis), auch physiologische Ursachen (z.B. extreme sportliche Aktivität) haben. Letzteres ist allerdings ein reversibler Zustand. Die Wundheilung (Fibrosierung) eines Infarktes ist in drei verschiedene Phasen gegliedert (siehe Abb. 4: Inflammations-, Proliferations- und

Maturationsphase), die zeitlich und inhaltlich ineinander übergehen, basierend auf Untersuchungen im Mausmodell (Frangogiannis 2008). Ein Zelltyp scheint vorrangig in allen drei Phasen eine große Rolle zu spielen: Der kardiale Fibroblast. Die erste Phase, die sog. inflammatorische Phase (Tag 0 bis 2 post MI), beginnt unmittelbar nach MI und zeichnet sich durch die massive Nekrose der CM aus. Die abgestorbenen CM senden pro-inflammatorische Signale aus (IL-1 β , TNF α) und aktivieren das angeborene Immunsystem, sowie einige sog. „stille“ Fibroblasten (Fu et al. 2018). Daraufhin exprimieren die inflammatorischen Fibroblasten vermehrt Cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF α) und Chemokine (CXCL-1, 2,5,8) und eine Infiltration von Immunzellen beginnt (Ma et al. 2017). Hierbei handelt es sich hauptsächlich um neutrophile Granulozyten und Leukozyten, die zur Beseitigung der abgestorbenen CM beitragen. Ist diese Aufgabe erfüllt, kommt es zur Apoptose der neutrophilen Granulozyten, welche schließlich von Makrophagen phagozytiert werden. Die zweite Phase (Proliferationsphase, Tag 2-5 post MI) ist charakterisiert durch einen massiven Anstieg der Fibroblasten- und Endothelzellpopulation im Infarktareal. Die Makrophagen senden immunsuppressorische Signalmoleküle (IL-10, TGF β) aus und es kommt zur Migration von nicht-residenten Fibroblasten in das infarzierte Areal. Durch TGF β und den mechanischen Stress werden die Fibroblasten aktiviert und differenzieren in Myofibroblasten. Die Myofibroblasten zeichnen eine hohe α SMA Expression und eine proliferierende Aktivität aus. Es kommt außerdem bereits zu der ersten Expression von extrazellulären Matrix (ECM) - Proteinen und zur Bildung von mikrovaskulären Netzwerken. Innerhalb der letzten Phase (Tag 5-7 post MI), der Maturationsphase, kommt es zur massiven Reduktion der Myofibroblasten- und Endothelzellpopulation durch Apoptose und die finale Narbenbildung durch vernetztes Kollagen findet statt. Selbst über die Maturationsphase hinaus, sind die Fibroblasten im infarzierten Areal zu finden. Sie transdifferenzieren in sog. Matrifibrozyten, besitzen keine α SMA Expression mehr und sind Bestandteil der reifen Narbe (Fu et al. 2018).

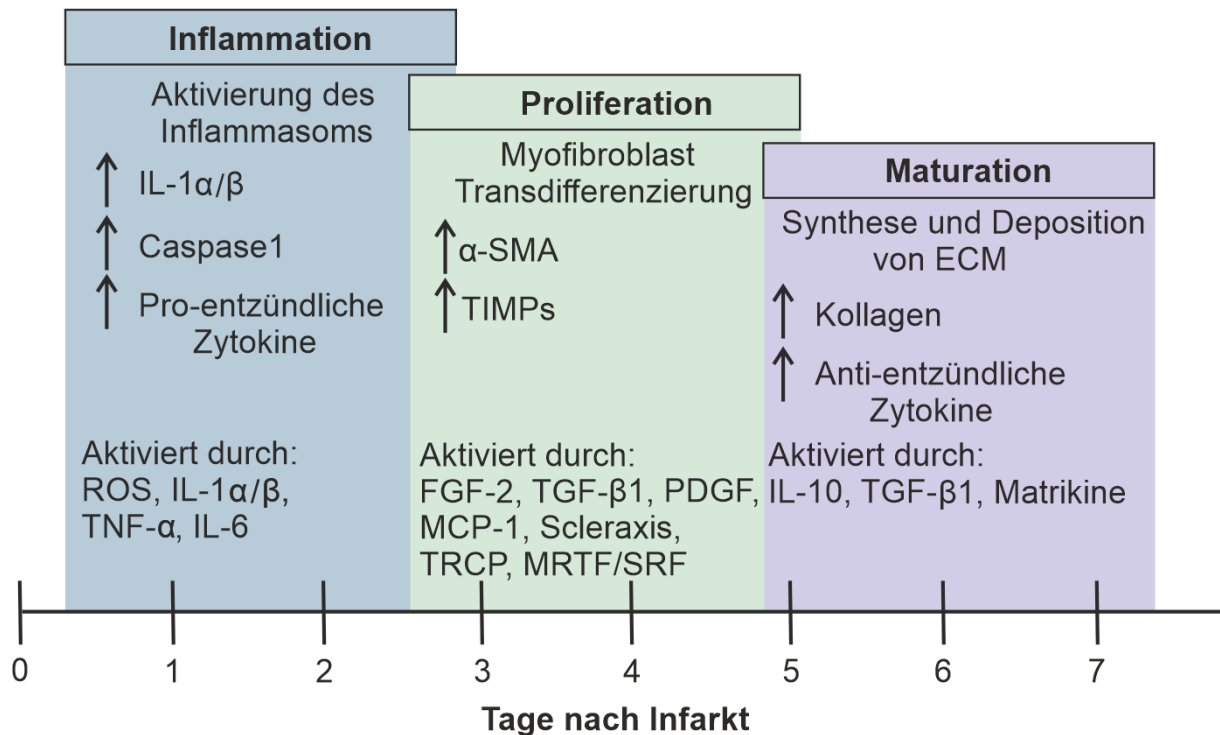


Abbildung 4: Phasen des kardialen Remodelings nach Infarkt in der Maus. Modifiziert nach Ma et al. 2017 (Ma et al. 2017).

1.5 Experimentelle Infarktmodelle in der kardiovaskulären Forschung

Ein MI entsteht durch eine myokardiale Ischämie, mit oder ohne darauffolgender Reperfusion, also die Wiederherstellung der Blutversorgung des ischämischen Gewebes durch z.B. rekanalisierende Maßnahmen. Da die strukturellen und funktionellen Folgen eines MI, sowie deren Interventionsmöglichkeiten stets Aspekte der kardiovaskulären Forschung sind, bedarf es translationaler Infarkte im experimentellen Tiermodell. Das mittlerweile große Spektrum dieser Forschung reicht von isolierten kardialen Zellen *in vitro*, über *ex vivo* Herzperfusionen, bis hin zu den experimentellen Infarkten *in vivo* (Lindsey et al. 2018). Der erste experimentelle Infarkt entstand bereits vor über 100 Jahren, bei einer koronaren Ligatur eines narkotisierten Hundes, durchgeführt von Conheim und v. Schulthess-Rechberg (W Schaper 1979). In der Zwischenzeit ist das Spektrum der experimentellen Infarkte um einige Modelle und Tierarten erweitert worden. Vorderrangig werden im Mausmodell die Kryoläsion und die Okklusion der „*Left Anterior Descendent Coronary Artery*“ (LAD, linke Herzkranzarterie) mit anschließender Reperfusion, sowie das *ex vivo* Modell der Herzperfusion verwendet. Beide *in vivo*

Modelle sind mechanistisch sehr verschieden und weisen dementsprechend auch Unterschiede im kardialen Remodeling auf. Die Kryoläsion bezeichnet den mechanistischen Zelltod durch Gefrieren, der hauptsächlich mit Nekrose des gesunden Herzgewebes einhergeht. Durch die Läsion entstehen scharf abgegrenzte Infarkte, die alle nahezu dieselbe Größe aufweisen (siehe Abb. 5A). Die entstehenden Infarkte zeichnen sich durch einen hohen transmuralen Anteil aus, sodass von subendokardial bis epikardial alle Herzwandschichten betroffen sind. Daher bietet die Kryoläsion den Vorteil der standardisierten Infarktgenerierung, die eine hohe Vergleich- und Reproduzierbarkeit im Tiermodell ermöglicht. Auf der anderen Seite, führt dieses Modell zu einer verlangsamten Narbenbildung, sodass diese erst zwei Wochen nach Infarktgenerierung abgeschlossen ist (Duerr et al. 2011). Zudem ist die Kryoläsion schlecht vergleichbar zu dem humanen ischämischen Infarkt, wird aber dennoch aufgrund der oben genannten Aspekte, in der Forschung von Zellersatztherapien präferiert. Eine hohe Vergleichbarkeit zum humanen MI bietet die Okklusion der LAD mit oder ohne anschließender Reperfusion. Die Okklusion erfolgt mittels einer Untertunnelung und Abbinden der LAD (siehe Abb. 5B), wobei die Naht bei einer permanenten Okklusion zugezogen und bei einer LAD mit Reperfusion nach einem bestimmten Zeitpunkt entfernt wird. Die permanente Okklusion reflektiert das Szenario bei Patienten mit akutem MI, bei denen nicht rechtzeitig rekanalisierenden Maßnahmen zur erfolgreichen Reperfusion unterzogen wurden. Sie führt oft zu sehr großen Infarkten, die daher mit einer höheren Mortalität im Vergleich zur Kryoläsion einhergehen. Die größere Variabilität und Mortalität führen letztendlich dazu, dass eine größere Gruppengröße im Experiment verwendet werden muss (im Vergleich zur Kryoläsion). Eine geringere Mortalitätsrate als die permanente Okklusion, verzeichnet die vorübergehende Koronarokklusion mit Reperfusion. Hierbei wird die Ligatur nach einem bestimmten Zeitpunkt, meistens nach 45-60 Minuten, wieder entfernt und eine Wiederherstellung der Blutversorgung gewährleistet. In diesem Infarktmodell ist die Narbenbildung bereits nach sieben Tagen abgeschlossen (Duerr et al. 2011). Nichtsdestotrotz, verzeichnet auch dieses Modell eine hohe Variabilität der Infarktgröße und die Transmuralität der Infarkte ist in den meisten Fällen nicht gegeben.

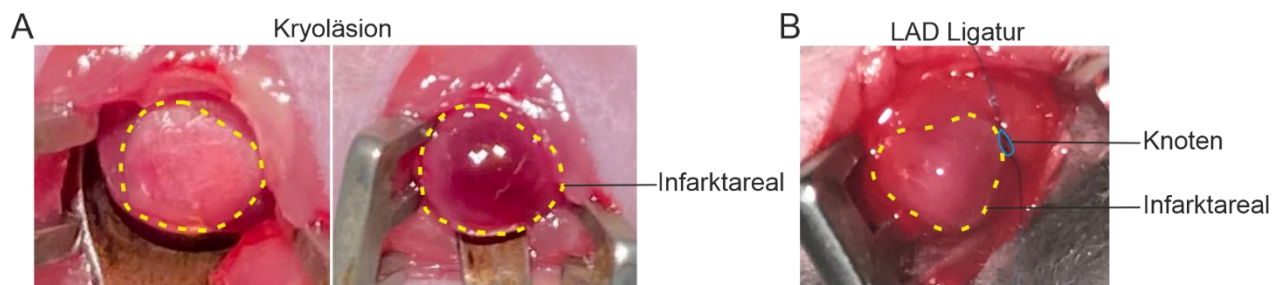


Abbildung 5: Experimentelle Infarktmodelle. (A) Generierung einer Kryoläsion mittels einem in Stickstoff gefrorenen Kupferstempels (Durchmesser= 3,5 mm) unmittelbar nach 3x15s (linkes Bild) und nach ein paar Min. (rechtes Bild) nach Aufdrücken auf den linken Ventrikel. (B) Okklusion der linken Herzkranzarterie (LAD) durch Abbinden mittels eines 8-0 Prolene Fadens (blau markiert).

1.6 Das Transmembranprotein Connexin 43

Connexin 43 (Cx43 oder auch GJA1) ist Teil der großen Familie der Transmembranproteine (Connexine). Connexine bilden sog. Hemichannel (siehe Abb. 6A, Connexon) und ermöglichen dadurch die Zell-Zell-Kommunikation in verschiedenen Geweben. So wirken sie z.B. im Gehirn bei der synaptischen Übertragung mit oder im Herzen bei der Erregungsweiterleitung. Die Klassifizierung und Benennung der einzelnen Connexine erfolgt nach ihrem Molekulargewicht. Cx43 besitzt dementsprechend ein Molekulargewicht von 43 kDa. Zwei gegenüberliegende Connexone (Abb. 6A, je 6 Cx43 Proteine pro Connexon, vier Transmembran Domänen) bilden einen transmembranen Kanal (Abb. 6B). Die Amino- und Carboxylgruppen befinden sich innerhalb des Zytosols und ermöglichen durch z.B. Phosphorylierungen Protein-Interaktionen. Die Connexone sind hexamere Strukturen und bestehen daher aus jeweils sechs Connexinen. Der Transmembrankanal begünstigt den interzellulären Austausch von kleinen Molekülen (< 1 kDa), wie z.B. Ionen, kleine Metaboliten, sekundäre Botenstoffe oder microRNAs (Ribeiro-Rodrigues et al. 2017). Neben der Zell-Zell-Kommunikation findet ebenfalls eine parakrine Kommunikation zwischen inter- und extrazellulärem Milieu statt (Begandt et al. 2017). Es wurde außerdem gezeigt, dass Connexine regulierend bei der Transkription mitwirken und mit Modulatoren des Zellwachstums und -todes agieren (Esseltine and Laird 2016). Im adulten Herzen wird Cx43 zum größten Teil von ventrikulären CM in Glanzstreifen exprimiert (Boengler et al. 2009, Agullo-Pascual et al. 2014). Dort ist dessen Expression notwendig für Na⁺ Ströme und Akkumulierung des spannungsabhängigen Na⁺ Kanals Nav 1.5 (Jansen et al. 2012, Lubkemeier et al. 2013). Beide Proteine (Cx43 und

der spannungsabhängige Na_v 1.5) sind verantwortlich für die Reizweiterleitungsgeschwindigkeit. Eine reduzierte Expression eines oder beider Proteine führt zu einem Schenkelblock und Arrhythmien (Camelliti et al. 2004, van Rijen et al. 2004, Jansen et al. 2012, Nisbet et al. 2016, Quinn et al. 2016). In Cx43 KO Mausmodellen wurde gezeigt, dass dies zu angeborenen Herzfehlern mit erhöhter postnataler Mortalität führt (Ewart et al. 1997). Selbst ein konditioneller Knockout von Cx43 führt im Mausmodell zu schweren ventrikulären Arrhythmien (Jansen et al. 2012). Es wird vermutet, dass die Beeinträchtigung der elektrischen Kopplung bei kardialen Funktionsstörungen (z.B. Herzversagen) durch angepasste Cx43 Expression und deren Verteilung moduliert wird. So führt z.B. eine kardiale Ischämie zu einem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} Konzentration, einen Abfall des intrazellulären pH-Wertes und veränderte Aktivität von Proteinkinasen und Phosphatasen, dass schließlich zu einer Lateralisierung (Umverteilung der Expression auf die lateralen Membranen) von Cx43 führt (Beardslee et al. 2000, De Vuyt et al. 2009). Ein weitaus geringerer Anteil des gesamten kardialen Cx43 wird von kardialen (Myo-) Fibroblasten ((m)FB) exprimiert (Camelliti et al. 2004, Nisbet et al. 2016). Die Rolle von Cx43 in speziell diesem Zelltyp, aber auch die elektrische Kopplung zwischen CM und cFB ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt und wird weiter erforscht, auch wenn neue Untersuchungen eindeutige Hinweise hierfür finden konnten (Quinn et al. 2016, Rubart et al. 2018).

Da nur ein geringer Anteil des kardialen Cx43 Gehalts von Fibroblasten exprimiert wird und dies vor allem bei der Infarktnarbe ein Problem darstellt (Verlust an CM, daher großer Verlust an Cx43-Gjs), ist ein interessanter Ansatz, den Cx43 Gehalt in der Infarktnarbe zu erhöhen. Dazu ist es notwendig, die sich dort befindlichen Zellen (u.a. kardiale Fibroblasten) möglichst effizient genetisch zu verändern, um einen Cx43-Gentransfer zu ermöglichen. Eine Methode dafür ist die Verwendung von viralen Vektoren in der Gentherapie, die im folgenden Abschnitt erläutert werden soll.

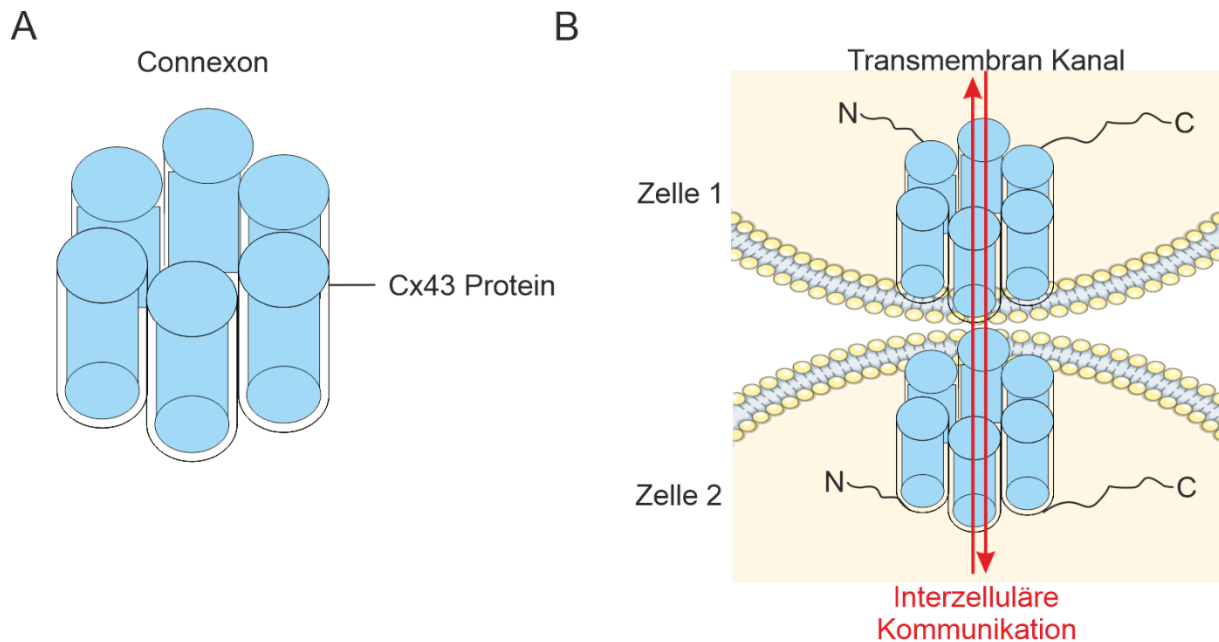


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Cx43 Transmembran Kanals. (A) Aufbau eines einzelnen Connexons (Hemichannels), bestehend aus 6 Cx43 Proteinen. (B) Zwei Connexone bilden einen Transmembran Kanal (Gap junction) und ermöglichen interzelluläre Kommunikation zwischen zwei Zellen. Die jeweiligen Amino- und Carboxylgruppen befinden sich innerhalb des Zytosols. Grundbausteine dieser Abbildung wurden verwendet von <https://smart.servier.com/>.

1.7 Virale Gentherapie

Die Gentherapie bezeichnet den Transfer von Genmaterial (RNA, DNA) mit Hilfe eines Vektors in eine Zielzelle, um dort vermehrt oder auch geringer (anti-sense Technik) exprimiert zu werden. Man bezeichnet dieses Genmaterial auch als therapeutisches Gen, da es in der Zielzelle einen therapeutischen Zweck erfüllen, also einen Teil zur Heilung einer Krankheit beitragen soll. Die Gentherapie spielt in vielen klinischen Bereichen eine große Rolle, vor allem in der Krebstherapie, aber auch bei Immun- und Erbkrankheiten. So sind bereits für die HIV- und Leukämie-Therapie, oder auch zur Behandlung des malignen Melanoms einige Gentherapeutika zugelassen worden. Der genetische Transfer kann auf verschiedene Weisen erfolgen. So ist es möglich, das Genmaterial mittels physikalischer oder chemischer Methoden (Transfektion) in die Zielzelle zu bringen. Die Transfektion ist eine gängige Methode in der biologischen Forschung. Die weitaus klinisch relevantere Methode ist das Verwenden von viralen Vektoren für den Gentransfer (Lukashev and Zamyatnin 2016). Hierbei wird zwischen dem direkten und dem

zellbasierten viralen Gentransfer unterschieden. Bei dem direkten Gentransfer wird das therapeutische Gen in ein Virus verpackt und direkt in den Ziel-Organismus injiziert (entweder lokal oder systemisch). Bei der zellbasierten Methode, werden dem Patienten zunächst Zellen entnommen (z.B. Stammzellen) und *in vitro* mit einem Zielvirus genetisch modifiziert. Die transduzierten Zellen werden anschließend wieder in den Patienten eingebracht (lokale oder systemische Injektion) (Collins and Thrasher 2015). Wichtige Anforderungen an virale Vektoren sind vor allem eine geringe Zyto- und Genotoxizität, als auch die Zelltypspezifität. Eine große Virengruppe, die häufig in der gentherapeutischen Forschung verwendet wird, sind die Retroviren. Retroviren transferieren das Genmaterial in Form von Einzelstrang-RNA in die Wirtszelle, in der sie in DNA umgeschrieben und stabil in die Wirtszell-DNA eingebaut wird (Kim et al. 2000, Maier et al. 2010). Sie sind zwischen 80-120 nm groß (Vogt and Simon 1999) und beinhalten neben zwei Kopien der Ziel-RNA, die Enzyme reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Dieser Inhalt ist mit Hüllproteinen (Capsid) umhüllt, auf dessen Außenseite sich spezielle Glykoproteine befinden, die für die Interaktion mit Zellrezeptoren verantwortlich sind (Morikawa et al. 1998). Das retrovirale Genom lässt sich in die Gene der Strukturproteine (*gag*- Gene, virusspezifische Antigene), die Gene der Transkriptionsenzyme (*pol*- Gene, z.B. Transkriptase) und die Gene der Glykoproteine (*env*- Gene, Hüllschicht) unterteilen (Katz and Skalka 1994). Zusätzlich besitzen die Viren viruseigene Promotoren, die sog. LTR-Sequenzen (long terminal repeats), die jeweils beide Seiten des Virus- Konstruktes flankieren (Watanabe and Temin 1982). Zu den Retroviren gehört z.B. das murine moloney Leukämievirus (MMLV, Gruppe der Gammaretroviren), das für die Integration auf die Mitose der Wirtszellen angewiesen ist und dementsprechend nur proliferierende Zellen infizieren kann. Ferner gibt es die Lentiviren, die sowohl proliferierende als auch nicht-proliferierende Zellen infizieren können. Besonders bedeutend sind die viruseigenen Tropismen, die dabei helfen nur einen bestimmten Zelltyp zu transduzieren. Eine mögliche Alternative zu Retroviren, sind die Adenoviren. Diese zeichnen sich durch das Fehlen von Hüllproteinen aus und beinhalten das Genmaterial in Form von DNA. Sie bieten vor allem den Vorteil einer besseren Biosicherheit, da sie nicht in das Wirtsgenom integrieren, wie die Retroviren. Nichtsdestotrotz fallen sie unter die Kategorie S2 Viren, da sie humanpathogen wirken. Ein weitaus größeres Problem bei der Anwendung von Adenoviren in der Gentherapie, stellt die große immunogene Aktivität dar. So führt das

Adenovirus-Capsid zur starken Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Muruve 2004, Wold and Toth 2013). Adenoviren werden heute vor allem in Studien zur Tumorthherapie und in Impfstoffen (z.B. Covid-19) eingesetzt (Araújo et al. 2022). Bis heute hat sich daher ein weiteres Virus in der Gentherapie durchgesetzt: Das adeno-assoziierte Virus (AAV). Das AAV wurde damals als Zufallprodukt bei der Adenovirus Produktion entdeckt, wodurch sich auch der Name des Virus ergeben hat (Rose et al. 1966, Hastie and Samulski 2015). Bis heute hat sich das AAV aufgrund seiner geringen Immunogenität (im Vergleich zum Adenovirus) und großen Biosicherheit in der wissenschaftlichen Forschung durchgesetzt. Das AAV beinhaltet wie der Adenovirus das Genmaterial in Form von DNA, integriert ebenfalls nicht in das Wirtsgenom, ist jedoch auch nicht humanpathogen, sodass das AAV in die Risikogruppe S1 fällt (Zhang et al. 2022). Je nach AAV-Serotyp werden verschiedene Zielgewebe aufgrund des viruseigenen Tropismus angesteuert (Zhang et al. 2022). Für das Myokard ist bislang das AAV des Serotypen 9 (AAV 9) der Goldstandard, da er sehr effektiv CM transduziert (Agah et al. 1997, Bish et al. 2008, Hu et al. 2010). Für das Myokard gibt es allerdings bis heute kein hoch spezifisches Virus, sodass z.B. beim AAV 9 auch u.a. Skelettmuskel und Leber angesteuert werden (Zhang et al. 2022). Ein großer Nachteil bei der *in vivo* Verwendung von AAV, ist die potentiell hohe lebertoxische Wirkung (Manno et al. 2006, Watkins 2022). Ein weiteres Problem stellt auch der zielgerichtete Gentransfer der Myokardnarbe dar. Insbesondere die spezifische Transduktion von Fibroblasten ist bislang wenig effektiv, sodass innerhalb unserer Arbeitsgruppe die lokale Transduktion *in vivo* mittels lentiviraler Konstrukte nur eine Effizienz von ca. 3 % zeigte (Roell et al. 2018). Innerhalb dieses Projektes soll die Transduktionseffizienz dieser lentiviralen Konstrukte durch eine zellbasierte Injektion erhöht werden. Alternativ soll ebenfalls das MMLV für die spezifische Transduktion von Fibroblasten verwendet werden. Das MMLV besitzt aufgrund seines Tropismus, die Fähigkeit speziell Endothelzellen und kardiale Fibroblasten (ca. 60 %, im Vergleich nur 2 % Effizienz bei CM) zu transduzieren (Ramanujam et al. 2016).

1.8 Anti-VT Therapie mittels Gentransfer

Auch im kardiovaskulären Forschungsbereich findet die virale Gentherapie ihre Anwendung. So werden die pathophysiologischen und molekularen Mechanismen des MI immer weiter bekannt und deren Angriffspunkte Gegenstand gentherapeutischer

Forschung. Ein bedeutendes Ziel, ist die Beeinflussung der kardialen Narbenbildung und Reduktion von post-Infarkt Arrhythmien, die kausal auf eine verringerte Expression von Cx43 und Nav1.5 (Fry et al. 2014) zurückzuführen sind. Bereits in der Vergangenheit konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass das Einbringen von Cx43 exprimierenden Zellen (embryonale Kardiomyozyten, eCM), oder auch der lokale lentivirale Gentransfer einen positiven Effekt auf die Entstehung von VTs nach MI hat (Roell et al. 2007, Roell et al. 2018). So wurde gezeigt, dass eine VT in der BZ entsteht, aber die eingebrachten Cx43⁺ Zellen nicht in breitem Kontakt zum gesunden Myokard standen. Es wurde außerdem gezeigt, dass das Einbringen von K⁺- Kanälen- überexprimierenden Fibroblasten in die Infarktnarbe ebenfalls positive Effekte auf die VT-Inzidenz hat (Yankelson et al. 2008). Zudem wurde bereits im Schweinmodell eine AAV-basierte Cx43- Überexpression in den CM der BZ erzielt, welche ebenfalls zu einer Reduktion der VT-Inzidenz nach MI führte (Greener et al. 2012). Zusammenfassend zeigen diese Studien, dass die Cx43 Überexpression in der Narbe ein vielversprechender Ansatz für eine Anti-VT Therapie darstellen könnte. Die Cx43 Überexpression innerhalb der Narbe und die daraus resultierende Zunahme der Reizweiterleitungsfähigkeit könnte funktionell vergleichbar zu einem Blitzableiter sein. So würde die gesteigerte Reizweiterleitung in der Narbe zur Abnahme der Reizwellen-Blockade in der BZ führen, die Reizwelle würde schließlich über die BZ hinaus in den Infarkt abgeleitet und die elektrische Vulnerabilität daraufhin stabilisiert.

1.9 Kardiale Fibroblasten

In den meisten Gen- und Zelltherapeutischen Ansätzen stehen die CM im Vordergrund der Forschung. Sie sind relativ voluminös (im murinen Herzen= 23,845 μm^3 bei zweikernigen CM, 95,6 % der CM liegen zweikernig vor (Bensley et al. 2016)) und machen ca. 70 % des Gesamtvolumens des linken Ventrikels aus (Tang et al. 2009). Außerdem sind sie kontraktile und leitfähig u.a. aufgrund ihres hohen Cx43 Gehaltes. Nichtsdestotrotz spiegeln sie nur 25-30 % der Gesamtzellzahl der Zellen im Herzen wieder (Bergmann et al. 2015), sodass der zelluläre Anteil der Nicht-CM im Herzen wesentlich größer ist (ca. 70 %). Darunter fallen hauptsächlich Endothelzellen, Immunzellen und kardiale Fibroblasten (cFB) (Banerjee et al. 2007). Diese Arbeit fokussiert sich auf die Population der cFB, die im gesunden murinen Herzen immerhin einen Anteil von 27 % ausmacht

(Banerjee et al. 2007). cFB sind mesenchymale Zellen und weisen im Herzen verschiedene Phänotypen auf, die in Abhängigkeit der drei Phasen des kardialen Remodelings nach MI im Herzen (siehe Abschnitt 1.4) vorzufinden sind. Zunächst liegen sie im gesunden Myokard als sog. inaktivierte, ruhende Zellen vor. Dennoch tragen sie während dieser Phase zur Gewebe-Homöostase durch Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) bei. Unmittelbar nach MI (Tag 1) werden die cFB durch inflammatorische Signalmoleküle (IL1 β , TNFa) der toten CM aktiviert und transdifferieren in einen proinflammatorischen Phänotypen. Dieser ist hauptsächlich durch die Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) charakterisiert. In der anschließenden Proliferationsphase, sind die cFB maximal aktiviert und transdifferenzieren in mFB. Verantwortlich für diesen Wechsel des Phänotyps ist das Zytokin TGF β 1, Teil des Smad2/3- Signalweges (Asazuma-Nakamura et al. 2009). So führt z.B. ein Knock-out von Smad3 zur verringerten Kollagen-Ablagerung im Infarktareal (Dobaczewski et al. 2010). mFB weisen eine längliche Zellform auf, sind höchst proliferativ, exprimieren kontraktile Proteine, wie z.B. α SMA und produzieren die wesentlichen Bestandteile der ECM. Die maximale Proliferationsrate ist an Tag 3 nach MI erreicht, dennoch sind die mFB bis zu Tag 7 nach MI im Infarktareal zu finden (Frangogiannis 2014, Ivey and Tallquist 2016, Ma et al. 2017). Während der Reifung der Narbe (ab Tag 10 nach MI, Zeitpunkt variiert jedoch je nach experimentellen Infarktmodell) verlieren die mFB ihre α SMA Expression und Proliferationsfähigkeit, sodass sie in Matrifibrozyten transdifferieren und längerfristig in der ausgereiften Narbe zu finden sind (siehe Abb. 7) (Fu et al. 2018). Durch ihre Aktivierung wird eine massive Fibrose des Myokards ausgelöst, wodurch letztendlich die post-MI Herzfunktion stark verschlechtert wird. Ohne cFB kann keine vollständige Wundheilung stattfinden, es kommt zu einer Verdünnung der ventrikulären Wand, die im schlimmsten Fall sogar reißen kann (Davis et al. 2012, Kanisicak et al. 2016, Molkentin et al. 2017). Fibroblasten sind sehr robuste Zelltypen und optimal an das hypoxische Milieu in der Narbe angepasst. Dazu kommt, dass cFB einen hohen Membran-Widerstand besitzen, wodurch sie bestens das elektrische Signal innerhalb der Narbe weiterleiten können. So können sie beispielsweise als elektrische Brücken fungieren und das Signal der normalerweise durch das Narbengewebe isolierten CM via G j 's weiterleiten (Kohl 2003). Aufgrund der oben genannten Eigenschaften wurden die kardialen Fibroblasten als Zielzellen für dieses

Projekt ausgewählt. Auf der anderen Seite sind cFB an sich nicht erregbar, da sie keine APs generieren können und ihre elektrotonische Kopplung ist weiterhin nicht geklärt.

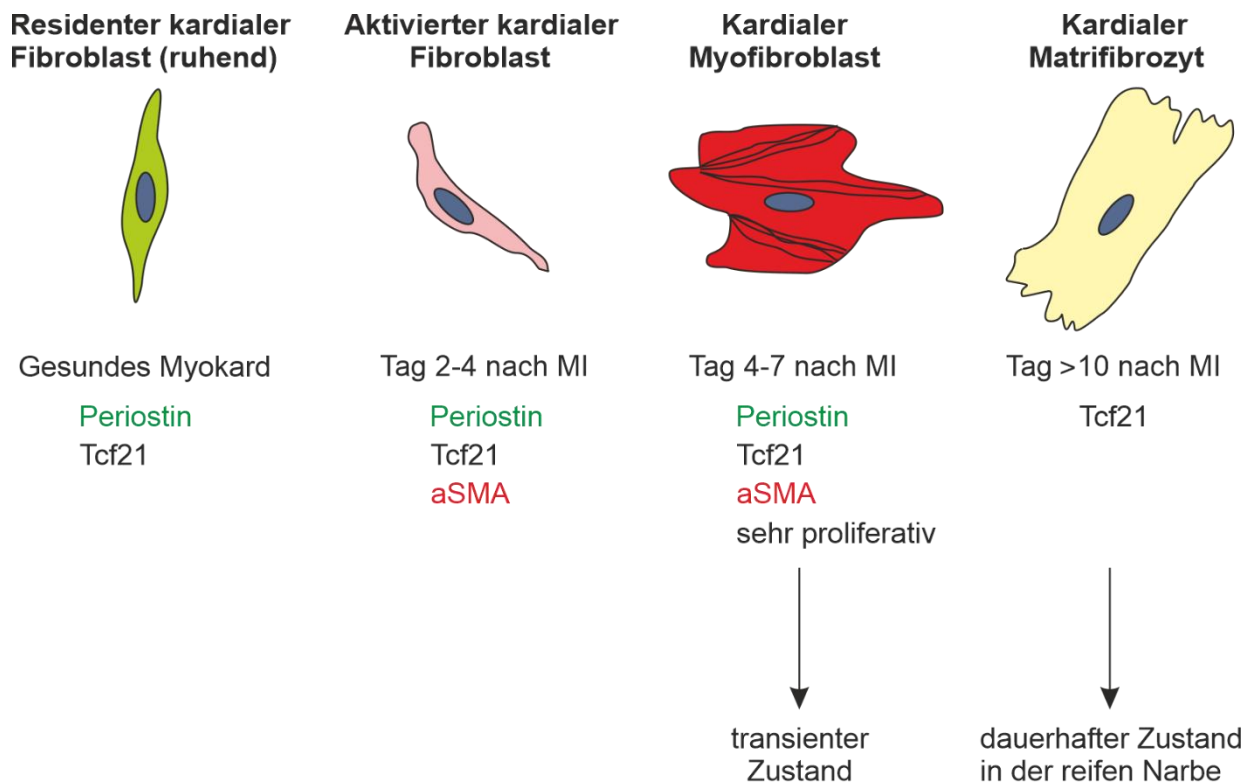


Abbildung 7: Phänotypen der kardialen Fibroblasten und deren Expressionsprofil vor und nach Myokardinfarkt. Modifiziert nach Fu et al. 2018 (Fu et al. 2018).

1.10 Magnetische Nanopartikel

Magnetische Nanopartikel (MNP) sind kleine Partikel (< 100 nm), die aus einem magnetischen Kern (z.B. Eisen) und außerdem aus einer individuell zusammengesetzten Hülle bestehen (Issa et al. 2013). Sie finden bereits in vielen verschiedenen biomedizinischen Gebieten ihre Anwendung. Dazu gehört u.a. die Verwendung in Magnet-Resonanz-Imaging (MRI), die Hyperthermie-Therapie bei Tumoren (Stigliano et al. 2013) oder auch die gezielte Verabreichung von Medikamenten (Moros et al. 2010). MNP eignen sich ebenfalls sehr gut bei Gen- und Zelltherapeutischen Ansätzen, da die zu transplantierenden Zellen mit MNP beladen werden und z.B. bei der Gentherapie die Zielviren an MNP gekoppelt werden können. Mittels Anwendung eines Magnetfeldes, kann schließlich die Effektivität der Gen- und Zelltherapie maßgeblich gesteigert werden (Mah et al. 2007, Issa et al. 2013). Sollen MNP für klinischen Aspekte verwendet werden,

müssen sie einige Eigenschaften erfüllen. So dürfen sie nur eine geringe Zelltoxizität, aber dafür eine hohe Biokompatibilität aufweisen. Meistens werden Eisenoxid Partikel, die z.B. Kerne aus Magnetit (Fe_3O_4) besitzen, verwendet (Dadfar et al. 2019). Diese Kerne gehen allerdings mit einer hohen Toxizität einher, deswegen wird zusätzlich eine spezielle Hülle als Schutzschicht verwendet. Diese Hülle schützt nicht nur den Ziel-Organismus, sondern ebenfalls die Partikel vor Degradierung durch Oxygenierung (Fratila et al. 2014). Eine weitere Rolle spielt die Applikationsart der MNP, denn sie tendieren zu einer Agglomeration, welche vor allem durch den Kontakt mit Blut und Plasmaproteinen begünstigt wird. Daher benötigt ein MNP, das intravenös appliziert werden soll, eine andere Hüllschicht, als ein MNP für lokale Injektionen. Innerhalb der Arbeitsgruppe (AG Röll) wurde bereits eine Methode zur MNP basierten Zelltherapie nach Myokardinfarkt unter Verwendung von CM etabliert. *Ottersbach et al.* (Ottersbach et al. 2018) konnten zeigen, dass bei einer Verwendung von MNP- und Magnet- basierten Transplantation, die Zellretention der transplantierten CM post MI signifikant erhöht werden konnte. Diese Methode spielt ebenfalls innerhalb dieser Arbeit eine Rolle, da mit Hilfe von MNP die Retention der transplantierten Fibroblasten erheblich gesteigert werden soll. Eine andere Möglichkeit, ist die Verwendung von MNP bei der Gentherapie mit viralen Konstrukten. Dabei werden die viralen Konstrukte direkt an die MNP gekoppelt und die Zielzellen mit diesen Komplexen unter Einwirkung eines Magnetfeldes transduziert. Diese Methode kann besonders bei schwer zu transduzierenden Zellen (z.B. Fibroblasten) oder Geweben eine entscheidende Rolle spielen. Bereits in mehreren Studien wurde eine signifikant verbesserte Transduktionseffizienz bei der Verwendung von Virus-MNP Komplexen erzielt (Hofmann et al. 2009, Trueck et al. 2012, Wenzel et al. 2012, Vosen et al. 2016). Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten MNPs sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

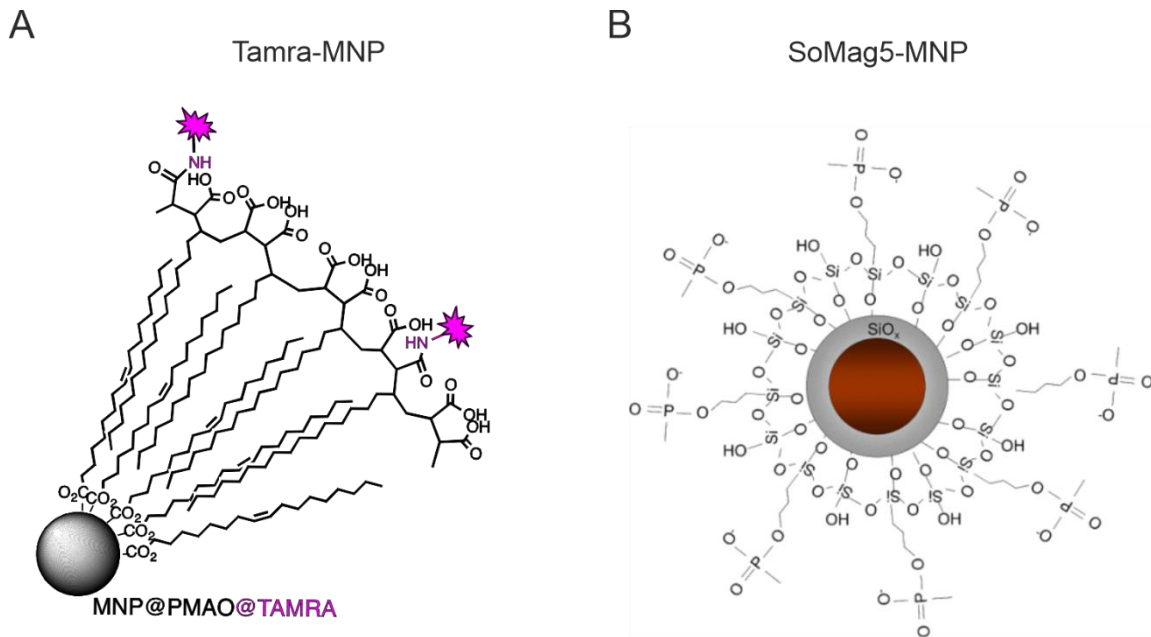


Abbildung 8: Schematische Abbildung der MNPs. (A) Tamra-MNP und (B) SoMag5 besitzen einen Magnetit-haltigen Kern und eine variable Hüllschicht (siehe Punkt 2.12 und Tabelle 9). Die Tamra-MNP können aufgrund ihrer fluorochromhaltigen Außenhülle mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden. Beide MNP-Abbildungen wurden von den jeweiligen Kooperationspartnern (siehe Material und Methoden) erstellt.

1.11 Zielsetzung

Die zelluläre Gentherapie ist nach wie vor ein Fokus der Forschung zur kardialen Regeneration nach MI. Allerdings hat es bislang keiner der biologischen therapeutischen Ansätze über Phase II und III Studien hinaus, bis zur etablierten klinischen Anwendung geschafft. Es stellt sich also die Frage, inwieweit das geschädigte Myokard überhaupt regeneriert werden kann, oder ob alternativ auch eine Modulation der entstehenden Narbe und/oder ihrer biologischen Eigenschaften (vorwiegend cFB, kollagenreich) einen alternativen experimentellen Therapieansatz darstellen könnte. Insbesondere das Targeting der kardialen Narbe und ihre Modulation, um die Inzidenz und Aufrechterhaltung von post-Infarkt Arrhythmien zu minimieren, soll in dieser Arbeit fokussiert untersucht werden. Ziel dieser Arbeit ist es, die kardialen Fibroblasten in den Vordergrund zu stellen und diese mittels Cx43-Transfers genetisch so zu verändern, dass sie zu einer verbesserten Leitfähigkeit des Infarktgebietes und damit zur Arrhythmieprävention nach MI beitragen. Da die Verwendung von AAV und Lentiviren bisher nur einen geringen Effekt auf die Transduktionseffizienz bei kardialen Fibroblasten

der Infarktnarbe zeigte, soll in dieser Arbeit der Umweg über die Transplantation von zuvor *in vitro* transduzierten eCF genommen werden. Für zukünftige therapeutische Ansätze gilt es effiziente Vektoren zu finden, welche in kurzer Zeit zu einer hohen Transduktionseffizienz von kardialen Fibroblasten führen.

Daher wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze verfolgt. 1. Die Transplantation von genetisch modifizierten kardialen Fibroblasten, als ein genereller Ansatz, um die Zusammensetzung der kardialen Narbe und auch ihre biologischen Eigenschaften zu verändern. Ein Fokus der Arbeit liegt in der stabilen Integration der kardialen Fibroblasten in die Narbe, da CM nur eine geringe Integration aufweisen. 2. Der Einsatz des MMLV, um die Narbe direkt gentherapeutisch zu modulieren.

Zum einen soll dies durch eine zellbasierte Therapie mittels Injektion von vorab mit lentiviralen Konstrukten transduzierten und mit MNP beladenen kardialen Fibroblasten erreicht werden. Die zu injizierenden Zellen sollen vorab *in vitro* genau charakterisiert werden. Dazu soll vor allem die Effizienz der lentiviralen Transduktion eruiert und die daraus resultierende Cx43 Expression bestimmt werden. Mich interessiert außerdem, ob die vermehrt eingebrachten Cx43 Gjs zu einer Veränderung des Geno- und Phänotypen der zu injizierenden Fibroblasten führt. Dazu sollen die behandelten Zellen hinsichtlich ihrer Genexpression analysiert werden. Die behandelten Mäuse werden in Kurz- (2 Wochen) - und Langzeit (8 Wochen) Studien mittels Echokardiografie und Rechtsherzkatheter-Stimulation funktionell untersucht. Anschließend soll eine umfangreiche Analyse der Gewebeproben (Proteinchemisch und -histologisch) durchgeführt werden. Besonders interessiert mich, ob kardiale Fibroblasten besser für das Einwachsen in die Narbe geeignet sind als z.B. CM. Auch der Effekt des MNP/Magnet basierten Systems soll genau untersucht werden. In diesem Zusammenhang könnte es ebenfalls interessant sein, ob evtl. negative Effekte von den zusätzlich eingebrachten kardialen Fibroblasten auf die Struktur der Narbe ausgehen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein neuer Virus, das MMLV (Ramanujam et al. 2016), generiert und *in vitro* an Fibroblasten getestet werden. Dies könnte als Vorbereitung für eine mögliche *in vivo* Anwendung, der direkten intramyokardialen Injektion als therapeutischer Ansatz, dienen. Das MMLV soll vor allem im Vergleich zu dem vorher

verwendeten Lentivirus hinsichtlich einer besseren Transduktionseffizienz an Fibroblasten untersucht werden. Dazu soll die bereits etablierte Methode des MNP/Magnet basierten Systems verwendet werden. Außerdem wird die virusbasierte Cx43 Expression in den Fibroblasten analysiert und funktionell überprüft. Als MNP wurden nach umfangreichen toxikologischen und physikalischen Studien neu designte Tamra-MNP für den ersten Teil dieser Arbeit und die bereits etablierten SoMag5 (Ottersbach et al. 2018) für den zweiten Teil dieser Arbeit verwendet.

2 Verwendete Materialien

2.1 Chemikalien und gekaufte Lösungen

Tabelle 1: Chemikalien und gekaufte Lösungen

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Accutase	SCR005	Milipore (Massachusetts, USA)
30 % Acrylamid/ Bis Lösung (19:1)	1610154	Biorad (Feldkirchen, D)
Agarose	3810.3	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Ammonium Persulfat	1610700	Biorad (Feldkirchen, D)
Ampuwa® Wasser	0575621/01	Fresenius (Bad Homburg, D)
Aqua Polymount	18606	Polysciences (Philadelphia, USA)
BCA-Protein Assay Kit (Pierce™)	23225	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
β-Mercaptoethanol	M3148	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Bouin'sche Lösung	HT10132	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Burprenorpin (Temgesic® 0,3 mg/ml)	00345928	Indivior (Berkshire, UK)
Burprenorphin (Buprenovet® sine, 0,3 mg/ml)	61025/A/11.18	Bayer (Leverkusen, D)
Calcein AM	C3100MP	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Desoxycholsäure Natriumsalz	D6750	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
DNA Größenstandard	SM0334	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
ECL Western Blotting substrate (Pierce™)	32209	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
EDTA	E9884	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
EDTA 0,5 M pH 8 Lösung	03690	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Entellan®	1.07961.1000	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)

Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	X883.2	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Eselserum	017-000-121	Jackson Immuno Research
Essigsäure	6755.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Essigsäure (1 %)	SAFAW200603	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Ethanol (70 %)	27669	Otto Fischar (Saarbrücken, D)
Ethidiumbromid	46067	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Fast green	F-9910	Fisher Scientific (Schwerte, D)
Fötales Kälberserum (FKS)	16000044	Gibco (Karlsruhe, D)
Formaldehyd-Lösung 4 %	1.00496	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Gelatine	G2500	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Gewebekleber Histoacryl®	9381104	Braun (Melsungen, D)
Glucosteril 5 %	00424585	Fresenius Kabi (Bad Homburg, D)
Isofluran IsoFlo®	50019100	Zoetis (Michigan, USA)
Isopropanol/ 2-Propanol (70 %)	27400	Otto Fischar (Saarbrücken, D)
Isopropanol/ 2-Propanol (100 %)	9866.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Hanks Balanced salt solution (HBSS ⁺⁺)	14025-050	Gibco (Karlsruhe, D)
Hoechst 33342; 1 mg/ml	B2261	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
5x Hot firepol® Taq- Polymerase	04-25-00S25	Solis BioDyne (Tartu, Estonia)
Kaliumhexacyanoferrat (II) (K ₄ Fe(CN) ₆)	244023	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Kollagenase Typ II	NC9693955	Worthington (New Jersey, USA)
Lämmli Sample buffer (2x)	1610737EDU	Biorad (Feldkirchen, D)
Lämmli Sample buffer (4x)	1610747	Biorad (Feldkirchen, D)
Methanol	8388.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Milchpulver	M203	VWR (Pennsylvania, USA)

Natriumchlorid (NaCl)	S7653	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	9356.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	11140-035	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Nonidet™ P40	74385	Merck (Darmstadt, D)
Nuclear Fast Red Solution „Kernechtrot“	60700	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
PBS Tabletten	11510546	Gibco (Karlsruhe, D)
PBS in Lösung	11503387	Gibco (Karlsruhe, D)
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Pikrinsäure	197378	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	PMSF-RO	Roche (Basel, CHE)
Precision Plus Protein Western C Standard	1610376	Biorad (Feldkirchen, D)
Prednisolon (Prednisolut®) 100 mg	14142100	Mibe (Brehna, D)
Protease Inhibitor Tabletten (Pierce™)	A32963	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
RNAprotect©	76104	Qiagen (Hilden, D)
RNase Zap™	R2020	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Running Puffer	00200307	Lonza (Basel, CHE)
Salzsäure (HCL)	4625.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Sirius red (Direkt Rot 80)	365548	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
SoMag-MNP		TU München (München, D)
Stripping Puffer	62299	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Tamra-MNP		Universität Zaragoza (Zaragoza, ES)

TaqMan™ Master-Mix	4369016	Applied Biosystems™ (Massachusetts, USA)
Tetramethyldiamin (TEMED)	T7024	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Deutschland)
Transfer Puffer	00200309	Lonza (Basel, CHE)
Trizma®Hydrochlorid	10812846001	Merck (Darmstadt, D)
Triton X-100	93418	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Trizma Base	T1503	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Trypsin/EDTA 0,05 %	25300-096	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)
Tween 20	P9416	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
Ultraschallgel „Aquasonic“	01-34	Parker Laboratories (New Jersey, USA)
Xylol	9713.2	Carl Roth (Karlsruhe, D)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Deckgläser	VWR (Darmstadt, D)
Dreiwegehahn Discofix C-3	Braun (Melsungen, D)
Filterpapier	VWR (Darmstadt, D)
Gase (Sauerstoff, Lachgas, flüssiger Stickstoff)	Linde Gas Therapeutics GmbH& Co KG (Unterschleißheim, D)
Hamilton™ 10 µl Spritze	Hamilton (Kalifornien, USA)
Isofluran Furene®	Abott GmbH& Co KG (Wiesbaden, D)
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Leukosilk®	BSN Medical GmbH (Hamburg, D)

Leukofix®	BSN Medical GmbH (Hamburg, D)
Mikro-Löffelspatel	VWR (Darmstadt, D)
Objektträger Histobond	Marienfeld (Lauda-Königshoven, D)
Omnifix Luer Lock solo Spritze (10 ml)	Braun (Melsungen, D)
Original Perfusor Leitung	Braun (Melsungen, D)
Petrischalen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen mit Filter	nerbe plus (Winsen/Luhe, D)
Schlauch für Hamilton zur Zell& Virus- Injektion (Poretex Time Pore, Polythene Tubing 30 m)	Smiths Medical International (Grasbrunn, D)
Präparationsbesteck	F.S.T (Heidelberg, D)
Prolene Nahtmaterial	Johnson& Johnson (Livington, Schottland)
PVDF Membran	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
QIAshredder Säulen	Qiagen (Hilden, Germany)
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml)	VWR (Darmstadt, D)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Vapor für Isofluran	Drägerwerk AG (Lübeck, D)
Vasofix® Safety 22G	Braun (Melsungen, D)
Zählkammer Neubauer	VWR (Darmstadt, D)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Zellkulturplatten (6well, 24well, 96well)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Zentrifugierröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)

2.3 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AxioCam MRm	Zeiss (Jena, D)
AxioObserver	Zeiss (Jena, D)
AxioVert A1	Zeiss (Jena, D)
Bioanalyzer 2100	Aligent (Boeblingen, D)
Echokardiograph	Phillips (Hamburg, D)
EPU Katheter	NuMED (New York, USA)
CO ₂ - Inkubator HERAcell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Feinwaage	Mettler Toledo (Gießen, D)
Fluoreszenzlampe ebq 100	Leica (Wetzlar, D)
Fluoreszenzlampe XBO 75	Zeiss (Jena, D)
Fluoreszenz Stereomikroskop Leica MZ 16F	Leica (Wetzlar, D)
Gefrierschränke: -20°C, -80°C	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen, D)
Gelkammern für Elektrophorese und Tank Blot	Biorad (Feldkirchen, D)
Glasperlensterilisator	F.S.T (Heidelberg, D)
Heizplatte für Mäuse	Eigene Herstellung
HERAguard Reinluftwerkbank HPH4	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	VWR (Darmstadt, D)
Horizontalschüttler	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, D)
Isolated Pulse-Stimulator Modell 2100	A-M-Systems (Washington, USA)
Kaltlichtquelle KL1500LCD	Leica (Wetzlar, D)
Konfokales Mikroskop Modell Eclipse Ti	Nikon (Tokio, Japan)
Kühlschränke: 4°C	Liebherr (Biberach an der Riss, D)

Kryotom CM3050S	Leica (Wetzlar, D)
LED Lichtquelle für Stereolupe LED3000SLI	Leica (Wetzlar, D)
Lötkolben WHS 40D	Weller (Besigheim, D)
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co KG (Schwabach, D)
Magnetplatten	Chemicell (Berlin, D)
Magnetspitzen	Eigene Herstellung
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Observer Z1	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Konfokales	Nikon (Beaverton, USA)
Mikrowelle	KOS Microwave HistoSTATION (Milestone, D)
MiniVent Type 845	Hugo Sache Elektronik, Harvard Apparatus (March, D)
NanoDrop 100 Spektrometer	Peqlab (Erlangen, D)
NanoQuant Plate	Tecan (Männedorf, Schweiz)
PCR Gerät	Biometra (Göttingen, D)
pH-Meter 765 Calimatic	Knick (Berlin, D)
Pipetten	Gilson (Limburg, D)
Pipettierhilfe	Integra Bioscience (Fernwald, D)
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Rollenmischer	Stuart über VWR (Darmstadt, D)
Spannungsgerät PowerPAC HC	Biorad (Feldkirchen, D)
Stereo Zoom Mikroskop Modell Axio Zoom V16	Zeiss (Jena, D)
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stickstoffbehälter	KGW Isotherm (Karlsruhe, D)
Stickstofftank	Tec-lab GmbH (Taunusstein, D)

TissueLyser LT	Qiagen (Hilden, D)
Ultraschallbad	Zeiss (Jena, D)
UV Lampe Zeiss Mikroskope HXP 120 V	Zeiss (Jena, D)
Vakuumpumpe mit Filter	Vacuubrand (Wertheim, D)
Vortexer	VWR (Darmstadt, D)
Wippschüttler	VWR (Darmstadt, D)
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg, D)

2.4 Software

Tabelle 4: Verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe	Adobe Inc. (San José, USA)
Axio Vision	Zeiss (Jena, D)
CorelDRAW	Corel Corporation (Ottawa, Kanada)
Cytoscape mit ClueGO App	Institute for Systems Biology (Seattle, USA)
EndNote™	Clarivate Analytics (London, GBR)
Galaxy (European Galaxy Server)	Universität Freiburg (Freiburg im Breisgau, D)
GraphPad Prism	GraphPad Software (San Diego, USA)
i-control™	Tecan (Männedorf, Switzerland)
ImageJ	NIH (Maryland, USA)
Image Lab	Biorad (Feldkirchen, D)
Labchart	ADInstruments (Dunedin, Neuseeland)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
NIS-Elements	Nikon (Tokio, Japan)
QVue	Phillips (Amsterdam, NL)
Stimulus	AG Sasse (Bonn, D)
Zen	Zeiss (Jena, D)

2100 Expert Software	Aligent (Boeblingen, D)
----------------------	-------------------------

2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Zusammensetzung von Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Agarose Gel 1 %	1 g Agarose 100 ml TAE- Puffer
Ammonium Persulfat (APS) Lösung 10 %	100 mg APS ad 1000 µl H ₂ O bidest.
CaCl ₂ Lösung	2,22 g CaCl ₂ ad 100 ml H ₂ O bidest.
Calcium- OZ Lösung	4,17 g NaCl 201,31 mg KCL 95,22 mg MgCl ₂ 900,8 mg Glukose 1,19 g Hepes 500 µl CaCl ₂ Lösung ad 500 ml H ₂ O bidest. pH 7,4
Citrat- Puffer	2,94 Na-Citrat 2,3 ml 2 M HCL ad 1 L H ₂ O bidest. pH 6,0
Einfriermedium	20 % DMSO 80 % FKS
Gelatine- Lösung (1 %)	1 g Gelatine in 100 ml PBS autoklavieren

Gelatine-Lösung (0,1 %)	1 % Gelatine- Lösung 1:10 mit PBS verdünnen
HBSS ⁺⁺	1,26 mM CaCl ₂ 5,56 mM Glukose 5,33 mM KCl 0,441 mM KH ₂ PO ₄ 137,93 mM NaCl 4,17 mM NaHCO ₃ 0,338 mM Na ₂ HPO ₄ 0,493 mM MgCl ₂ 0,407 mM MgSO ₄
Hoechst- Lösung	1 ml Hoechst 33342 999 ml PBS
Custodiol® (Kardioplegische Lösung)	15,0 mmol/l NaCl 9,0 mmol/l KCl 4,0 mmol/l MgCl ₂ (6 H ₂ O) 18,0 mmol/l Histidin HCL (H ₂ O) 2,0 mmol/l Tryptophan 30,0 mmol/l Mannitol 0,015 mmol/l Calciumchlorid (2 H ₂ O) 1,0 mmol/l Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat
Laufpuffer (Western Blot)	10x Laufpuffer-Konzentrat 1:10 in H ₂ O bidest. verdünnen
PBS	2 PBS Tabletten 1000 ml H ₂ O bidest.
Ripa Puffer	1,5 g Tris-HCL 0,3 g EDTA 4,4 g NaCl 0,5 g Desoxycholsäure Natriumsalz

	<p>0,5 g SDS</p> <p>5 g Nonidet™ P40</p> <p>ad 500 ml H₂O bidest.</p> <p>pH 7,5</p>
Ripa Puffer (für Isolationen in der Zellkultur)	<p>250 µl 1 M Tris-HCL pH 7,5</p> <p>500 µl 10 % Nonidet™ P40</p> <p>125 µl 10 % Desoxycholsäure Natriumsalz</p> <p>750 µl 1 M NaCl</p> <p>10 µl 0,5 M EDTA pH 8,0</p> <p>ad 5 ml H₂O bidest.</p> <p>Kurz vor Gebrauch zusätzlich dazu geben:</p> <p>1 µl 1 M PMSF (Serin Protease Inhibitor)</p> <p>50 µl Protease & Phosphatase Inhibitor (1x Protease Inhibitor Tablette+ 500 µl H₂O bidest.)</p>
TAE Puffer 50x	<p>242 g Trizma Base</p> <p>57,1 ml Essigsäure</p> <p>100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)</p> <p>ad 1000 ml H₂O bidest.</p>
TAE Puffer 1x	<p>20 ml TAE Puffer 50x</p> <p>980 ml H₂O bidest.</p>
TBS 10x	<p>24,2 g Trizma Base</p> <p>88 g NaCl</p> <p>ad 1000 ml H₂O bidest.</p> <p>pH 7,6</p>
TBST	<p>50 ml 10x TBS</p> <p>0,5 ml Tween 20</p> <p>449,5 ml H₂O bidest.</p>

Transferpuffer (Western Blot)	10x Transferpuffer-Konzentrat 1:10 in H ₂ O bidest. verdünnen
Trenngel 8 %	4,7 ml H ₂ O bidest. 2,7 ml 30 % Acrylamid/ Bis Lösung 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl Temed
Trenngel 12 %	3,2 ml H ₂ O bidest. 4,2 ml 30 % Acrylamid/ Bis Lösung 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 100 µl 10 % SDS 50 µl 10 % APS 5 µl Temed
Tris-Puffer 1,5 M pH 8,8	90,86 g Trizma Base ad 500 ml H ₂ O bidest. pH 8,8
Tris- Puffer 0,5 M pH 6,8	30,29 g Trizma Base ad 500 ml H ₂ O bidest. pH 6,8
Triton-X-100- Lösung	100 µl Triton-X-100 49,9 ml PBS
Sammelgel 4 %	3,1 ml H ₂ O bidest. 665 µl 30 % Acrylamid/ Bis Lösung 1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8 50 µl 10 % SDS 25 µl 10 % APS 5 µl Temed

Sammelgel 8 %	2,4 ml H ₂ O bidest. 1,33 ml 30 % Acrylamid/ Bis Lösung 1,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8 50 µl 10 % SDS 25 µl 10 % APS 5 µl Temed
SDS 10 %	10 g SDS ad 10 ml H ₂ O bidest.

2.6 Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	5067-1511	Agilent (Boeblingen, D)
BCA Protein Assay Kit	23227	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
NuGEN Trio RNA-Seq Library Kit	0357-08	NuGEN Technologies (Kalifornien, USA)
RNeasy® Plus Micro Kit	74034	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy® Plus Mini Kit	74134	Qiagen (Hilden, D)
Superscript™ VILO™ cDNA Kit	11754050	Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)
Trichrom staining Kit	ab150686	Abcam (Cambridge, UK)

2.7 Zelllinien

HEK293 Zellen

Humane embryonale 293-Zellen, bestellt bei ATCC (Virginia, USA; Bestellnr.: CRL-1573™)

NIH-3T3 Fibroblasten

Murine embryonale immortalisierte Fibroblasten, bestellt bei ATCC (ATCC (Virginia, USA; Bestellnr.: CRL-1658™).

2.8 Zellkulturmedium und Zusätze

Tabelle 7: Zellkulturmedium und Zusätze

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	12491015	Gibco (Karlsruhe, D)

2.9 Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Tabelle 8: Zusammensetzung des Zellkulturmediums

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
10 % DMEM	Kultivierung von HEK293, NIH-3T3 Fibroblasten und primären embryonalen kardialen Fibroblasten	10 % (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol

2.10 Versuchstiere

Als Spendertiere für die Gewinnung von embryonalen kardialen Fibroblasten wurden Wildtyp (WT) Weibchen des Auszuchtstammes CD1 verwendet. Für die Transplantationsversuche wurden 10-12 Wochen alte CD1-WT Weibchen verwendet. Alle Versuchstiere wurden über Charles River (Sulzfeld, D) bezogen. Die verwendeten Mäuse wurden im Haus für experimentelle Therapie, Bonn, Deutschland geboren und gehalten. Sie hatten Zugang zu Standard Nager Futter (Ssniff® R/M-H, autoklavierbar, V1534-300, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, D) sowie autoklaviertem Wasser ad libitum. Das Einstreu bestand aus Espenstreu (Abedd Espen CLASSIC, H0234-400, LAB & VET Service GmbH, Abedd, Wien, Österreich). Als Enrichment standen den Mäusen pro

Woche ein Nestlet (14010, Plexx B.V, Elst, Niederlande) zum Nestbau und postoperativ ein Maushaus (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, D) als Rückzugsort zur Verfügung. In den Haltungsräumen herrschte eine standardisierte Lufttemperatur von 22 °C mit 50 – 70 % Luftfeuchte. Die Mäuse (2 bis 5 Mäuse pro Käfig) wurden in IVC-Systemen gehalten (Tecniplast: Blueline, Greenline) und 1x wöchentlich in frische Käfige umgesetzt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz), NRW, Deutschland genehmigt und über den Tierversuchsantrag mit dem Aktenzeichen: 81.02.04.2018.A120 abgedeckt.

2.11 Retrovirale Vektoren

2.11.1 Lentivirale Vektoren

Alle lentiviralen Konstrukte (Abb. 9) wurden von Prof. Alexander Pfeifer (Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Bonn) und seinen Mitarbeitern designed und hergestellt. Bei beiden lentiviralen Vektoren wird das Reportergen eGFP unter Kontrolle des ubiquitären CMV Promotors exprimiert. Beim Cx43- Lentivirus ist das Cx43-Gen mit dem Reportergen eGFP über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES-Sequenz, Abb. 9B) verbunden, sodass zwei einzelne Proteine exprimiert werden.

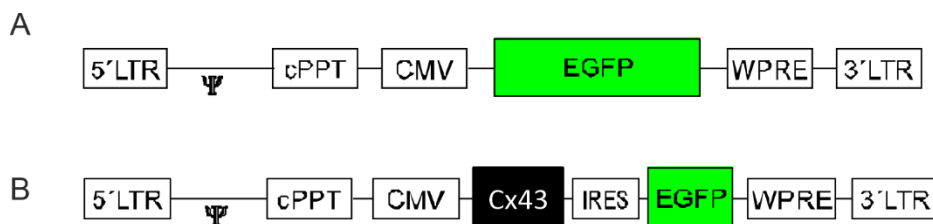


Abbildung 9: Lentivirale Vektoren. (A) eGFP Kontrollvirus; (B) Cx43-Zielvirus.

2.11.2 Muriner Moloney Leukämie Virus (MMLV)

Das für den MMLV-Cx43 verwendete Cx43-GSGP2A-mCherry- Konstrukt (siehe Abb. 10) wurde von Pia Niemann und Dr. Caroline Geisen (Institut für Physiologie I, Universitätsklinikum Bonn) kloniert, welches ebenfalls für die Generierung einer transgenen Mauslinie verwendet wurde. Alle MMLV-Konstrukte wurden schließlich von

Prof. Stefan Engelhardt (Direktor des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, TU München) hergestellt.

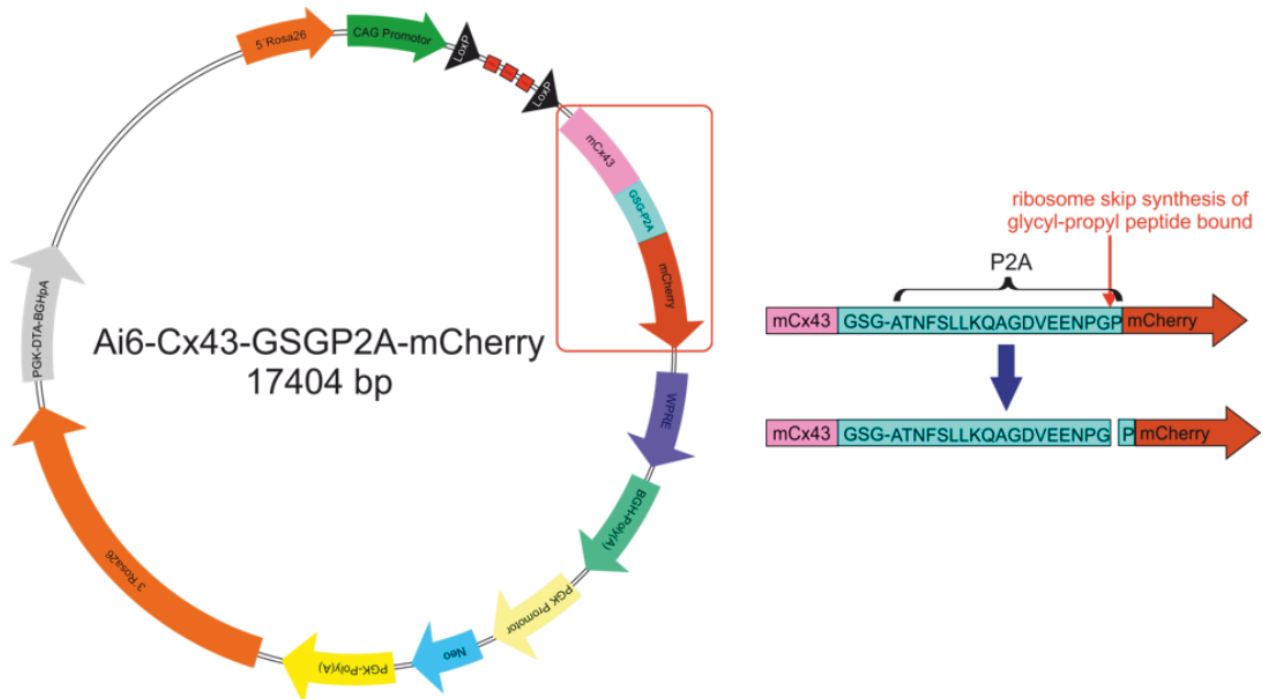


Abbildung 10: Vektorkarte des Ai6-Cx43-GSGP2A-mCherry Konstruktes. Erstellt von P. Niemann (Niemann et al. 2022).

Beide MMLV-Konstrukte (Abb. 11) exprimieren Ziel- und Reportergene über die viruseigenen CMV-Promotoren. Beim MMLV-Cx43 (Abb. 11B) ist das Cx43-Gen über ein selbst-teilendes P2A Peptid an das Reportergen mCherry gebunden. An dieser Stelle erfolgt ein Stopp in der Translation, was schließlich zur Entstehung zwei einzelner Proteine führt.

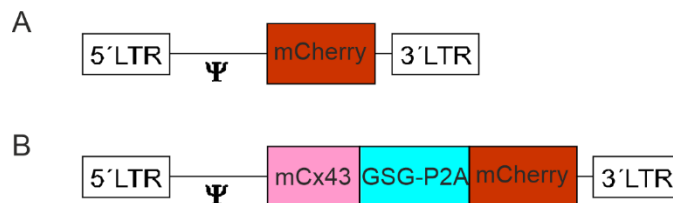


Abbildung 11: MMLV Vektoren. (A) MMLV-mCherry als Kontrollvirus und (B) Cx43-MMLV als Zielvirus.

2.12 Magnetische Nanopartikel (MNP)

Die für die eCF Transplantation verwendeten Tamra MNP wurden von Dr. Raluca Fratila und Dr. JM De la Fuente (Aragon Materials Science Institute, ICMA Zaragoza, Spain)

hergestellt. Die SoMag5-MNP wurden von Dr. Olga Mykhaylyk (Institut für Experimentelle Onkologie, TU München) hergestellt. Beide MNPs wurden hinsichtlich ihrer Toxizität und ihres magnetischen Potentials im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit von Kevin Wagner in unserer Arbeitsgruppe (AG Röll) vorab charakterisiert. Die Kerne beider MNP bestehen aus Magnetit und weisen eine geringe Größe auf. Die Hüllschicht der Tamra MNP besteht, anders als die der SoMag5, aus Poly-maleinsäureanhydrid-alt-octadecen (PMAO), welches zusätzlich an einen herkömmlichen Fluoreszenzfarbstoff (5-carboxyltetramethylrhodamin „Tamra“) gekoppelt ist. Dieser Farbstoff ermöglicht eine simple Detektion der Tamra MNP im Cy3 Spektrum (Absorption: 555 nm, Emission: 580 nm) mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Stepien et al. 2018). Beide MNP weisen eine hohe Magnetisierung nach Anlegen eines magnetischen Feldes auf. Die wichtigsten physikalischen Eigenschaften der beiden MNP sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Physikalische Eigenschaften der MNP

Name	Kern durchmesser [nm]	Partikelgröße [nm]	Hüllschicht	Magetisches Moment Emu/g	Elektrokinetisches Potential in H ₂ O [mV]	Publikationen
Tamra	12	22	Poly-maleinsäureanhydrid-alt-octadecen (PMAO) gekoppelt mit 5-carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)	84	-35.2 ± 0.67	<i>Stepien et al., 2018</i> (Stepien et al. 2018)
SoMag5	6,8	8,7	Siliziumoxid mit Phosphonatgruppen	94	-38 ± 2	<i>Trueck et al., 2012</i> (Trueck et al. 2012) <i>Wenzel et al., 2012</i> (Wenzel et al. 2012) <i>Vosen et al., 2016</i> (Vosen et al. 2016) <i>Heun et al., 2017</i> (Heun et al. 2017) <i>Ottersbach et al., 2018</i> (Ottersbach et al. 2018)

2.13 Verwendete Magnete

Je nach Experiment wurden verschiedene Magnete für die Virus/MNP basierte Transduktion verwendet (Abb. 12). Alle Magnete wurden von der feinmechanischen Werkstatt am Institut für Physiologie I der Universität Bonn hergestellt.

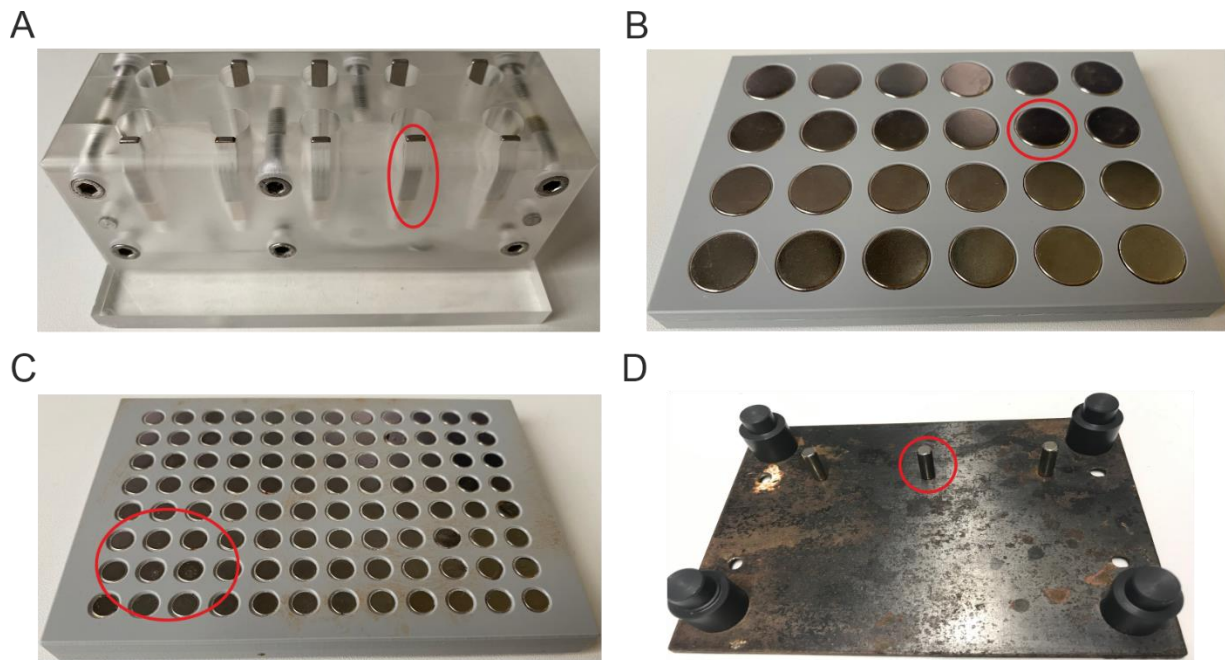


Abbildung 12: Verwendete Magnete für die Virus/MNP basierte Transduktion. (A) Magnetständer für 1,5 ml Reaktionsgefäße zur Selektion MNP-beladener und magnetischer Zellen. (B) Magnetplatte mit 24 Magneten, die unter einer 24well Zellkulturplatte positioniert wird. (C) Magnetplatte mit 96 Magneten, die unter einer 96well- oder 6well Zellkulturplatte positioniert wird. (D) Eisenplatte mit Halterung für eine 6well Zellkulturplatte für die lokale Transduktion mittels Stabmagneten. Magnete= rot eingezeichnetes Areal in jedem Bild.

2.14 Verwendete Primer

Alle Primer wurden im Institut für Physiologie I (Universitätsklinikum Bonn, D) designed und bei Eurofins genomics (Ebersberg, D) bestellt.

Tabelle 10: Primer Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz
Ai6-Cx43-fw2	CTTCTTCAAGGGCGTTAAGG
Ai6-Cx43-fw3	ATCGTGGATCAGCGACCTTC
mcherry rev	TCAGCTTCAGCCTCTGCTTGATCT

2.15 Verwendete TaqMan™ Sonden

Tabelle 11: TaqMan™ Sonden

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
eGFP FAM	Selbst designed	Thermo Fisher Scientific
Cx43 FAM	Selbst designed	Thermo Fisher Scientific
Gata4 FAM	Mm01310448_m1	Thermo Fisher Scientific
Tnnt2 FAM	Mm00441920_m1	Thermo Fisher Scientific
Hspg2 FAM	Mm01181173_g1	Thermo Fisher Scientific
Atp2a2 FAM	Mm01201431_m1	Thermo Fisher Scientific
Caspase1 FAM	Mm00438023_m1	Thermo Fisher Scientific
HPRT VIC	Mm03024075_m1	Thermo Fisher Scientific

2.16 Antikörper

2.16.1 Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Tabelle 12: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
α-Aktinin	Maus IgG1	1:400	A7811	Sigma
α-smooth-muscle actin	Maus IgG2a	1:800	A5228	Sigma
CD31/ Pecam	Ratte IgG2a,κ	1:400	550274	BD Biosciences

CD45	Ratte IgG	1:800	05-1416	Millipore
Cx43	Kaninchen IgG	1:800		Selbsthergestellt
eGFP	Ziege IgG	1:200	sc-5385	Santa Cruz
Periostin	Kaninchen IgG	1:300	NBP1-30042	Novusbiologicals
P2A	Maus IgG1	1:700	NBP2-59627	Novusbiologicals
TGFb1	Kaninchen IgG	1:200	ab92486	Abcam
Vimentin	Huhn IgG	1:1000	AB5733	Millipore

2.16.2 Primäre Antikörper zur Western Blot Detektion

Tabelle 13: Primäre Antikörper zur Western Blot Detektion

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
α -smooth-muscle actin	Maus	1:1000	A5228	Sigma
β -Actin HRP	Maus IgG1	1:10000	A3854	Sigma
Cx43	Kaninchen IgG	1:3000		Selbsthergestellt
GAPDH-HRP		1:3000	69295	Sigma
GAPDH-555	Maus IgG1	1:3000	MA5-15738-A55	Invitrogen
GFP (JL-18)	Maus IgG2a	1:1000	632381	Clonetech
Periostin	Kaninchen	1:1000	NBP1-30042	Novusbiologicals
P2A	Maus IgG1	1:700	NBP2-59627	Novusbiologicals
RFP	Kaninchen IgG	1:2000	ab62341	Abcam
TGFb1	Kaninchen IgG	1:500	ab92486	Abcam
Vimentin	Huhn IgG	1:1000	5741S	Cell Signaling

2.16.3 Sekundäre Antikörper

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper

Spezies	Fluorochrom	Isotyp	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
Huhn IgG	Cy5	Esel	1:400 (IHC) 1:3000 (WB)	703-175-155	Jackson Immuno Research
Kaninchen IgG	Cy2	Esel	1:3000 (WB)	711-225-152	Jackson Immuno Research
Kaninchen IgG	Cy5	Esel	1:400 (IHC)	711-175-152	Jackson Immuno Research
Maus IgG	HRP	Esel	1:10000 (WB)	715-035-150	Jackson Immuno Research
Maus IgG	Cy5	Esel	1:3000 (WB)	715-175-150	Jackson Immuno Research
Maus IgG1	Cy5	Ziege	1:400 (IHC)	115-605-205	Jackson Immuno Research
Maus IgG2a	Cy5	Esel	1:400 (IHC) 1:3000 (WB)	115-605-206	Jackson Immuno Research
Ratte IgG	Cy5	Esel	1:400 (IHC)	712-175-153	Jackson Immuno Research
Streptactin	HRP	Streptomyces avidinii	1:3000	1610381	Biorad
Ziege IgG	Cy2	Esel	1:200 (IHC)	705-225-147	Jackson Immuno Research

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung primärer Zellen, als auch der Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit). Die Medien und Reagenzien wurden vor Behandlung der Zellen auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.

3.1.1 Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung von Zelllinien, wurden die Zellen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert und bei Bedarf für 2 - 3 min in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10 ml frischem Medium (Zusammensetzung vgl. 2.8.1) vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums wurde das Zellpellet erneut in 10 ml Medium gelöst und auf einer 75 cm² Flasche ausgesät. Am übernächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 80 % in 75 cm² Flaschen kultiviert. Zur Passagierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Zur Ablösung der adhärennten Zellen wurde diese anschließend mit 3 ml Trypsin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 6 ml Medium aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden 2,0x10⁶ Zellen auf eine 75 cm² ausgesät. Für weiterführende Versuche wurden die Zellen auf 6well-, 24well- oder 96well Zellkulturplatten mit oder ohne Deckglässchen ausgesät. Die Deckglässchen wurden vorab mit 0,1 % Gelatine beschichtet.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Zunächst wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.1.2 abgelöst und deren Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 5x10⁵ Zellen/ml in 1 ml Einfriermedium (500 µl DMSO und 500 µl FKS) in Kryoröhrchen (1 ml Aliquots) in speziellen mit Isopropanol gefüllten Behältern bei

-80 °C eingefroren. Nach zwei Tagen wurden die gefrorenen Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff transferiert.

3.1.4 Gewinnung und Kultivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (eCF)

Zur Isolierung der eCF's wurden Mausembryonen im Alter von E12,5-13,5, nach der Verpaarung von CD1 WT, verwendet. Die schwangeren Weibchen wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und die Bauchdecke mit 70 % Ethanol desinfiziert (30 sec Einwirkzeit). Die Mäuse wurden anschließend auf dem Rücken liegend auf einer Styropor Unterlage mit Kanülen fixiert. Die Abdominalhöhle wurde mittels einer medialen Laparatomie eröffnet und die eingelagerten Embryonen anhand des distalen Endes des Uterushorns aus der Bauchhöhle entfernt. Die Embryonen wurden sofort in eisgekühlte PBS-Lösung transferiert. Die Trennung der Embryonen von der Plazenta und der Fruchtblase erfolgte unter der Stereolupe. Anschließend wurde der Thorax der Embryonen mit Hilfe von zwei Pinzetten eröffnet und das Herz freipräpariert. Die Herzen wurden in einer Schale mit eisgekühlter PBS-Lösung gelagert. Jeweils 6-8 Herzen wurden in ein Reaktionsgefäß mit Kollagenase II Lösung (1 mg/ml) überführt und mit einer Federschere zerkleinert. Die Herzen wurden anschließend bei 37 °C und 400 rpm für 45 min auf einem Schüttler inkubiert. Jeweils nach 15 min wurde die Suspension vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Ab- Pipettieren resuspendiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Suspension bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 3 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde zunächst in 1 ml Medium (Zusammensetzung vgl. 2.8.1) resuspendiert und anschließend wurden 3-4 ml Zellsuspension aus verschiedenen Reaktionsgefäßen in 10 ml Medium zusammengeführt. Zur Entfernung und Neutralisierung der Kollagenase II Lösung wurde die Zellsuspension erneut für 5 min bei Raumtemperatur und 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und auf eine 75 cm² Flasche (mit 0,1 % Gelatine beschichtet) ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer- Zählkammer bestimmt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen erneut passagiert (vgl. 3.1.2). Nach 7 Tagen wurden die Zellen, wie in 3.1.2 beschrieben, abgelöst und für die weiteren Versuche auf 6well-, 24well- oder 96well Zellkulturplatten mit oder ohne Deckgläschen ausgesät. Die Deckgläschen wurden vorab mit 0,1 %

Gelatine beschichtet.

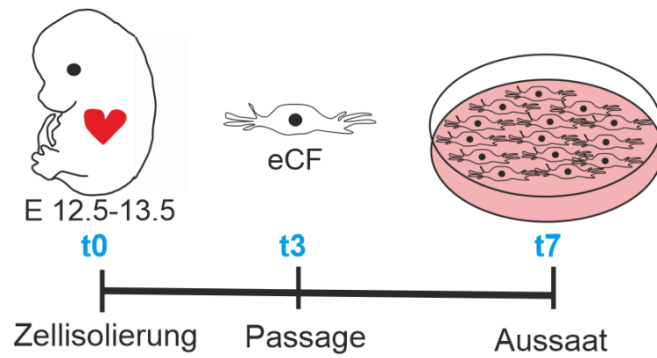


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gewinnung und Kultivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (eCF).

3.1.5 MNP-Beladung der eCF für die Transplantationsversuche

Die Beladung der Zellen mit MNP erfolgte ohne Verwendung eines Magneten. Die benötigte Menge an MNP's wurde in das Medium der Zellen gegeben und über Nacht inkubiert.

3.1.6 Bestimmung der Magnetisierungseffizienz verschiedener MNPs

Das Magnetisierungspotential von Fibroblasten bei Beladung mit verschiedenen MNPs wurde mit Hilfe eines Magnetständers (siehe Abb. 12A) bestimmt. Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ /well 3T3 Fibroblasten auf eine 6-well Platte ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Beladung der Zellen mit verschiedenen MNPs (SoMag und Tamra, in zwei Konzentrationen) durch Zugabe ins Zellkulturmedium und anschließender Inkubation über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde zunächst das Medium abgesaugt und durch 500 μ l Trypsin ersetzt, um die Zellen abzulösen. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 μ l Medium abgestoppt, die Gesamtzellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt und die Zellen mit Hilfe einer Pipette abgelöst und aufgenommen. Die abgelösten Zellen wurden langsam in das im Magnetständer befindliche Reaktionsgefäß pipettiert. Die nicht magnetisierten Zellen wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgesaugt. Die magnetisierten Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml Medium am Rand abgelöst und deren Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Das Magnetisierungspotential (in %) wurde anschließend wie folgt bestimmt:

$$\frac{\text{Anzahl magnetisierter Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} * 100$$

3.1.7 Transduktion der Zellen mit Virus/MNP Komplexen

3.1.7.1 Globale Transduktion von kardialen Fibroblasten mit Virus/MNP Komplexen

Um eine homogene Virus Expression in kardialen Fibroblasten zu erreichen, wurden diese mit Hilfe von Virus/MNP Komplexen und einer Magnetplatte (siehe Abb. 12B) transduziert. Dazu wurden $2,0 \times 10^4$ Zellen/well auf eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete 24well Platte ausgesät (für histologische Zwecke wurden die Zellen auf ein mit 0,1 % Gelatine

beschichtetes Glasplättchen ausgesät). Am darauffolgenden Tag wurde zunächst die Kopplungslösung mit einem Gesamtvolumen von 10 µl/well aus Virus (Lentivirus= MOI 5; MMLV= 250 VG/Zelle) und MNP (500 fg/VP oder VG) in 10 µl HBSS⁺⁺ angesetzt. Die Kopplung der Komplexe erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Medium der Zellen abgesaugt und durch 300 µl HBSS ersetzt. In jedes well wurden zusätzlich 10 µl des Kopplungsansatzes zugegeben und die Zellkulturplatte auf der Magnetplatte platziert. Die Inkubation der Virus/MNP Komplexe erfolgte schließlich für 30 min bei 37°C in einem Inkubator (siehe Punkt 3.1 für Details) und auf einem Schüttler bei 50 rpm. Nach erfolgter Inkubation wurde der Kopplungsansatz abgesaugt und 500 µl frisches Medium in jedes well gegeben. Für eine Effizienz-Bestimmung wurde der abgesaugte Kopplungsansatz auf eine weitere 24- well Platte mit Fibroblasten gegeben und erneut wie oben beschrieben inkubiert. Beide Platten wurden für drei weitere Tage in den Inkubator überführt und die Zellen anschließend fixiert (für 20 min in 4 % Paraformaldehyd) oder die Proteine isoliert (vgl. 3.6.1). Für die Bestimmung der Transduktionseffizienz der einzelnen Viren wurden die Zellen auf den Glasplättchen für 10 min bei RT mit 1:1000 Hoechstlösung (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) inkubiert und anschließend wässrig eingedeckt. Die Transduktionseffizienz der verschiedenen Viren wurde anschließend wie folgt bestimmt:

1) Lentivirus

$$\text{Transduktionseffizienz Lentivirus [\%]} = \frac{\text{Anzahl eGFP}^+ \text{ Zellen}}{\text{Anzahl Zellkerne}} * 100$$

2) MMLV

$$\text{Transduktionseffizienz MMLV [\%]} = \frac{\text{Anzahl mcherry}^+ \text{ Zellen}}{\text{Anzahl Zellkerne}} * 100$$

3.1.7.2 Lokale Transduktion von kardialen Fibroblasten mit Virus/MNP Komplexen

Die lokale Transduktion von kardialen Fibroblasten *in vitro* mit Hilfe von Virus/MNP Komplexen diente vor allem als Vorversuch zur intramyokardiale Injektion von Virus/MNP Komplexen *in vivo*. Hierbei wurde eine Halterung mit kleinen Stabmagneten (Durchmesser= 5 mm, 1,3 Tesla) verwendet (siehe Abb. 12D). Die ersten Versuche zur lokalen Transduktion wurden zunächst nur mit MNP in verschiedenen Eisen-

Konzentrationen (0,65 µg, 0,8 µg, 1,0 µg, 1,3 µg) durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine magnetische Anziehung vorliegt. Anschließend wurde mit den verschiedenen Viren und Zellen weitergearbeitet. Dazu wurden $2,0 \times 10^5$ Zellen/well auf eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete 6well Platte ausgesät. Die Transduktion erfolgte am darauffolgenden Tag, sodass zunächst die Kopplungslösung angesetzt wurde. Hierbei wurde die Virus- (Lentivirus: MOI 5; MMLV: 250 VG/Zelle) und MNP-Menge (500 fg/VP oder VG) um das 36-fache der Zellzahl reduziert (Oberfläche eines wells: 900 mm^2 vs. Oberfläche des Magneten: 25 mm^2) und ad. 50 µl HBSS⁺⁺ dazu gegeben. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 1500 µl HBSS ersetzt. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl/well des Kopplungsansatzes und die Platzierung der 6well Platte in einer Halterung über den Magnetspitzen (siehe Abb. 12). Die Transduktion erfolgte schließlich auf einem Schüttler bei 50 rpm in einem Inkubator für 30 min. Anschließend wurde die Kopplungslösung abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte drei Tage nach Transduktion und wie unter 3.1.7.1 beschrieben.

3.1.8 Bestimmung der Funktionalität von Gap junctions

Die Funktionalität von Gap junctions bei einer Überexpression von Cx43 durch Transduktion wurde mit Hilfe der FRAP (**F**luorescent **R**ecovery **A**fter **P**hoto**b**leaching) Methode (Abb. 14) ermittelt. Dazu wurden $8,0 \times 10^4$ 3T3 Fibroblasten/well auf 22x22 mm Deckgläschen (mit 0,1 % Gelatine beschichtet) einer 6well Platte ausgesät. Bei dieser Methode ist es wichtig, dass die Zellen in einem Monolayer wachsen und nicht zu dicht ausgesät werden, da sonst das Bleichen einer einzigen Zelle erschwert wird. Nach 24 Stunden erfolgte die Transduktion mittels MMLV-SoMag-Komplexen. Dazu wurde zunächst die Kopplung der Komplexe angesetzt (250 VG MMLV-Cx43 oder MMLV-mcherry und 500 fg Fe SoMag in 30 µl HBSS⁺⁺) und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Dann wurde das Zellkulturmedium durch 3 ml HBSS⁺⁺ ersetzt und 10 µl des Kopplungsansatzes dazugegeben. Die anschließende Transduktion erfolgte mit Hilfe einer Magnetplatte (96er Platte, Siehe Abb. 12C) für 30 min bei 37 °C und 50 rpm in einer 96er Platte. Anschließend wurden die Komplexe abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Medium versorgt. Untersuchung der Funktionalität der Gap junctions erfolgte drei Tage nach der Transduktion. Dazu wurden die Zellen mit 0,38 µM eines Fluorenzfarbstoffes (Calcein AM) markiert (Inkubation bei 37 °C für 20 min in Zellkulturmedium). Mit Hilfe des

konfokalen Mikroskops (40x Objektiv, CFI Apo Lambda S LWD 40XWI, NA 1,25) wurde schließlich das FRAP-Experiment durchgeführt. Dazu wurde ein Zellcluster mit transduzierten Fibroblasten (= *Regions of interest* „ROIs“) anhand ihrer mCherry Fluoreszenz aufgesucht und deren basale Fluoreszenzintensität aufgenommen. Zusätzlich wurde eine etwas entfernt liegende Zelle als Referenzzelle ausgewählt. Das Bleichen erfolgte mit einem 561 nm Laser für 5 s bei 2,5 mW. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der ROIs jede 15 s für maximal 10 min gemessen und Bilder aufgenommen. Die Intensitäten wurden schließlich in Werte zwischen 1 (Intensität vor des Bleichvorgangs, basale Fluoreszenzintensität) und 0 (Intensität unmittelbar nach dem Bleichvorgang) umgerechnet.

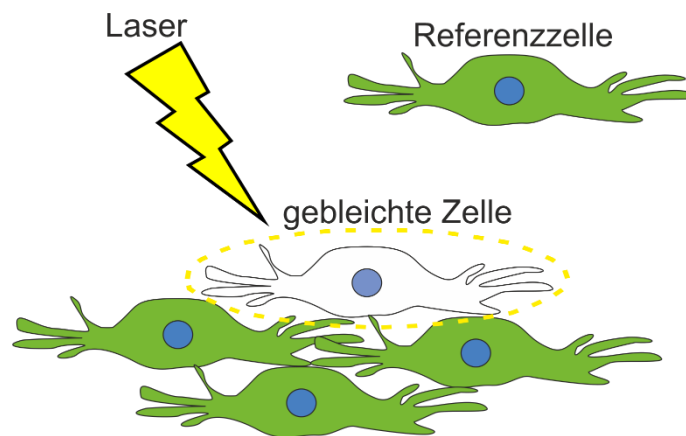


Abbildung 14: Schematische Darstellung des FRAP Experiments.

3.1.9 Vorbereitung der Primärzellen (eCF) für die intramyokardiale Injektion

Für die Zelltransplantation wurden $1,0 \times 10^6$ eCF 7 Tage nach der Isolation (vgl. 3.1.4) auf 6well Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen über Nacht mit den lentiviralen Komplexen (MOI= 5) durch Zugabe dieser in das Zellkulturmedium transduziert. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium gewechselt um verbliebene Viruspartikel zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden später mit der benötigten Menge MNPs (25 pg Fe/ Zelle) über Nacht beladen. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Gewinnung der Zellen. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen wurde 1 ml Accutase auf die Zellen gegeben und für max. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Da es sich bei den Versuchen um bereits seit 11 Tagen kultivierte Fibroblasten handelt, war eine relativ lange Inkubationsdauer mit Accutase notwendig, da sich die Zellen nur schwer ablösen ließen. Die abgelösten Zellen wurden in 4 ml Medium aufgenommen, mit einer Neubauer Zählkammer gezählt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Danach folgten zwei Waschschrte mit PBS. Für die Injektion wurden $2,0 \times 10^5$ Zellen in 5 μ l Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gelöst.

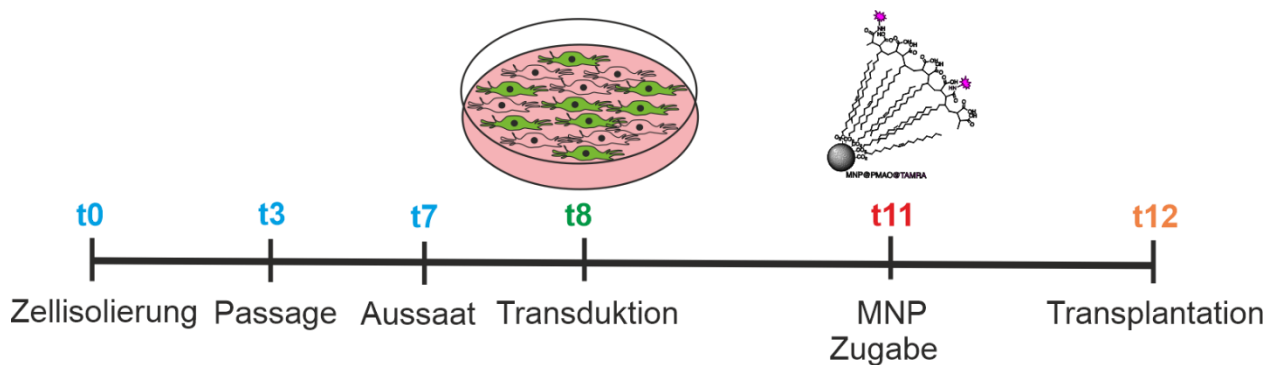


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Vorbereitung der eCF für die intramyokardiale Transplantation in die Infarkttnarbe.

3.2 Operative Techniken

3.2.1 Kryoläsion als myokardiales Infarktmodell

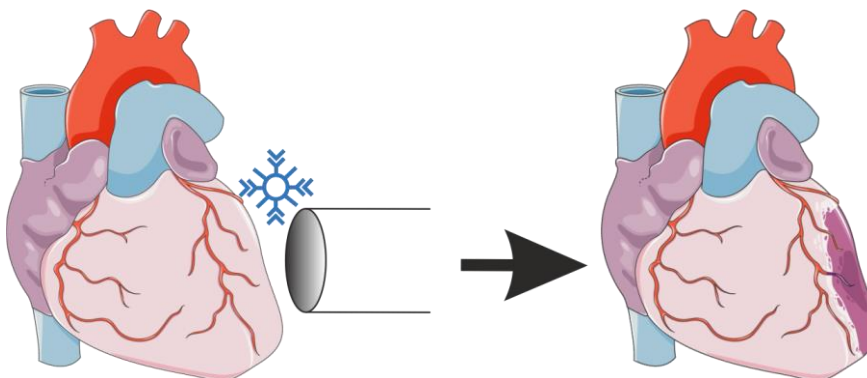


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Kryoläsion. Generierung einer Kryoläsion mittels einem gefrorenem Kupferstempels. Grundbausteine dieser Abbildung wurden verwendet von <https://smart.servier.com/>.

Beschreibung des operativen Vorgangs: Bereits 30 min vor Beginn des operativen Eingriffs, wurden die Tiere gewogen und 0,1 mg/kg Burprenorphin s.c. als Analgetikum

injiziert. Die Tiere wurden inhalativ in einer Box mit einem Narkose-Gasgemisch aus 0,8 l/min Sauerstoff, 0,5 l/min Lachgas und 5 Vol % Isofluran betäubt. Sobald die Tiere eine ausreichende Narkosetiefe (verlangsamte Atmung) erreicht hatten, wurden sie aus der Box genommen und endotracheal intubiert. Als Tubus diente eine 22 G Vasofix Venenverweilknüle. Die Tiere wurden anschließend in Rückenlage auf einer Heizplatte (37 °C) fixiert, und mit dem Tubus an einen Kleintierrespirator (Minivent) angeschlossen. Die Beatmungsfrequenz betrug 180-200 Züge pro Minute mit einem Atemzugvolumen von 200-300 µl. Intraoperativ wurde die Isoflurankonzentration auf 1-2 Vol % reduziert und die Lachgas Zufuhr bereits vor Eröffnung des Thorax beendet. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung, durch den fehlenden Lidreflex während der Narkose, wurde Augensalbe auf die Augen der Tiere gegeben. Bevor mit dem ersten Hautschnitt begonnen wurde, wurde die ausreichende Tiefe der Narkose durch das Aussetzen der Reflexe bestimmt. Hierbei spielte der sog. Zwischenzehenreflex die größte Rolle, da sein Aussetzen ein Hinweis auf das Toleranzstadium in der Narkose ist. Alle operativen Eingriffe wurden im narkotischen Toleranzstadium vorgenommen. Unter einem Stereomikroskop erfolgte nach Haarentfernung mit einem Einmalrasierer und Hautdesinfektion mit 70 % Ethanol eine linkslaterale Thorakotomie. Das verwendete OP-Besteck wurde vorab zur Sterilisation autoklaviert und kurz vor Benutzung für 30 s in einen 250 °C heißen Glasperlensterilisator gestellt. Zunächst wurde ein 1,5 cm langer Hautschnitt vom mittleren zum distalen Thoraxdrittel vorgenommen und beide Brustmuskelschichten mit einer Schere durchtrennt. Die linke Thoraxhöhle wurde zwischen dem 3. und 4. Interkostalraum durch stumpfe Präparation mit einer Pinzette eröffnet und mittels eines Thoraxspreizers geweitet, sodass unmittelbar der Zugang zum linken Ventrikel freigelegt wurde. Nach Entfernen des Perikards, erfolgte die Induktion des Infarktes. Für die Induktion eines Kryoinfarktes (Abb. 16 und 17), wurde ein in flüssigem Stickstoff (ca. -196 °C) vorgekühlter Kupferstempel (Durchmesser: 3,5 mm) dreimal für 15 s auf die linksventrikuläre Vorder- Seitenwand gesetzt (Abb. 17A,B). Das entstandene gefrorene Infarktareal war direkt vom gesunden Myokard unterscheidbar (Abb. 17C). Anschließend wurde der Thorax mit einer fortlaufenden Naht (6,0 Prolene Faden) in 3 Schichten chirurgisch vernäht. Zunächst wurde die Rippenmuskulatur nach Einlage einer Thoraxdrainage (22 G Venenverweilkanüle) verschlossen. Danach wurden die Brustmuskelschichten und die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Durch den

entstandenen Unterdruck in der Thoraxdrainage, wurde die intrathorakal verbliebende Luft und Restflüssigkeit entfernt. Die Isofluran-Zufuhr wurde beendet, sodass die Tiere nur mit reinem Sauerstoff versorgt wurden. Nach Einsetzen der Spontan-Atmung wurden die Tiere extubiert und die Thoraxdrainage luftdicht entfernt. Die Tiere wurden anschließend unter einer Wärmelampe in einem Käfig überwacht und danach wieder in den Tierstall gebracht. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere zweimal täglich 0,1 mg/kg s.c. Burprenorphin und 1 mg/kg oral über Nacht im Trinkwasser für drei Tage.

3.2.2 Intramyokardiale Injektion mit und ohne Magnetapplikation

Aufgrund der geringen Größe des murinen Herzens (Durchmesser ca. 10 mm längs und ca. 4 mm transversal) (Gargiulo et al. 2012) ist die Volumenaufnahme, nach langjähriger Erfahrung der Arbeitsgruppe bei einer intramyokardialen Injektion auf 5 μ l begrenzt. In diesem Volumen wurden die zu injizierenden Zellen verdünnt und injiziert. Für die Applikation wurde eine Hamilton-Spritze mit einem Fassungsvermögen von 10 μ l verwendet. Diese wurde über einen Polyurethanschlauch mit einer 29 G Nadel (bei Zellinjektionen) verbunden. Das System wurde mit 70 % Ethanol gespült, mit PBS gefüllt und vor Aufnahme der Zellen oder Virus/MNP Komplexe mit 1 μ l Raumluft gefüllt um den Kontakt zur PBS Lösung zu vermeiden und eine Verdünnung zu verhindern.

Transplantation von MNP beladenen transduzierten Zellen: Für die Zellinjektion wurde unmittelbar nach Induktion des Infarktes ein Stabmagnet (Durchmesser = 5 mm, 1,3 Tesla) mit einem Abstand von 5 mm über der Läsion positioniert. Das Herz wurde mit einem antimagnetischen Löffel positioniert und mit Hilfe des Injektionssystems wurden $2,0 \times 10^5$ eCF (gelöst in 10% DMEM Medium) injiziert (siehe Abb. 17). Der Magnet befand sich während Injektion und für weitere 10 min über dem Herzen. Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurden in der Vergangenheit zwei weitere Zeitpunkt (5 min und 30 min) untersucht, wobei nach 5 min eine schlechtere Retention der Zellen zu detektieren war und nach 30 min keine signifikant bessere Zellretention (Ottersbach et al. 2018). Nach 10 min wurde der Magnet entfernt und der Thorax wie unter 3.2.1 beschrieben verschlossen.

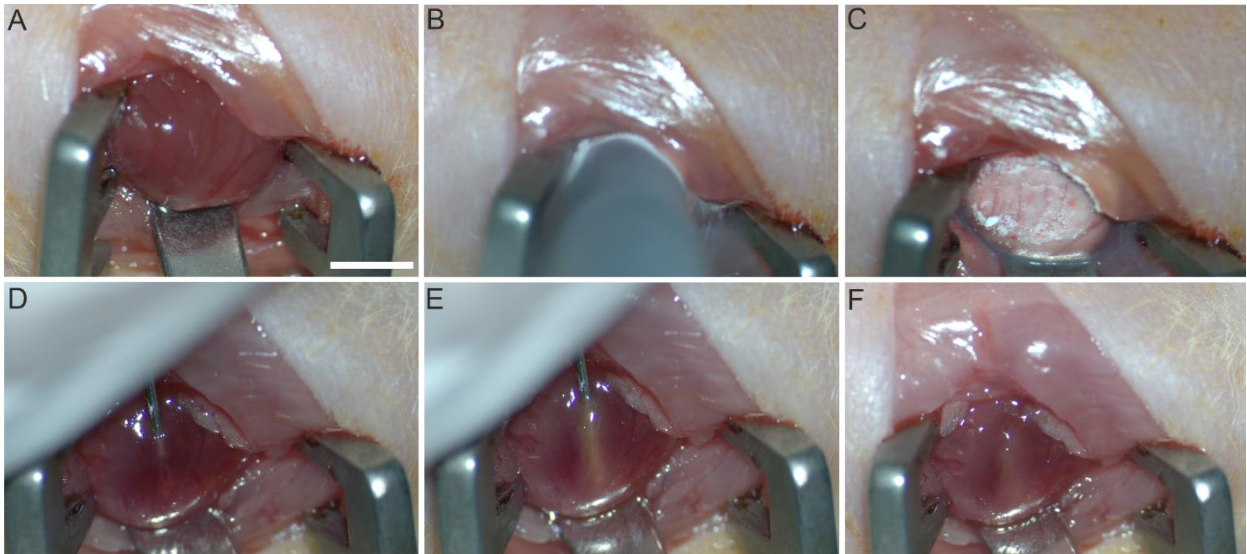


Abbildung 17: Intramyokardiale Injektion von MNP beladenen transduzierten Zellen. (A) linkslaterale Thorakotomie mit Sicht auf den linken Ventrikel nach Entfernung des Perikards. (B) Generierung der Kryoläsion mittels Aufdrücken eines vorgekühlten Kupfstempels (Durchmesser = 3,5 mm) für 3x 15 s auf die linksventrikuläre Vorder-Seitenwand. (C) Gefrorene Kryoläsion unmittelbar nach Entfernung des Kupfstempels. (D) Positionierung der 29G Nadel für die intramyokardiale Injektion. (E) Intramyokardiale Injektion von 5 µl der behandelten Zellen (helle Färbung der Kryoläsion). (F) Die behandelten injizierten Zellen unmittelbar nach Injektion. Maßstabsbalken= 5 mm.

3.2.3 Analyse der Herzfunktion

Die Analyse der Herzfunktion erfolgte für die Kurzzeit-Experimente (Abb. 18A) an Tag 13 (Echokardiographie) und Tag 14 (Elektrophysiologische Untersuchung, finales Experiment). Die Analysen der Langzeit-Experimente (Abb. 18B) erfolgte an Tag 55 (Echokardiographie) und Tag 56 (Elektrophysiologische Untersuchung). Alle funktionellen Messungen wurden verblindet durchgeführt.

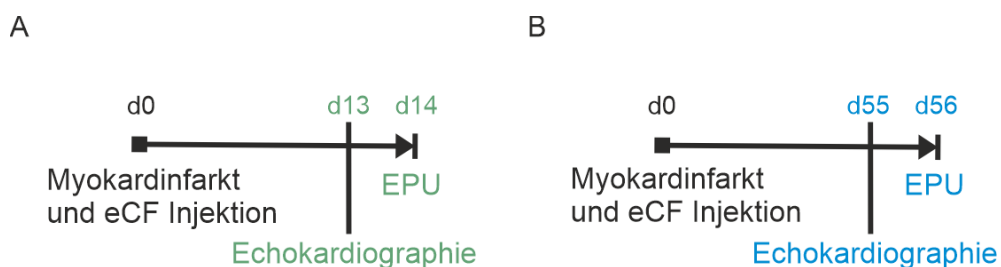


Abbildung 18: Zeitliche Darstellung der funktionellen Experimente nach eCF Transplantation. (A) Analyse der Zeitpunkte der Kurzzeit-Experimente und (B) der Langzeit-Experimente.

3.2.4 Echokardiographische Untersuchung

Die echokardiographische Untersuchung ist eine nicht-invasive Methode, bei der das Herz mittels Sonographie funktionell beurteilt werden kann. Die Echokardiographie erfolgte transthorakal, d.h. von außen durch die Thoraxwand. Einen Tag vor Beginn der Untersuchung erfolgte die Enthaarung der Brust der Tiere mit Enthaarungscreme (5 min Einwirkzeit) unter Inhalationsnarkose (siehe 3.2.1). Das Entfernen der Haare ist notwendig, da die Haare das echokardiographische Bild stören. Zudem erfolgte dies 24 Stunden vor der eigentlichen Untersuchung, da die Inhalationsnarkose mit Isofluran kardiodepressiv wirkt und die Versuchsergebnisse negativ beeinflussen kann. Die Echokardiographie erfolgte unter Inhalationsnarkose mit einer Maske. Dazu wurde die Maus zunächst in die Narkose eingeleitet (wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben) und anschließend auf einer Wärmeplatte bei 37 °C über eine Maske (abgeschnittene 2 ml Spritze) weiter narkotisiert. Die Isoflurankonzentration wurde so eingestellt, dass die Schlagfrequenz des Tieres bei mindestens 400 Schlägen pro Minute lag. Das Tier wurde in Rückenlage fixiert und der epilierte Brustbereich wurde mit Ultraschallgel bedeckt. Das Ultraschallgel wurde zuvor zentrifugiert, um mögliche Luftblasen innerhalb des Gels zu entfernen, die im Bild stören würden. Als Ultraschallgerät diente ein Phillips CX50 Ultraschallgerät, welches mit einem 15-20 MHz Linearschallkopf ausgestattet ist. Mit Hilfe dieses Setups können Bildfrequenzen bis zu 400 Hz erstellt werden. Es wurde zunächst eine 2D-Aufnahme in der Längsachse des Herzens aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Aufnahme im M-Mode (Motion-Mode), bei dem die Bewegung der Herzwände über die Zeit entlang einer Linie dargestellt wird. Mittels der M-Mode Aufnahme konnte funktionell vor allem die Pumpfunktion (fractional shortening) und die Wanddicke des linken Ventrikels (Anterior wall thickening: AWT) bestimmt werden (siehe Abb. 19). Die Tiere wurden nach Beenden der Untersuchung unter einer Wärmelampe in einem Käfig überwacht und danach wieder in den Tierstall gebracht. Die Auswertung der M-Mode Bilder erfolgte zunächst durch manuelles Ausmessen am Echokardiographen der einzelnen diastolischen und systolischen Parameter. Anschließend wurde die Ejection fraction (EF in %), Herzfrequenz (berechnet aus dem RR-Abstand) und das fractional shortening (FS in %) von der QVue-Software automatisch berechnet. Für die Quantifizierung wurden lediglich Mäuse mit einer minimalen Herzfrequenz von 350 bpm

einbezogen, da das Narkosegas Isofluran negativ chronotrop und negativ inotrop wirkt. Die Berechnung des Δ AWT (in mm) erfolgte durch folgende Berechnung:

$$\Delta\text{AWT} = (\text{Mittelwert IVSs} - \text{Mittelwert IVSd})$$

Für die Beurteilung der Pumpfunktion wurden ausschließlich die Werte des fractional shortenings (FS) verwendet. FS ist die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorgangs, berechnet aus diastolischem (Abb. 19B, LVIDd) und systolischem Durchmesser (Abb. 19B, LVIDs) des linken Ventrikels.

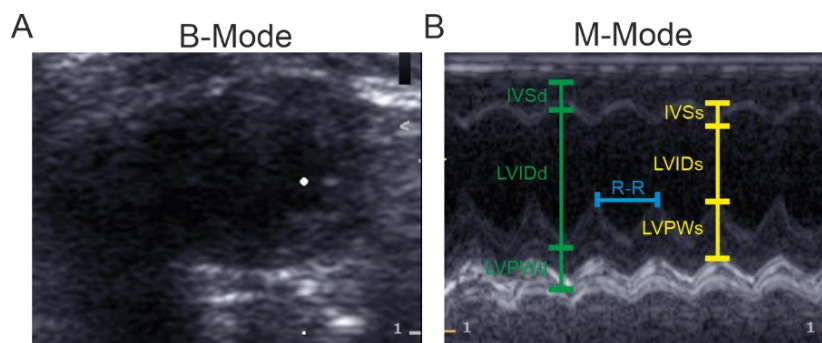


Abbildung 19: Schematische Darstellung der echokardialen Auswertung. Zunächst wurde ein Bild im B-Mode erzeugt (A) und davon schließlich durch Platzierung einer Ultraschalllinie ein M-Mode Bild (B) erzeugt. Die Messung der einzelnen Strukturen erfolgte in zeitlicher Abhängigkeit.

3.2.5 Elektrophysiologische Untersuchung (EPU)

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) handelt es sich um eine invasive und somit finale Versuchs-Methode. Hierbei wird das Myokard speziell stimuliert und es werden Katheterströme aus dem Herzzinneren werden abgeleitet. Ziel dieser Untersuchung ist es, zu analysieren, ob eine ventrikuläre Arrhythmie nach vorausgehender Stimulation ausgelöst werden kann und in welcher Form diese auftritt. Zunächst, wie unter Punkt 3.2.1. beschrieben, wurden die Tiere narkotisiert und über eine Maske bei 1-2 Vol. % Isofluran und 0,8 l/min Sauerstoff beatmet. Die Isofluran Konzentration wurde so eingestellt, dass sich der RR-Abstand im EKG zwischen 110-130 ms einstellte. Dazu wurde eine 5 ml Spritze abgeschnitten und deren Ende als Maske verwendet. Das Tier wurde in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (37 °C) fixiert und der Halsbereich mit 70 % Ethanol desinfiziert. Danach wurde im Halsbereich ein medianer Hautschnitt durchgeführt, die Speicheldrüse zur Seite geschoben und die rechte Vena

jugularis externa freipräpariert. Die Vene wurde distal und proximal mit einem Faden umschlungen, wobei nur der distale Part mit einem Doppelknoten ligiert wurde. Danach wurde die Vene mit Hilfe einer kleinen Federschere inzidiert und der Katheter durch die Öffnung in die Vene eingeführt. Dazu wurde ein oktapolarer, 2 F starker Katheter verwendet (Abb. 20A), der bis in die Spitze des rechten Ventrikels vorsichtig vorgeschoben wurde. Der Katheter verfügt über vier Elektrodenpaare, sodass sich intramyokardiale EKG-Signale auf Vorhof-, HIS-Bündel und Ventrikel Ebene ableiten lassen. Neben den intrakardialen Katheterelektroden, werden die Tiere zusätzlich über Oberflächen- Ableitungen der Extremitäten überwacht (Abb. 20B). Dort lassen sich ebenfalls über das EKG Herzrhythmusstörungen erkennen. Die optimale Katheterlage wurde anhand der intramyokardialen Signale überprüft, sodass mit der Stimulation begonnen werden konnte. Die Tiere wurden über programmierten- und Burst-Stimulus-Protokollen (siehe Tabelle 15-18, AG intern etabliert (Roell et al. 2007)) ausgesetzt. Bei allen Untersuchungen, so auch bei den elektrophysiologischen Analysen, waren die Untersucher geblindet.

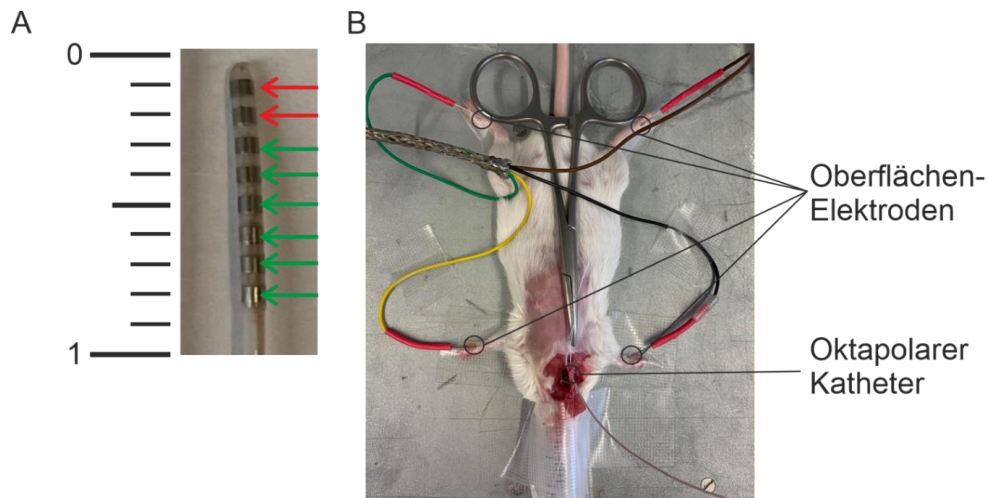


Abbildung 20: Darstellung des oktapolaren Katheters (A), sowie die Oberflächen- Elektroden (B) während der elektrophysiologischen Untersuchung. Der Katheter (2 F) verfügt über sechs Aufnahmeelektroden (A, grüne Pfeile), sowie zwei apexnahe Elektroden, die für die Stimulation verwendet werden (A, rote Pfeile).

1) Programmierte Stimulation (Dauer = 1 ms, Amplitude= 5 V)

Anzahl der Schläge:	7
Pause:	2000 ms
Reduktion:	-5 ms
Pulsamplitude (Stromstärke):	0,5-1,0 mA

Runde 1

Tabelle 15: Erste Runde der programmierten Stimulation

Stimulus	Frequenz
S1-S1	120 ms
S1-S2	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms
S1-S1	110 ms
S1-S2	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms
S1-S1	100 ms
S1-S2	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms

Runde 2**Tabelle 16: Zweite Runde der programmierten Stimulation**

Stimulus	Frequenz
S1-S1	120 ms
S1-S2	50 ms
S2-S3	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms
S1-S1	110 ms
S1-S2	50 ms
S2-S3	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms
S1-S1	100 ms
S1-S2	50 ms
S2-S3	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms

Runde 3**Tabelle 17: Dritte Runde der programmierten Stimulation**

Stimulus	Frequenz
S1-S1	120 ms
S1-S2	50 ms
S2-S3	50 ms
S3-S4	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms
S1-S1	110 ms
S1-S2	50 ms
S2-S3	50 ms
S3-S4	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms
S1-S1	100 ms
S1-S2	50 ms
S2-S3	50 ms
S3-S4	90 ms – 5 ms Reduktion bis 10 ms

2) Burst Stimulation (Dauer = 1 s, Amplitude = 5 V)

Pause: 4000 ms

Pulsamplitude (Stromstärke): 1,0 und 2,0 mA

Tabelle 18: Burst Stimulation

Dauer zwischen den Stimuli	Anzahl der Stimuli
50 ms	20
40 ms	25
30 ms	33
20 ms	50
10 ms	100

Bei der Burst Stimulation wurde zunächst mit 1 mA bei jeder Stufe (Dauer zwischen den Stimuli) 3x ohne Pause stimuliert. Nach 4000 ms Pause wurde anschließend die Dauer zwischen den Stimuli um 10 ms reduziert und erneut 3x stimuliert. Nach dem letzten Schritt (10 ms) erfolgte eine erneute Burst Stimulation mit doppelter Stromstärke (2 mA), wie in Tabelle 18 beschrieben. Als VT definiert, wurde das Auftreten von mindestens 4 Extrasystolen nach Stimulus-Applikation. Falls während der EPU mindestens einmal eine VT detektiert wurde, galt die Maus als 100 % auslösbar. Bei Auftreten keiner VTs während der Untersuchung, wurde die Maus als 0 % auslösbar betrachtet.

3.2.6 Herzentnahme und Aufbereitung der Proben

Unmittelbar nach Versuchsende wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet und auf einem Styropor-Brett an den Extremitäten fixiert. Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde der Thorax über das Zwerchfell ebenfalls eröffnet und das Herz durch Abtrennung der Aorta, Vena cava und der pulmonalen Gefäße entfernt. Das Herz wurde zunächst für ca. 3 min in eine kardioplege Lösung gegeben. Durch Natriumentzug, sowie eine erhöhte Kalium Konzentration, wurde eine Depolarisation der Kardiomyozyten und somit der Herzstillstand ausgelöst. Dies ermöglichte anschließend eine bessere makroskopische Aufnahme. Unmittelbar nach der Aufnahme wurde das Herz entweder für histologische Zwecke fixiert (vgl. 3.5.2) oder für Protein/RNA-biochemische Zwecke aufgearbeitet. Dazu wurde dem Herzen das Infarktareal (wenn vorhanden), der linke und rechte Ventrikel entfernt und einzeln in Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff weggefroren. Für die RNA-Proben wurden von den oben genannten Arealen kleinere Proben entnommen und über Nacht in RNAlater[®] gegeben, bevor diese ebenfalls weggefroren wurden. Für die Langzeit- Aufbewahrung wurden alle Proben nach entsprechender Vorbereitung bei -80 °C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA Isolation von Zellen

Für die RNA Isolation wurden die Zellen zunächst nach Entfernung des Mediums mit kaltem PBS gewaschen und die RNA mittels RNeasy[®] Plus Mini Kit (Vgl Hersteller Protokoll, Qiagen) isoliert. Die Quantifizierung der isolierten RNA wurde anschließend

mittels Absorptionsmessung in der „NanoQuant“ Platte bestimmt. Hierbei wurde die Extinktion der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mit Hilfe der Beer-Lambert-Gleichung, die RNA-Konzentration (in ng/µl) berechnet. Die isolierten RNA Proben wurden bei -80 °C gelagert.

3.3.2 RNA Isolation von Gewebe

Für die RNA Isolation von Gewebeproben, wurde das Infarktgewebe zunächst mit Hilfe einer Metallkugel (7 mm) und 400 µl Lysepuffer (Vergl. Hersteller Protokoll, RNeasy® Plus Micro Kit, Qiagen) in einem Homogenisator (TissueLyser LT, Qiagen) zerkleinert. Um die Proben weiter aufzureinigen und den Anteil genomischer DNA zu minimieren, wurden die Proben in QIAshredder® Säulen gegeben und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA mittels RNeasy® Plus Micro Kit (Qiagen) nach Hersteller Protokoll isoliert. Die RNA wurde ebenfalls, wie unter Punkt 3.3.1 beschrieben, quantifiziert.

3.3.3 Qualitätsbestimmung der RNA für die RNA Sequenzierung (RNA-Seq)

Gerade für sensible Analysen wie eine RNA-Seq, ist eine Qualitätsbestimmung der eingesetzten Proben notwendig. Dazu wurden die Proben mittels Bioanalyzer analysiert. Der Bioanalyzer ist eine automatisierte Elektrophorese und gibt Aufschlüsse über Fragmentgröße, Quantität, Integrität und Reinheit der RNA Proben. Die RNA Proben wurden dazu auf einen Nano-Chip (1 µl RNA-Volumen) aufgetragen und aufgetrennt. Für das Protokoll zur Herstellung des Nano-Chip-Gels und Probenbeladung siehe Hersteller-Protokoll (Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide). Eine der wichtigsten Parameter bei der RNA Qualitätsbestimmung ist die „RNA Integrity Number (RIN)“. Die RIN ist eine objektive Messgröße der RNA-Qualität und reicht von Werten ab 1 (RNA ist komplett degradiert) bis hin zu 10 (komplett intakte RNA). Für die RNA Seq-Analyse sollte die RIN bei mindestens 7 liegen.

3.3.4 Library Generierung und RNA Seq Analyse

Die für die RNA-Seq benötigte library der einzelnen zu analysierenden RNA Proben, wurde nach Anleitung des Hersteller-Protokolls „Trio RNA-Seq“ von NuGEN erstellt. Die Sequenzierung erfolgte schließlich im „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL) in Heidelberg. Es wurde eine „paired-end“ Sequenzierung mit 10-15 Millionen gelesenen

Fragmenten (=reads), also eine Sequenzierung ausgehend von beiden Enden der RNA Fragmente, durchgeführt.

3.3.5 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA (Reverse Transkription) erfolgte mittels des SuperScript™VILO™ Kit. Es wurden von jeder Probe 500 ng (bzw. 250 ng für TaqMan™ qPCR) RNA nachfolgendem Protokoll umgeschrieben:

1) Herstellung der Reaktionslösung

Reaction Mix (VILO™ Kit)	4 µl
Superscript™ Enzyme Mix	2 µl
RNA (500 oder 250 ng)	x µl

auf 20 µl mit Aqua dest. auffüllen.

2) Protokoll der reversen Transkription

25 °C	10 min
42 °C	60 min
85 °C	5 min

Die cDNA Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.6 TaqMan™ qPCR

Die quantitative TaqMan™ PCR (TaqMan™ qPCR) wird vor allem zur Analyse der Genexpression verwendet und basiert auf der Verwendung einer fluorogenen Sonde (TaqMan™ Sonde), die zur Erkennung eines PCR Produkts innerhalb der zu untersuchenden cDNA Probe verwendet wird. Das PCR Produkt wird innerhalb der qPCR vervielfältigt, sodass sich das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des Amplikons nach jedem Zyklus erhöht. Für die qPCR wurden 2 µl der zuvor transkribierten cDNA (siehe Punkt 3.3.5) verwendet.

1) Herstellung der Reaktionslösung

cDNA	2 μ l
TaqMan™ Sonde 20x Zielgen (FAM)	1 μ l
TaqMan™ Sonde 20x Housekeeping Gen (VIC)	1 μ l
TaqMan™ Master-Mix	10 μ l
H ₂ O	6 μ l

2) PCR Protokoll

Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 38 Zyklen
Annealing	60 °C	30 s	
Amplifikation	72°C	30 s	

Die angegebenen CT Werte (Dreifachbestimmung) der Proben wurden gemittelt und in Relation zur endogenen Expression eines „Housekeeper“ Gens gesetzt, sodass sog. Δ CT Werte bestimmt wurden.

3.3.7 PCR

Um die umgeschriebenen cDNA Proben zu vervielfältigen und eine Vielzahl von Kopien zu erstellen wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1 µl cDNA und die oben genannten Primer (vgl. 2.14) verwendet.

1) Herstellung der Reaktionslösung

cDNA	1 µl
forward Primer	1 µl
reverse Primer	1 µl
Hot Firepol® Taq- Polymerase	4 µl
H ₂ O	13 µl

2) PCR Protokoll

Initiale Denaturierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	20 sec	} 28 Zyklen
Annealing	62 °C	1 min	
Amplifikation 1	72°C	2 min	
Amplifikation 2	72°C	10 min	
	4°C	∞	

3.3.8 Gelelektrophorese

Zur Analyse der entstanden PCR Produkte wurden diese mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierbei wurde zunächst ein 1 %iges Agarose-Gel (100 ml TAE-Puffer und 1 g Agarose) hergestellt und mit 4 Tropfen Ethidiumbromid (EtBr) versehen. EtBr interkaliert zwischen den DNA Strängen und ermöglicht durch UV-Licht Absorption einen visuellen Nachweis der PCR-Banden. Nach Auftragen des Größenstandards und der PCR Produkte wurde das Gel bei 100 V für eine Stunde an den elektrischen Strom angeschlossen. Dadurch wurde ein elektrisches Feld erzeugt, sodass die negativ-geladenen DNA Moleküle in Richtung der Anode hinsichtlich ihrer Größe aufgetrennt

wurden. Als finalen visuellen Nachweis wurde das Gel schließlich mit UV-Licht belichtet und ein Foto aufgenommen.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinisolation von Zellen

Die Proteinisolation erfolgte von Zellen, die auf einer 6-well Platte ausgesät wurden. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, danach wurden die Zellen mit 3 ml kaltem DPBS gewaschen. In jedes well wurden 100 µl modifizierter Ripa-Puffer (Zusammensetzung vgl. 2.5) gegeben und die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach zwanzigminütiger Inkubation auf Eis, wurde das Zelllysate für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Proteine bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Proteinisolation von Herzen

Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Herzen in eisgekühlter Kardioplegielösung gelagert und die scharf demarkierte Infarktzone mit einer Federschere ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff durchgefroren. Zusätzlich wurde ein 3,5-4 mm großes Areal natives Myokardgewebe jeweils aus dem linken und rechten Ventrikel entnommen und ebenfalls weggefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Gewebeproben bei -80 °C gelagert. Zur Isolation der Proteine, wurden die Gewebeproben auf Eis aufgetaut und in 150 µl – 200 µl Ripa-Puffer (vgl. Zusammensetzung 2.5) gegeben. Das Gewebe wurde auf Eis homogenisiert und anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min auf Eis. Die Lysate wurden anschließend bei 13.000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Proteine bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit (vgl. 2.6) in einer 96-well Platte nach Hersteller- Protokoll bestimmt. Es handelt sich hierbei um ein kolorimetrisches Assay, das auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} im alkalischen Milieu

durch die Chelatkomplex-Bildung mit Proteinen basiert. Die gebildeten Chelatkomplexe aus Cu^{1+} und Bicinchoninsäure (BCA) können anschließend kolorimetrisch nachgewiesen werden.

3.4.4 Western Blotting

3.4.4.1 SDS Page

Zur Auftrennung einzelner Proteine einer Zell-oder Gewebeprobe wurde eine SDS-Page-also eine gelelektrophoretische Trennung durchgeführt. Dazu wurde zunächst einen Tag vorher ein Trenngel hergestellt (Zusammensetzung vgl. 2.5), dessen prozentualer Anteil an Acrylamid je nach Zielprotein-Größe variiert. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet, dessen Acrylamid-Anteil ebenfalls von der Größe des Zielproteins abhängt. Das polymerisierte Gel wurde in feuchten Zellstofftüchern verpackt und bei 4 °C für den Tag gelagert. Am nächsten Tag wurden 20 µg Protein mit Probenpuffer verdünnt und für 10 min bei 100 °C denaturiert. Das Gel wurde in die SDS-Kammer (Biorad) gestellt und die Kammer mit 1x Laufpuffer (vgl. 2.1) befüllt. Zusammen mit einem Größenstandard wurden anschließend die Proben auf das Gel aufgetragen. Im Sammelgel erfolgte die Elektrophorese zunächst bei 60 V, sobald die Proben das Trenngel erreichten, wurde die Spannung auf 100 V erhöht. Die Auftrennung erfolgte so lange, bis die gut sichtbare Lauffront (blaue Färbung) des Probenpuffers aus dem Gel gelaufen war.

3.4.4.2 Tank blot

Die aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Tank blot Verfahrens (Elektrotransfer) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran übertragen, um mittels einer Immundetektion die in den Proben enthaltenen Proteine zu detektieren. Im Vergleich zu einer gewöhnlich verwendeten Nitrozellulose-Membran ist die PVDF Membran charakterisiert durch eine höhere Stabilität und Widerstandsfähigkeit. Für den Tankblot wurde das Gel aus der Elektrophorese-Kammer geholt, das Sammelgel abgetrennt und das Gel zunächst für 5 min in Aqua bidest. gewaschen und dann in Transferpuffer (vgl 2.1) überführt. Die Membran wurde zunächst für 5 min in Methanol aktiviert und anschließend ein paar Minuten im Transferpuffer inkubiert. Der Blot wurde anodenseitig und stets in Transferpuffer getränkt geschichtet, beginnend mit einem Stück Watte, gefolgt

von einem Blotpapier und anschließend das Gel. Daraufhin wurde die Membran auf das Gel platziert und wieder mit einem Blotpapier und einem Wattestück bedeckt. Danach wurden alle Luftblasen aus dem Blot mit einem Roller entfernt. Der Blot wurde anschließend in eine mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Kammer gestellt und an elektrische Spannung angeschlossen. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde und 15 min bei 100 V.

3.4.4.3 Immundetektion

Die Membran wurde zunächst für mindestens eine Stunde mit 5 % Milchpulver (MP) in TBST bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt ist besonders wichtig, um einen Ergebnis mit spezifisch klaren Banden zu erhalten, da die verbliebenen freien Stellen auf der Membran durch Verwendung des MP blockiert und somit unspezifische Bindungen der nachfolgenden Antikörper verhindert werden. Die primären Antikörper wurden jeweils einzeln in 5 % MP/TBST oder 5 % Rinderserumalbumin (BSA)/ TBST verdünnt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte entweder bei 4 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Als sekundäre Antikörper wurden entweder Peroxidase- oder Fluoreszenz gekoppelte Antikörper verwendet. Diese wurden in 5 % MP/TBST verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Bei der Verwendung von GAPDH als primären Antikörper, entfiel die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, da dieser schon mit einer Peroxidase gekoppelt war. Danach wurde erneut 3x für 5 min mit TBST gewaschen. Bei der Verwendung von Peroxidase gekoppelten Antikörpern, wurden die Proteine mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurde ein ECL-Kit (vgl. 2.1) verwendet, dessen beiden Reagenzien 1:1 miteinander vermischt und für 1 min auf die Membran gegeben wurden. Überschüssige Lösung wurde entfernt und das Protein-Signal mit Hilfe eines Geldokumentationssystems detektiert. Bei der Verwendung von Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, konnte das Protein-Signal unmittelbar nach dem letzten Waschschrift mit Hilfe des Geldokumentationssystems detektiert werden. Schließlich erfolgte die Analyse der Protein-Signale mittels der Software von Biorad und die auf GAPDH normalisierte Proteinexpression wurde bestimmt.

3.5 Immunhistochemische und histologische Methoden

3.5.1 Fixierung von Zellen

Das Zellkulturmedium wurde zunächst abgesaugt und anschließend wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min bei Raumtemperatur. Durch Paraformaldehyd werden die Proteine durch Methylbrücken so miteinander vernetzt, sodass die ursprüngliche Form im Präparat bestehen bleibt. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und entweder direkt für eine histologische Färbung verwendet oder konnten bei 4°C, mit ausreichend PBS bedeckt, für mehrere Wochen gelagert werden.

3.5.2 Fixierung von Gewebe

Unmittelbar nach der Gewebeentnahme wurde das Gewebe (z.B. die entnommenen Herzen) in 15 ml Röhrchen mit 4 %-igem PFA gegeben und für 2-3 Stunden bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in PBS über Nacht, ebenfalls bei 4 °C auf einem Rollenmischer, um alle PFA Rückstände zu entfernen. Zur Entwässerung wurde das Gewebe danach in eine 20 %-ige Succroslösung gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

3.5.3 Kryokonservierung von Gewebe

Das Einfrieren des Gewebes erfolgte einen Tag nach der Entwässerung. Dazu wurde dieses in ein Gefriergefäß gegeben, das zuvor mit Tissue Tek Einfriermedium luftblasenfrei befüllt wurde. Bei Herzen, wurde das Herz mit der Spitze nach unten in den Gefriergefäßen platziert. Die Gefriergefäße wurden anschließend in ein Becherglas, gefüllt mit Isopentan (2-Methylbutan) gestellt, sodass das Gewebe in wenigen Minuten einfrieren konnte. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Gewebe bei -80 °C gelagert.

3.5.4 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Kryoschnitte wurden mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt. Dazu wurde das Gewebe aus dem Gefriergefäß in das Kryotom überführt und mittels Tissue Tek auf einem Schnittstempel durch Anfrieren befestigt. Der Stempel wurde anschließend auf den

Schneidearm des Kryotoms gesteckt. Die Kammertemperatur wurde auf $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Objekttemperatur auf $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingestellt, sodass optimale Schneidebedingungen gewährleistet waren. Die Schnitte wurden mit einer Schnittdicke von $7\text{ }\mu\text{m}$ geschnitten und auf speziell beschichtete Objektträger ($76 \times 26 \times 1\text{ mm}$) aufgezogen. Für die folgenden immunhistochemischen Färbungen, wurden die Schnitte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (für eine kurze Lagedauer von mehreren Wochen) oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (für längerfristige Lagerungen von mehreren Monaten bis zu Jahren) gelagert.

3.5.5 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen und Gewebe

Alle Färbungen fanden in einer feuchten Kammer statt, damit die Schnitte während des Färbvorgangs nicht austrockneten. Als feuchte Kammer wurde eine leere Schnittbox verwendet, die mit befeuchteten Zellstofftüchern ausgelegt wurde. Für die Färbung von Zellen, wurden zusätzlich noch Parafilmstreifen ausgelegt, auf denen die Glasplättchen aus den 6- und 24-well Platten ausgelegt wurden. Zellen und Gewebeschnitte wurden initial 5 min mit PBS gewaschen. Für die Quantifizierung der eingewachsenen Zellen im Infarkt (eGFP Färbung) wurde zunächst eine Antigendemaskierung in Citrat-Puffer bei 93°C für 15 min durchgeführt, um die durch die Fixierung verlorene Immunreaktivität wiederherzustellen. Bei allen anderen Färbungen wurde auf eine Antigendemaskierung verzichtet. Dann erfolgte ein Permeabilisierungs-Schritt mit einer 0,2 %-igen Triton-Lösung (Triton-X 100 in PBS) und 5 %-igem Eselserum für 20 min, um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen oder Schnitte mit den primären Antikörpern für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach folgten 3 Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min. Die Sekundärantikörper wurden in einer Hoechst- Lösung (siehe Tabelle 1) verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen oder Schnitte gegeben. Der Hoechstfarbstoff dient als Markierung der Zellkerne, da er in die DNA der Zellen interkaliert und diese blau färbt. Nach 3 Waschschrten mit PBS für jeweils 5 min wurden die Zellen oder Schnitte mit einem Eindeckmedium auf Wasserbasis luftblasenfrei eingedeckt. Die Zellen oder Schnitte wurden dann über Nacht in Dunkelheit und bei Raumtemperatur getrocknet und am darauffolgenden Tag konnten die Schnitte mikroskopiert und ggf. Fluoreszenzaufnahmen gemacht werden.

3.5.6 Sirius-red/Fast-green Färbung

Eine Sirius-red/ Fast-green Färbung ist eine Kombinationsfärbung und wird vor allem zur Differenzierung zwischen kollagenhaltigem und kollagenarmen Gewebe verwendet. In der kardialen Histologie bedeutet dies, die Unterscheidung von infarzierten Arealen und gesundem Myokard. Der Sirius-red Farbstoff bindet spezifisch an die helikalen Strukturen des Kollagens und färbt diese rot. Fast-green hingegen färbt die restlichen Proteine (nicht kollagenhaltig) grün und ermöglicht somit eine klare Unterscheidung beider Gewebestrukturen. Für die Sirius-red/Fast-green Färbung wurden die Kryoschnitte zunächst 5 min in Aqua dest. gewässert und anschließend für eine Stunde bei 55 °C in einer vorgewärmten Bouin'schen Lösung (vgl. 2.1) fixiert. Das Gewebe wurde zwar schon vorab mittels 4 % PFA fixiert, dennoch erzielt die zusätzliche Anwendung der Bouin'schen Lösung ein besseres Ergebnis bei kontrastreichen Färbungen, wie z.B. der Sirius-red/Fast-green Färbung. Danach wurde die Fixierlösung für 10 min unterlaufendem Wasser ausgewaschen. Die Schnitte wurden anschließend zunächst 10 min mit 0,1 % Fast green gefärbt, kurz in Wasser gewaschen und dann für 2 min in 1 % Essigsäure inkubiert. Nach 3 kurzen Waschschritten mit Wasser erfolgte die Färbung in 0,1 % Sirius-red für 30 min. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte erneut in Wasser gewaschen und mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe in Xylol-haltigem Medium (Entellan) trocken eingedeckt.

3.5.7 Zell-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der eingewachsenen eCF in den Kurz- als auch Langzeit Experimenten wurden die unter 3.5.4 beschriebenen Kryoschnitte (Schnittintervalle von ca. 300 µm) mit einem eGFP-Antikörper nachgefärbt, um die native eGFP Fluoreszenz der eingewachsenen eCF besser zu visualisieren. Dazu wurde zunächst eine Antigendemaskierung (bei 93°C für 15 min in Citrat-Puffer) durchgeführt. Die Antigendemaskierung ermöglicht eine Wiederherstellung der „Antigenität“ durch Denaturierung der durch den Fixierungsprozess entstandenen Quervernetzungen. Anschließend wurden die Schnitte wie unter Punkt 3.5.5 mit einem eGFP (Santa-cruz, #sc-5385) nachgefärbt. Als Fibroblasten-Marker wurde Vimentin verwendet. Dann erfolgte die mikroskopische Aufnahme der Infarktareale in Form mehrerer Kacheln, in welchen später die Anzahl der eGFP⁺ und Vimentin⁺ Fibroblasten bestimmt wurde. Die

Anzahl der nach Injektion integrierten transgenen Fibroblasten, wurde standardisiert in drei Ebenen der Läsion bestimmt, und auf die gesamte Läsion extrapoliert.

3.5.8 Infarktgrößenbestimmung

3.5.8.1 Flächenbestimmung

Die Flächenbestimmung eines Infarktes wurde mit Hilfe der Analyse Software „ImageJ“ durchgeführt. Dazu wurde die 16-fache Vergrößerung des makroskopischen Durchlichtbildes verwendet und der Infarkt eingezeichnet (siehe Abb. 21). Die Infarktoberfläche wurde in mm² angegeben.



Abbildung 21: Makroskopische Aufnahme einer Kryoläsion mit eingezeichnetem Infarktareal.
(Maßstabsbalken= 500 µm)

3.5.8.2 Volumenbestimmung

Für die Infarktgrößenbestimmung wurden von den Herzen zunächst Kryoschnitte (7 µm) angefertigt und 10er Serien mit jeweils 4 Schnitten pro Objektträger erstellt. Ab der 50er Serie wurde zwischen den Serien 200 µm Gewebe verworfen. Anschließend wurde je ein Schnitt aus jeder Serie ausgewählt und eine Sirius-red/Fast-green Färbung durchgeführt. Mit Hilfe von ImageJ wurde dann das Infarktareal (in mm²) und der gesamte linke Ventrikel graphisch ausgewertet.

$$\frac{\text{Fläche Infarktareal}}{\text{Gesamtfläche (Infarktareal + gesundes Myokard)}} * 100$$

3.5.9 Preußisch-Blau Färbung

Die Preußisch-bBlau oder auch sog. Berliner-Blau Färbung, diente als Eisennachweis-Methode der MNPs in Zellen oder auch Gewebeschnitten. Hierbei wurden die Zellen oder

Kryoschnitte kurz in PBS gewaschen und anschließend in eine feuchte Kammer (siehe 3.5.5) transferiert. Danach folgte die Inkubation mit einer Lösung aus 5 % Salzsäure und 5 % Kaliumhexacyanoferrat (Verhältnis 1:1, 80-100 µl pro Schnitt) für 20 min. Durch die Verwendung von Salzsäure, erfolgt eine Ionisierung des Eisens der MNP's, wodurch die Affinität zum Ferrocyanid steigt und sich ein schwerlösliches Ferri-Ferrocyanid Salz bildet. Die Lösung wurde mittels 3x Aqua dest. Waschschritten ausgewaschen und die Zellen/Schnitte mit Nuclear fast red- Lösung (vgl. 2.1) gegen gefärbt. Anschließend wurde die Lösung mittels aqua dest. so lange ausgewaschen, bis das ausgewaschene Wasser klar wurde. Mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Zellen/ Schnitte schließlich trocken in Xylol-haltigem Medium (Entellan) eingedeckt.

3.6 Mikroskopie

Die Aufnahmen von Zellen in Kultur wurden mit Hilfe eines AxioVert A1 (Zeiss) aufgenommen. Makroskopische Aufnahmen des gesamten Herzens oder Übersichtsaufnahmen (z.B. Sirirus-red/Fast-green Übersichtsbilder) wurden mit Hilfe eines Stereo-Zoom Mikroskops (Axio Zoom V16, Zeiss) aufgenommen. Die histologischen Aufnahmen von Zellen sowie Gewebeschnitten wurden teilweise mit dem AxioObserver (Zeiss) aufgenommen, aber hauptsächlich mittels konfokaler Mikroskopie (Modell Eclipse Ti, Nikon) aufgenommen.

3.7 Statistik

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 9 durchgeführt (vgl. 2.4). Für die Signifikanztestung wurde bei nominalen Daten ein t-Test (bei 2 Gruppen) beziehungsweise eine Varianzanalyse (bei > als 2 Gruppen, ANOVA) durchgeführt. Die Werte wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Bei ordinalen Daten wurde ein χ^2 Test durchgeführt und

die Werte als arithmetisches Mittel angegeben. Ein signifikanter Unterschied lag vor, wenn $p < 0,05$ war. Folgende Bezeichnungen wurden in den Abbildungen verwendet:

* = $p < 0,05$

** = $p < 0,01$

*** = $p < 0,001$

**** = $p < 0,0001$

3.8 Kooperationen

Die folgenden Arbeiten wurden mit Hilfe von anderen Personen durchgeführt:

Tabelle 19: Übersicht der Kooperationen

Arbeit	Name	Institut
Unterstützung bei den eCF Transplantationen	Esther Carls, M.Sc., Prof. Wilhelm Röhl	Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn
Herstellung der Tamra-MNP	Dr. Raluca Fratila, Dr. JM de La Fuente	Aragon Materials Science Institute, ICMA Zaragoza, Spain
Herstellung der SoMag5-MNP	Dr. Olga Mykhaylyk	Institut für Experimentelle Onkologie, TU München
Testung verschiedener MNP bezüglich ihrer Zell-Toxizität	Kevin Wagner	Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Bonn
Lentivirus Präparation	Dr. Staffan Hildebrandt, Prof. Alexander Pfeifer	Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Universitätsklinikum Bonn
RNA Seq (Library Generierung und Daten Analyse)	Patricia Freitag, PD Dr. Michael Hesse	Institut für Physiologie I, Universität Bonn
RNA Seq (Sequenzierung)		European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg
Herstellung des MMLV Konstruktes	Pia Niemann, Dr. Caroline Geisen	Institut für Physiologie I, Universität Bonn
MMLV Präparation	Dr. Deepak Ramanujam, Prof. Stefan Engelhardt	Institut für Toxikologie und Pharmakologie, TU München

4 Ergebnisse

4.1 Transplantation von primären embryonalen kardialen Fibroblasten

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt die Transplantation von Cx43 überexprimierenden kardialen Fibroblasten in die Infarktnarbe und deren potentiell anti-arrhythmischen Effekt. Die isolierten kardialen Fibroblasten wurden zu diesem Zweck *in vitro* mittels lentiviralem Gentransfer genetisch so verändert, dass sie Cx43 überexprimieren. Das verwendete Cx43-Lentivirus wurde bereits in einem früheren Projekt für die Transduktion von residenten Fibroblasten in der Infarktnarbe eingesetzt (Roell et al. 2018). Außerdem wurde in einer früheren Studie (Roell et al. 2018) trotz geringer lentivirale Transduktionsrate residenter Fibroblasten, eine signifikante Protektion gegen die Auslösung von VTs erreicht. Bereits aus früheren Studien, sowie aus der Literatur ist bekannt, dass nach intramyokardialer Transplantation von CM nur ein sehr geringer Teil der ursprünglich transplantierten Zellen (z.B. embryonale Kardiomyozyten, eCM) letztendlich in die Narbe integriert. Da (Myo)-Fibroblasten natürlicherweise die größte Zellpopulation einer Infarktnarbe darstellen, wurden in der vorliegenden Arbeit embryonale kardiale Fibroblasten (eCF) verwendet. Um ein besseres Einwachsen der Zellen zu erzielen, wurde die in der AG bereits etablierte Methode einer MNP Zellbeladung und die Transplantation dieser Zellen unter Magnetfeld-Einwirkung (Ottersbach et al. 2018) modifiziert und angewendet (siehe Schema Abb. 22A).

Geeignete MNP sollten ein hohes magnetisches Potential bei möglichst geringer Zelltoxizität aufweisen. So wurden verschiedene MNPs hinsichtlich ihrer Toxizität, sowie des Magnetisierungspotentials in 3T3 Fibroblasten innerhalb unserer Arbeitsgruppe getestet. Im Vergleich zu den bereits etablierten SoMag5-MNP (Ottersbach et al. 2018), sollten neue MNP vermindert im Zytoplasma der Zielzellen aggregieren. Anschließend wurde das am besten geeignete MNP (Tamra-MNP) für die nachfolgenden Zelltransplantationsversuche ausgewählt. Die Ergebnisse zur MNP-Auswahl sind nicht Bestandteil dieser Arbeit, sie wurden größtenteils von Kevin Wagner durchgeführt.

4.1.1 Charakterisierung der eCF *in vitro*

Zunächst wurden die Fibroblasten auf ihre α -smooth muscle (α SMA) Expression untersucht. α SMA ist ein Aktin-Filament, also ein Protein des Zytoskeletts und vorwiegend in der kontraktile Einheit der glatten Muskulatur zu finden. Es wurden eCF aus embryonalen Herzen isoliert und die α SMA Expression mittels Western blot zu verschiedenen Zeitpunkten (t_0 = 2-3 Stunden nach Isolation, t_1 = ein Tag nach Isolation, t_3 = drei Tage nach Isolation und t_7 = sieben Tage nach Isolation) analysiert. Die lentivirale Transduktion der isolierten Zellen fand erst an t_8 und die Beladung mit MNP erst an t_{11} (unmittelbar einen Tag vor der Transplantation) nach Zellisolierung statt (siehe Zeitstrahl Abb. 22A). Die Zellen wurden eine Woche in Kultur gehalten (inklusive einer Passage) bevor die Transduktion der Zellen durchgeführt wurde. Es wurde ein deutlicher Anstieg der α SMA Expression auf Protein Ebene mit zunehmender Dauer der Zellkultivierung festgestellt (Abb. 22B). Die α SMA Expression verdoppelte sich von ca. 5 % an t_0 (Tag der Isolation) bis hin zu ca. 13 % an t_7 der Kultivierung (Abb. 22B). Es ist bereits bekannt, dass primäre Fibroblasten aufgrund der Kultivierung und dem damit verbundenen Zell-Stress innerhalb weniger Stunden nach Kultivierung zu Myofibroblasten differenzieren (Santiago et al. 2010, Landry et al. 2019, de Oliveira Camargo et al. 2021). An t_8 erfolgte schließlich die Transduktion über Nacht mit Hilfe lentiviraler Konstrukte (vergl. Punkt 2.11.1). Beide Lentiviren (eGFP LV und Cx43 LV) zeigten eine ähnliche Transduktionseffizienz (Abb. 22C) mit ca. 25 % drei Tage nach Transduktion (t_{12}). Da Myofibroblasten (im Vergleich zu Fibroblasten) neben einer erhöhten α SMA Expression auch einen Anstieg der Cx43 Expression aufweisen, wurde dieser Aspekt in unbehandelten eCF (WT) untersucht.

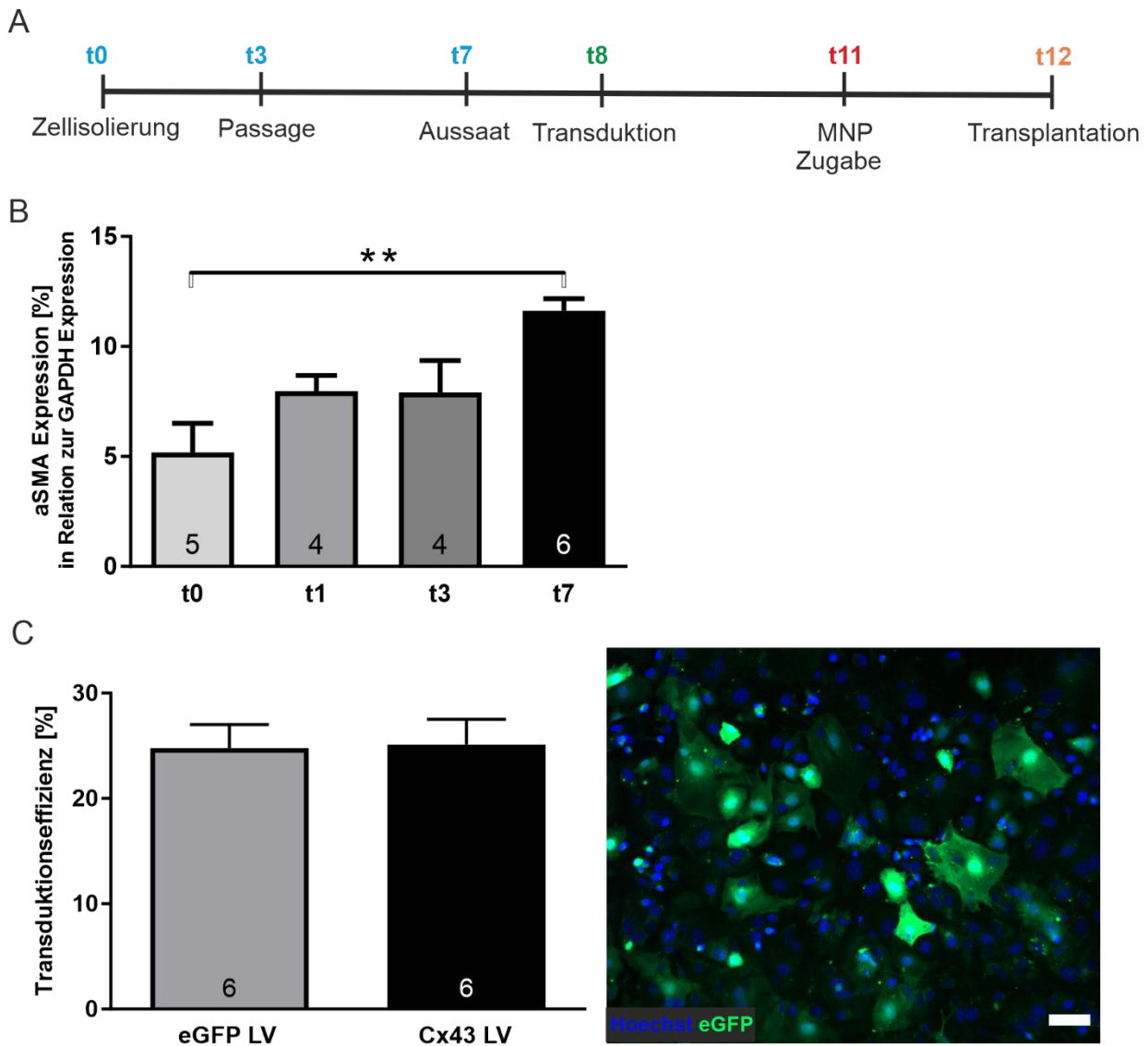


Abbildung 22: Charakterisierung der isolierten eCF vor Transduktion und Bestimmung der Transduktionseffizienz. (A) Schematischer Zeitlauf der eCF Aufbereitung der Zellisolation (t0) bis hin zur *in vivo* Transplantation (t12). (B) Analyse der aSMA Expression mittels Western blot zu unterschiedlichen Zeiten der Kultivierung (t0 bis t7). (C) Bestimmung der Transduktionseffizienz an t12 der verwendeten Lentiviren (eGFP LV, Cx43 LV, beide MOI= 5) nach über Nacht Transduktion der eCF an t8. Maßstabsbalken= 50 μ m.

Nach Transduktion mit dem Cx43 LV konnte eine signifikant erhöhte Cx43 Expression der eCF detektiert werden (Abb. 23). Histologische Färbungen der transduzierten Zellen an t12 (Cx43 Immunfärbung) zeigte eine geringe, native Cx43 Expression der Kontroll-eCF (eGFP LV, Abb. 23A). Bei den Cx43-eCF, konnte eine erhöhte Cx43 Expression in den grün fluoreszierenden Zellen (Abb. 23B, weiße Färbung) gesehen werden. Als Fibroblastenmarker wurde Vimentin eingesetzt. qPCR Analysen ergaben eine zweifach

höhere Cx43 Genexpression in den Cx43 überexprimierenden eCF (Cx43 LV $\Delta\text{CT}= 0,598$ vs. eGFP LV $\Delta\text{CT}= 0,279$) (Abb. 23C, linker Graph). Durch die lentivirale Transduktion der eCF konnte ebenfalls das Reportergen „eGFP“, welches bei beiden Vektoren exprimiert wird, sowohl auf RNA Ebene mittels qPCR (Abb. 23C, rechter Graph) als auch auf Protein Ebene (Abb. 23D) nachgewiesen werden. Auffällig ist jedoch das hohe Expressionsgefälle der eGFP-eCF ($\Delta\text{CT eGFP/HPRT}= 10,9$) im Vergleich zu den Cx43-eCF ($\Delta\text{CT eGFP/HPRT}= 2,6$). Dieser Expressionsunterschied ist auch deutlich im Bandenmuster des in Abb. 23D dargestellten Western blots zu erkennen und durch das im Cx43 LV enthaltene IRES-Element zu erklären. Die Quantifizierung der Cx43 Expression mittels Western Blot (Abb. 23D), zeigte eine signifikant höhere Cx43 Expression in den Cx43-eCF (Abb. 23D, Cx43-eCF= 59,2 %) im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 23D, WT= 18,8 %; eGFP-eCF= 27,5 %).

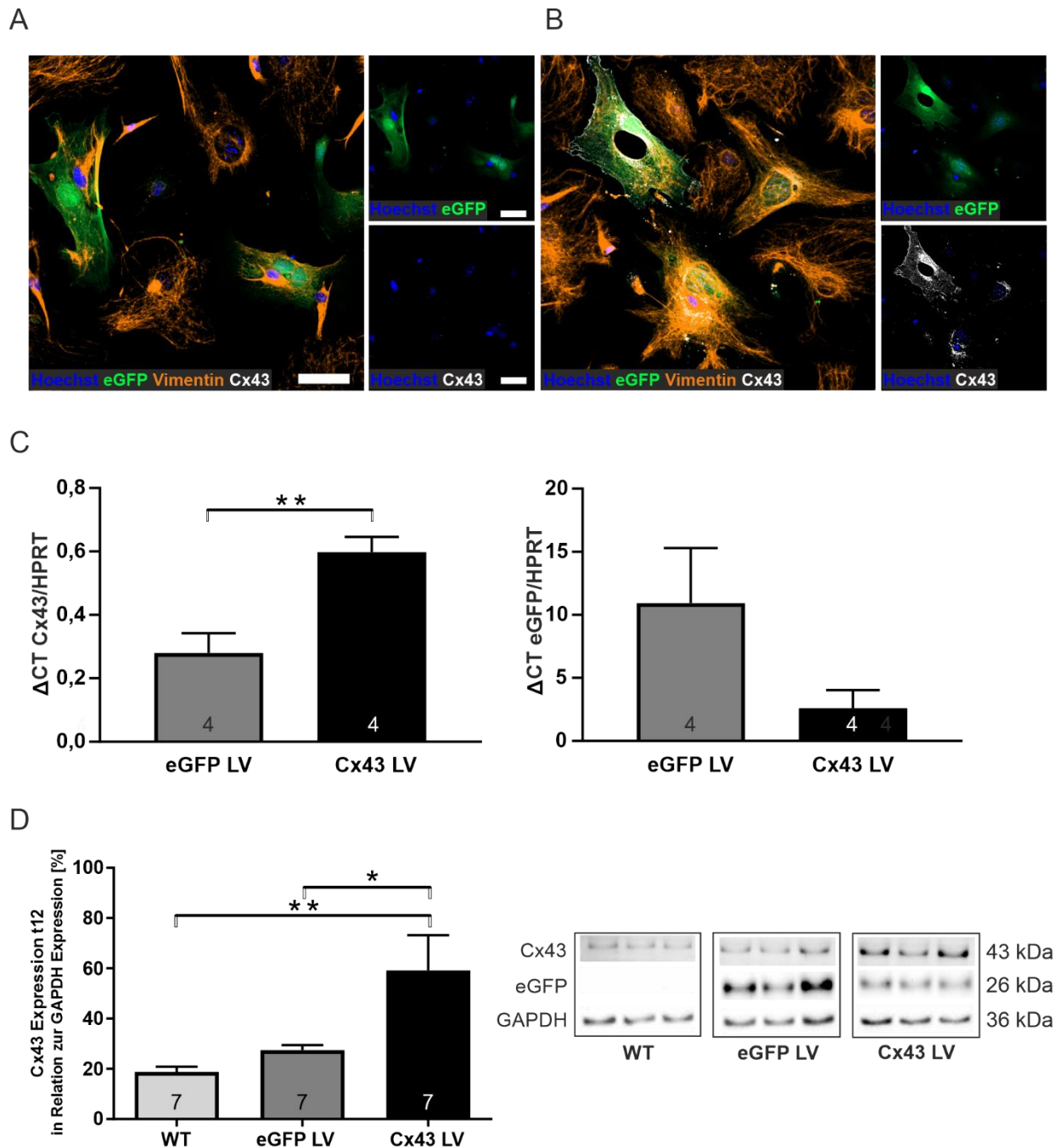


Abbildung 23: Analyse der Cx43 Expression der transduzierten eCF an t12. Histologische Immunofluoreszenz Färbung (blau= Zellkerne, grün= eGFP Fluoreszenz, weiß= Cx43, orange= Vimentin) der Cx43 Proteine in eCF nach Transduktion mit eGFP LV Kontrollvirus (A) oder mit Cx43 LV (B). (C) Nachweis der Cx43 (linker Graph) und eGFP (rechter Graph) Expression auf RNA Ebene mittels quantitativer TaqMan™ qPCR der Lentivirus transduzierten eCF. Angegeben sind hier die ΔCT -Werte aus den gemittelten CT-Werten der eGFP bzw. Cx43 Expression in Relation zu den gemittelten CT-Werten der HPRT Expression (=Housekeeper Gen). (D) Quantitative Analyse der Cx43 Expression mittels Western blot in Relation zur GAPDH Expression. Maßstabsbalken= 50 μ m.

Um die zellbiologischen Auswirkung einer Cx43 Überexpression zu untersuchen, wurde die Genexpression mittels RNA Sequenzierung (RNA Seq) mit Hilfe von P. Freitag und M.Hesse durchgeführt (siehe Punkt 3.3.4). Vorab wurde eine Qualitätsbestimmung der RNA (siehe Punkt 3.3.3) vorgenommen und die RIN's der eingesetzten *in vitro* Proben lagen zwischen 9,7-9,9. Für die RNA-Seq wurden die beiden lentiviral transduzierten eCF-Gruppen (eGFP und Cx43 LV) drei Tage nach Transduktion (= Tag der Transplantation) mit drei biologischen Replikaten (n=3) eingesetzt.

Insgesamt ergab die Hauptkomponenten Analyse („Principle component analysis“, PCA) zwischen eGFP LV und Cx43 LV transduzierten eCF einen Unterschied von 66 % differentiell exprimierten Genen. Das betraf insgesamt 1399 Gene, wovon in den Cx43 LV eCF 702 Gene herunter- und 697 Gene hochreguliert waren, u.a. konnte eine erhöhte Regulation von *Gja1*, dass die Expression von Cx43 G_j kodiert, detektiert werden. Die signifikant differentiell exprimierten Gene (q-Wert (normalisierter p-Wert= <0,05) wurden vorab mittels „Gene ontology“ Analyse selektiert. Diese Analyse (KEGG-Signalwege mit einem p-Wert< 0,05 und kappa score= 0,4) ergab u.a. folgende Signalwege: Adhäsionsverbindungen (15,5 % assoziierte Gene, u.a. *Actn4*), tight junction (13,9 % assoziierte Gene, u.a. *Actn4*, *Gata4*), hypertrophe Kardiomyopathie (16,5 % assoziierte Gene, u.a. *Atp2a2*), arrhythmogene rechts-ventrikuläre Kardiomyopathie (19,5 % assoziierte Gene, u.a. *Atp2a2*), sodass nur spezielle Gene mit in die weitere Analyse eingeschlossen wurden. Der „Vulcano plot“ in Abb. 24A zeigt zunächst einen Überblick der differentiell exprimierten Gene. Der graue Bereich zeigt Gene, die nicht signifikant differentiell exprimiert wurden, wohingegen der blaue Bereich Gene zeigt, die in den Cx43LV eCF signifikant herunterreguliert waren (u.a. Caspase-Gene). Ca. 30-40 der am stärksten reguliertesten Gene im blauen Bereich (nicht beschriftet), sind Gene, die bei der Immunantwort auf virale Partikel eine Rolle spielen. Auf der rechten Seite (roter Bereich) sind Gene dargestellt, die in den Cx43 LV eCF signifikant vermehrt exprimiert waren. Eine detaillierte Zusammenfassung der differentiellen Genexpression zeigt Abb. 24B mit Hilfe der „Heat map“. Hier ist eine deutlich erhöhte Genexpression kardialer Gene (*Tnnt2*, *Gata4*, *Atp2a2*, *Hspg2*) in den eCF mit Cx43 Überexpression zu sehen. Es konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von Genen der Zell-Zell Verbindungen (*Itgb3*, *Itgb4*, *Hspg2*), der Angiogenese bzw. Endothelzellmarker (*Flt1*, *Pecam1*, *Gata4*, *Hspg2*) und

Ionenkanälen (Cacna1c, Kcnh2, Scn5a) detektiert werden. Auffällig ist die Hochregulierung der Apoptose-vermittelten Caspase-Gene (Casp1, Casp8, Casp3) in den eGFP LV Proben.

Zur Überprüfung der RNA-Seq Ergebnisse wurde die Gen-Expression eines Markers aus jeder Gengruppe mittels qPCR untersucht. Die Expression (dargestellt als Δ CT Werte in Relation zur HPRT Expression als Housekeeper) von Tnnt2 (eGFP LV= 1,38 vs. Cx43 LV= 4,74), Gata4 (eGFP LV= 0,347 vs. Cx43 LV= 0,684), Hspg2 (eGFP LV= 0,389 vs. Cx43 LV= 1,24) und Atp2a2 (eGFP LV= 0,921 vs. Cx43 LV= 1,89) ist in den Cx43-eCF auch in der qPCR im Vergleich zur eGFP-Kontrolle deutlich erhöht (Abb. 24C). Die Genexpression von Caspase 1 ist in hingegen in den eGFP-eCF signifikant hochreguliert (eGFP LV= 0,459 vs. Cx43 LV= 0,352).

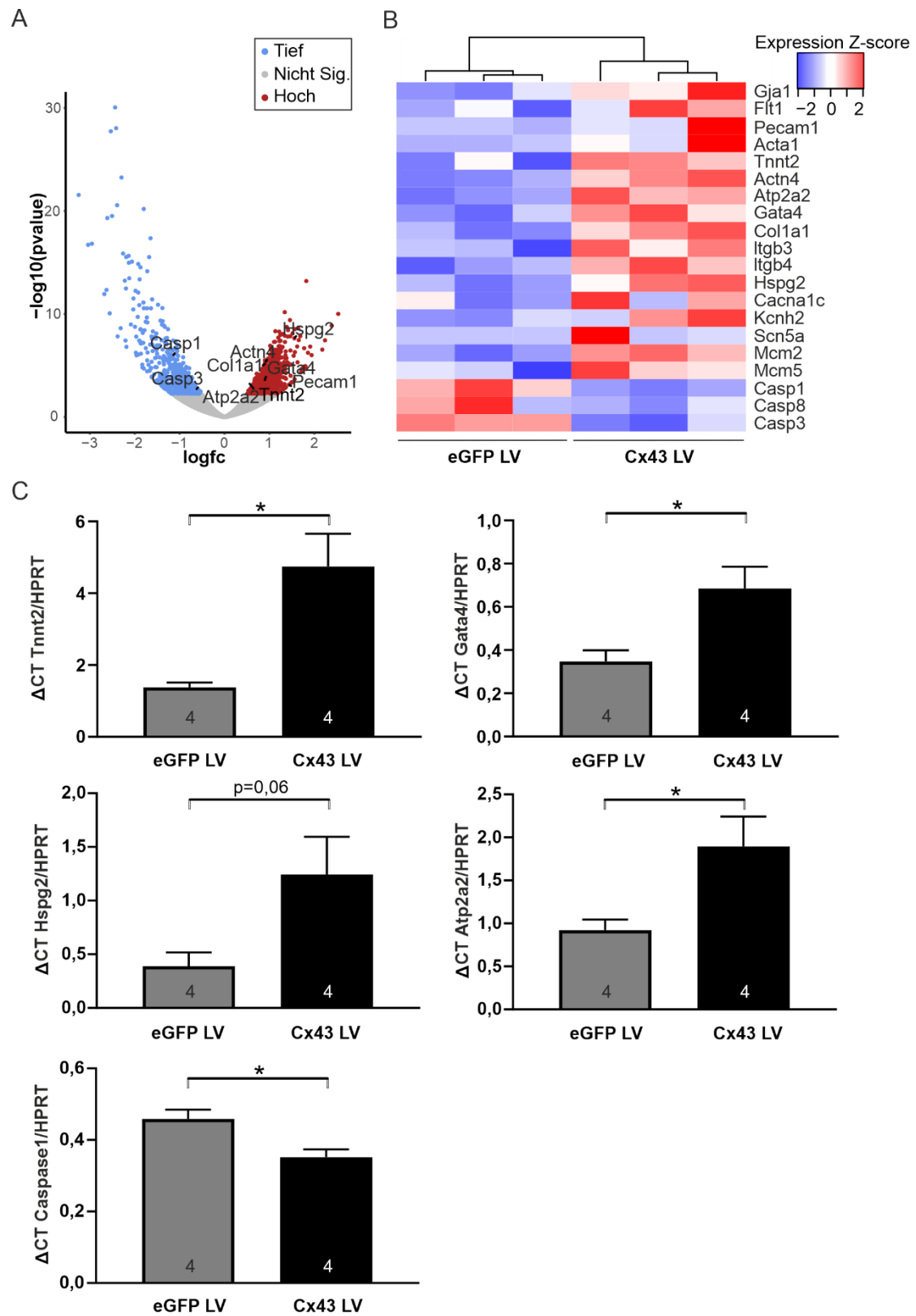


Abbildung 24: RNA Sequenzierung (Seq) der eGFP LV oder Cx43 LV transduzierten eCF an t12. Die RNA Seq der transduzierten eCF (n= 3 pro Gruppe, Transduktion über Nacht, MOI=5, RNA Gewinnung

drei Tage nach Transduktion) (A) Vulcano plot der differentiell exprimierten Gene (Y-Achse= statistische Signifikanz, p-Wert; X-Achse= Ausmaß der Änderung, fold-change) der Cx43 eCF im Vergleich zu den eGFP eCF, die entweder signifikant weniger exprimiert (blau) oder signifikant mehr exprimiert werden (rot). Der graue Bereich beinhaltet Gene, bei denen keine Signifikanz bzw. Änderung vorliegt. (B) Heat map der differentiellen Genexpression für selektive Gene. (C) Nachweis der Genexpression von Tnnt2 (links oben), Gata4 (rechts oben), Hspg2 (Perlecan, mitte links), Atp2a2 (mitte rechts), Col1a1 (unten links) und Caspase 1 (unten rechts) auf RNA Ebene mittels quantitativer TaqMan™qPCR der Lentivirus transduzierten eCF. Angegeben sind hier die Δ CT-Werte aus den gemittelten CT-Werten der Target-Genexpression in Relation zu den gemittelten CT-Werten der HPRT Expression (=Housekeeper Gen).

Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten TGF β eine wichtige Rolle spielt (Asazuma-Nakamura et al. 2009, Cho et al. 2018, Hortells et al. 2019, Funken et al. 2020). Daher wurde die Expression von TGF β in allen drei Gruppen untersucht. Abb. 25 zeigt, dass die erhöhte Expression von Cx43 keinen Einfluss auf die Expression von α SMA und TGF β hatte, da diese in allen getesteten Zellen ähnlich war (Abb. 25A,B,C,D,E).

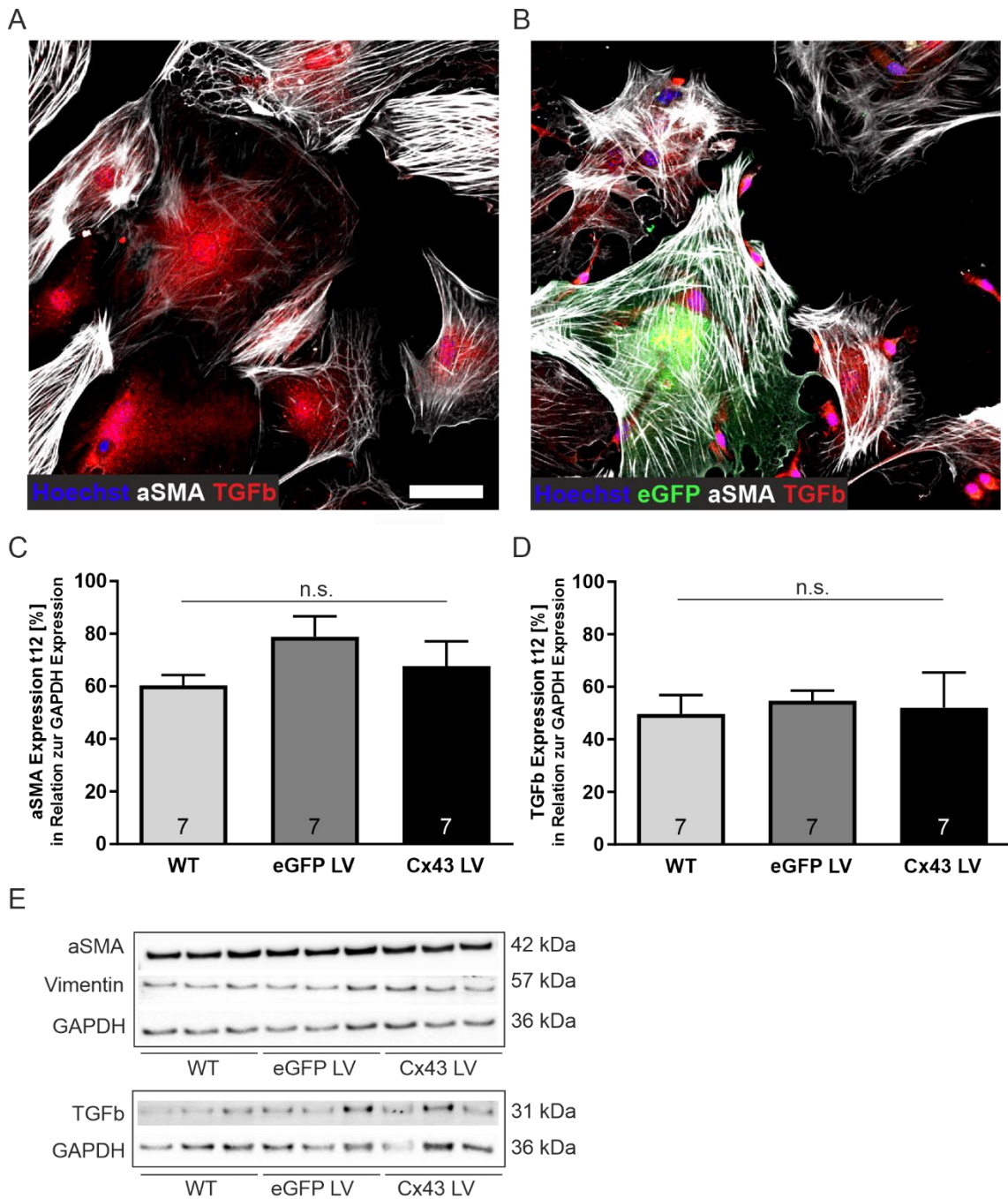


Abbildung 25: Analyse der aSMA und TGfb Expression der nativen (WT) und transduzierten eCF an t12. Immunofluoreszenz Färbung (blau= Zellkerne, grün= eGFP Fluoreszenz, weiß= aSMA, rot= TGfb) der nativen (A) und mit Cx43 LV transduzierten eCF (B). Quantitative Analyse mittels Western blot (in Relation zur GAPDH Expression) hinsichtlich aSMA (C) und TGfb (D) Expression von WT, eGFP-eCF und Cx43-eCF im Vergleich. (E) Darstellung der Western blot Signale. Maßstabsbalken= 50 µm.

4.1.2 Auswirkungen der Zelltransplantation auf die kardiale Funktion innerhalb der ersten zwei postoperativen Wochen

An Tag 12 der Zellkultivierung (vergl. Abb. 22A) erfolgte schließlich die Transplantation der behandelten kardialen Fibroblasten in die Infarkt Narbe. Dazu wurden die transduzierten eCF mittels intramyokardialer Injektion direkt in das Infarktgewebe eingebracht und für weitere 10 Minuten einem Magnetfeld ausgesetzt um die Zellretention zu erhöhen. Diese Methode ist in der AG etabliert und bereits publiziert (Ottersbach et al. 2018). Die kardiale Pumpfunktion wurde mittels Echokardiographie und die elektrische Vulnerabilität mittels Rechtsherzkatheter Stimulation analysiert. Die Funktionsanalysen nach Kurzzeit- Transplantation wurden an Tag 13 (Echo) und 14 (EPU) nach Transplantation durchgeführt.

Zunächst wurde eine nicht-invasive echokardiographische Untersuchung der behandelten Mäuse unternommen (Tag 13 post Transplantation). Mit Hilfe der M-Mode Aufnahmen (Abb. 26A) erfolgte die Analyse der linksventrikulären Pumpfunktion (siehe Punkt 3.2.4, fractional shortening= FS). Es wurde ein deutlicher Funktionsverlust aller Gruppen mit Läsion (20-30 % FS) im Vergleich zur gesunden Sham-Kontrolle (38,4 % FS) festgestellt (Abb. 26B). Nach Vergleich der einzelnen Läsionsgruppen untereinander, wurden signifikante Unterschiede festgestellt. So zeigte die Cx43-eCF- Gruppe eine leichte, aber signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion (Abb. 26B, 28,9 % FS), im Vergleich zur Kryoläsion (22,2 % FS) und zur Kontroll-Gruppe (eGFP LV, 22,7 % FS). Als zweiter Parameter wurde die Verdickung der Vorderwand (AWT), also der Bereich der Zellinjektion, bestimmt (Abb. 26C). Dazu wurde die Differenz der systolischen- und der diastolischen Vorderwandvermessung gebildet (in mm). Auch hierbei konnten signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe mit den Cx43-eCF (Δ AWT= 0,31 mm) im Vergleich zur Kryokontrolle (Δ AWT= 0,16 mm) und der eGFP Kontrollgruppe (Δ AWT= 0,18 mm) gemessen werden. Sham-operierte Mäuse wiesen wie erwartet eine signifikant dickere Vorderwand (Δ AWT= 0,48 mm) im Vergleich zu allen drei Infarktgruppen auf. Theoretisch ist es denkbar, dass die Unterschiede in der linksventrikulären Pumpfunktion auf Effekte durch die Inhalationsnarkose mit Isofluran zurückzuführen sind. Das Narkosegas Isofluran wirkt kardiodepressiv und verlangsamt die Herzfrequenz. Daher wurde bei jeder Echo-

Untersuchung die Herzfrequenz bestimmt und in Abb. 26D ist zu erkennen, dass kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen vorlag.

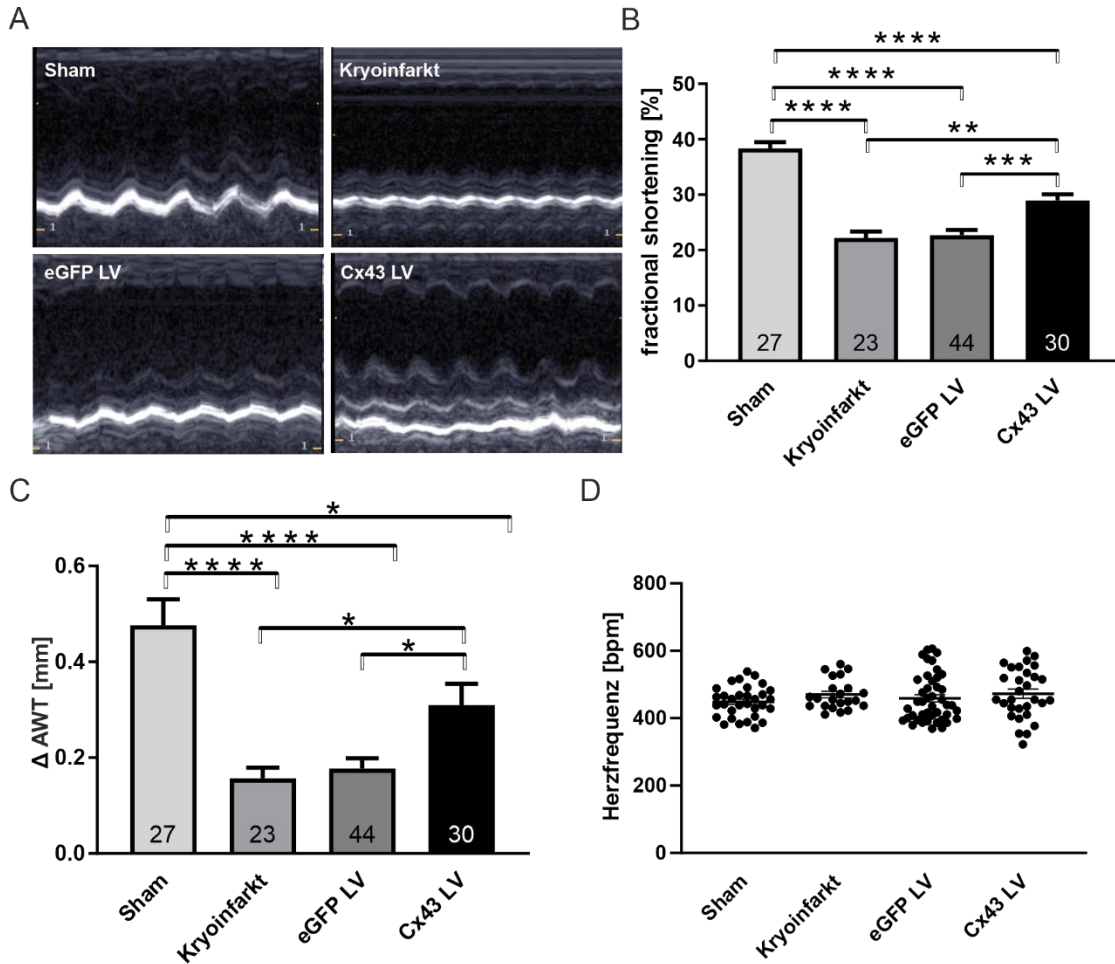


Abbildung 26 Echokardiographische Analyse der Herzfunktion nach Kurzzeit- Transplantation der transduzierten eCF. (A) Beispielhafte M-Mode Aufnahmen auf Papillarmuskelebene für Sham, Kryoinfarkt, eGFP LV und Cx43 LV Gruppe. (B) Analyse der linksventrikulären Pumpfunktion durch Vergleich der Werte des fractional shortening (FS) [%] und (C) der Vorderwandverdickung (= „anterior wall thickening“, AWT) gegeben als Differenz der gemittelten systolischen und diastolischen Abmessungen (in mm) innerhalb der einzelnen Gruppen. (D) Herzfrequenzen während der Echo-Untersuchung (in „beats per minute“, bpm).

An Tag 14 nach Transplantation erfolgte die invasive und finale elektrophysiologische Untersuchung (EPU), die unter Punkt 3.2.5 beschrieben ist. Es wurde die sog. VT Inzidenz Gesamt [%] bestimmt und analysiert, ob in einem Tier während des Durchlaufs des Stimulationsprotokoll eine VT auslösbar war (= 100 %) oder nicht (= 0 %). Als VT definiert wurde das Auftreten von mindestens vier aufeinander folgenden Extrasystolen

nach Stimulus- Applikation (Priori et al. 2015). In Abb. 27A sind beispielhafte Spuren der Oberflächen- und intra-atrialen Ableitungen der beiden Gruppen mit den injizierten Fibroblasten dargestellt. Charakteristisch für die Kontroll-Gruppe (eGFP LV) war das Auftreten einer VT nach Stimulation (Abb. 27A, obere Spur). Bei der Cx43-LV Gruppe (Cx43 LV) hingegen, kehrte der Herzrhythmus nach Auftreten einer kompensatorischen Pause, in den meisten Fällen wieder zum normalen Sinusrhythmus zurück (Abb. 27A, untere Spur). Die Quantifizierung der gesamten VT Inzidenz innerhalb der Kurzzeit-Versuche, ergab zunächst für die Sham und Kryoinfarkt Kontrollen signifikante Unterschiede (Abb. 27B, Sham= 43 % vs. Kryoinfarkt= 88 % VT Inzidenz). Die Ergebnisse der gesunden Kontrolle und die der Infarktkontrolle ohne Behandlung sind wichtige Kontrollen zur Überprüfung der Katheteruntersuchung und sollten signifikante Unterschiede zeigen. Werden anschließend alle Gruppen untereinander verglichen (inkl. der Gruppen mit den transplantierten Fibroblasten), so war eine deutlich signifikante reduzierte VT Inzidenz der Cx43-LV Gruppe (40 % VT Inzidenz) im Vergleich zu Kryoinfarkt- und eGFP LV Kontrollen zu erkennen. Folglich, konnten die transplantierten Cx43 überexprimierenden eCF entscheidend die elektrische Vulnerabilität nach Myokardinfarkt reduzieren und die Auslösbarkeit von VTs senken, ein Effekt, welcher nach der Transplantation von gering Cx43 exprimierenden eCF in der Kontrollgruppe nicht nachweisbar war (eGFP LV, 88 % VT Inzidenz).

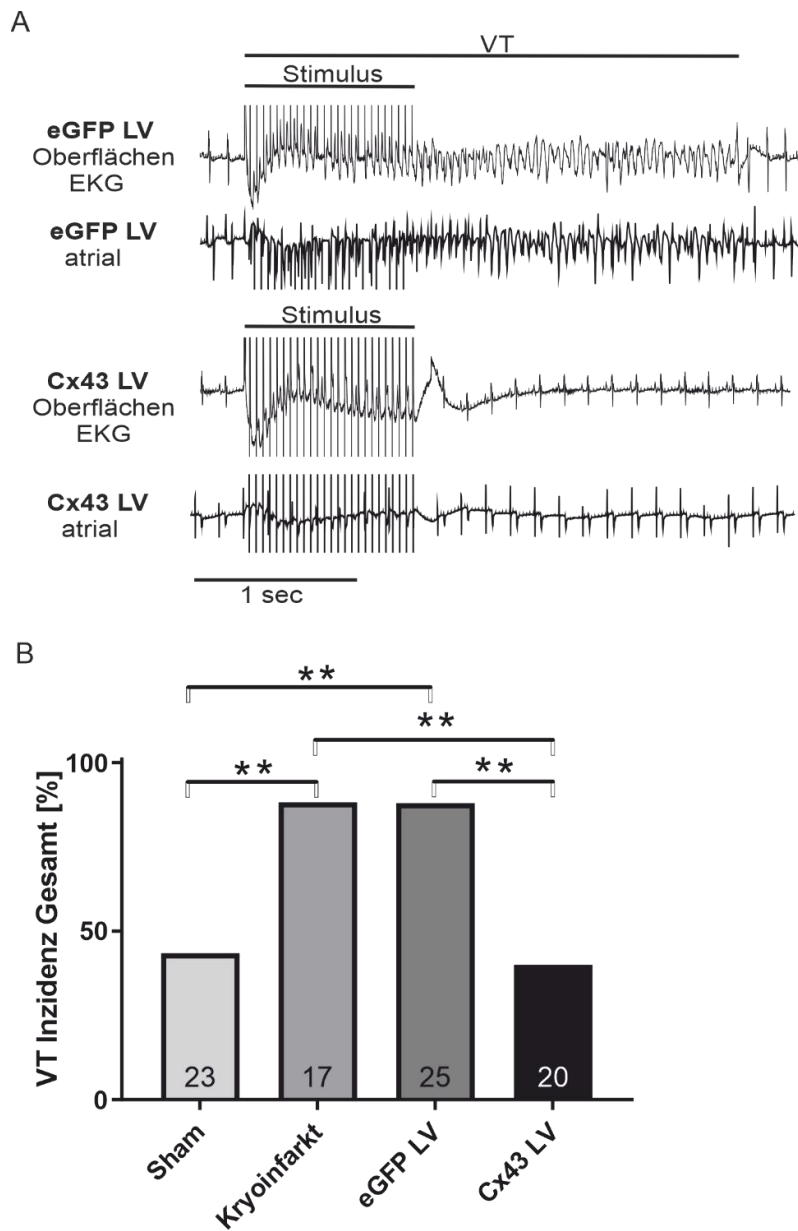


Abbildung 27: Quantifizierung der Gesamt-VT-Inzidenz *in vivo* nach Kurzzeit- Transplantation der transduzierten eCF. (A) Beispielhafte Oberflächen- und intra-atriale EKG Aufnahme einer Kontrollmaus (eGFP LV, obere EKG Aufnahmen) und einer Cx43- LV Maus (untere EKG Aufnahmen). (B) Auslösbarkeit (min. eine VT während des Protokolls) Burst-Stimulation 14 Tage postoperativ in den Sham, Kryoinfarkt, eGFP LV und Cx43 LV Gruppen im Vergleich.

Neben der Beantwortung der Frage, nach der Auslösbarkeit einer VT während des EPU Protokolls, wurden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen weiter differenziert (Abb. 28A,B). Hierbei wurde die Anzahl der VTs pro Maus während einer EPU (Burst Stimulation) gezählt und quantitativ analysiert (Abb. 28A). Die Transplantation von Cx43

überexprimierenden eCF hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der VT-Anzahl pro Maus (Cx43 LV= 1,5 VTs/ Burst Stimulation) im Vergleich zu beiden Läsions-Kontrollen (Kryoinfarkt= 4,3 VTs/ Burst Stimulation und eGFP LV= 3,2 VTs/ Burst Stimulation), falls eines dieser Cx43 behandelten Tiere in der EPU auslösbar war. Bei Sham-operierten Mäusen konnten im Durchschnitt 2,0 VTs pro Burst Stimulation gezählt werden.

Eine qualitative Analyse wurde bei der Bestimmung der Dauer [s] der einzelnen VTs pro Maus durchgeführt (Abb. 28B). Hierbei war auffällig, dass beide Gruppen mit den transplantierten Fibroblasten deutlich kürzere VTs im Vergleich zur Kryoinfarkt-Gruppe zeigten (Kryoinfarkt= 4,7 s vs. eGFP LV= 0,77 s und Cx43 LV= 0,55 s). Dies könnte daran liegen, dass auch normale Fibroblasten zu einem gewissen Grad Cx43 exprimieren und somit eine geringe protektive Wirkung auf die VT-Entstehung zeigen könnten. Die VTs der Sham-Gruppe dauerten im Durchschnitt 0,96 s an.

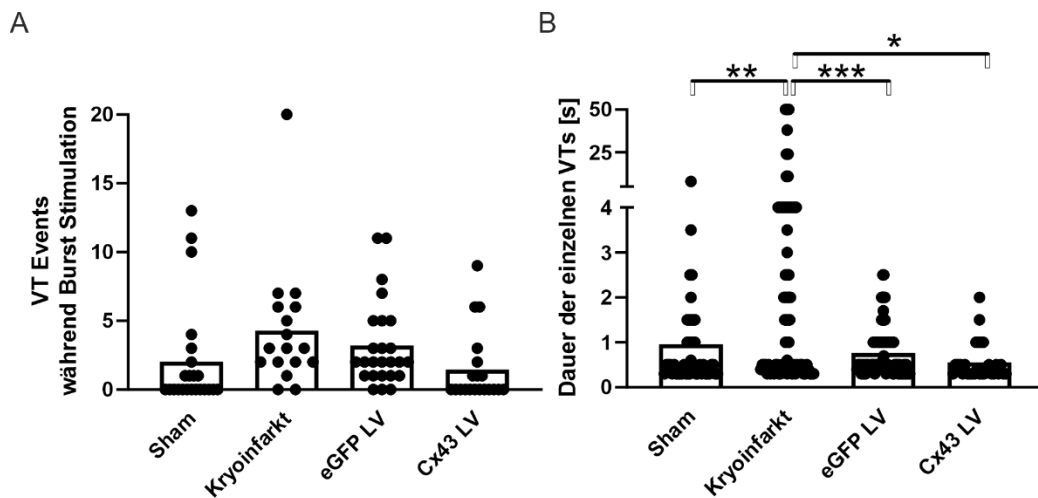


Abbildung 28: Quantitative und qualitative Analyse der einzelnen VTs pro Maus nach Kurzzeit-Transplantation der transduzierten eCF. (A) Quantitative (Anzahl) Bestimmung der einzelnen VTs pro Gruppe und Maus während der EPU. (B) Qualitative (VT Dauer) Untersuchung der einzelnen VTs pro Gruppe und Maus mit Bestimmung der VT-Dauer [s].

4.1.3 Auswirkung der Zelltransplantation auf die kardiale Funktion im Langzeitverlauf

Um Langzeit-Effekte durch die Transplantation Cx43 überexprimierender kardialer Fibroblasten zu untersuchen, wurden dieselben Funktionsanalysen durchgeführt, wie bei

den Kurzzeit-Versuchen bereits beschrieben (siehe Punkt 4.1.2). Die Funktionsanalysen wurden an Tag 55 und 56 nach Zelltransplantation durchgeführt.

Die echokardiographische Funktionsmessung erfolgte an Tag 55 und zeigte einen signifikanten Unterschied der linksventrikulären Pumpfunktion (Abb. 29B) der gesunden Sham-Gruppe (36,6 % FS) im Vergleich zu allen anderen Gruppen mit Läsion (Kryoinfarkt= 21,0 % FS, eGFP LV= 22,5 % FS, Cx43 LV= 24,3 % FS). Somit dauerte die Funktionsverbesserung, welche nach den Kurzzeit-Analysen innerhalb der Cx43 LV-Gruppe entdeckt wurde, nicht bis zu den Langzeit-Versuchen an. Dies könnte zum einen daran liegen, dass weniger der injizierten Fibroblasten diesen längeren Zeitraum in der Narbe überleben und somit keinen positiven Effekt mehr auf die Pumpfunktion ausüben. Es könnte aber auch sein, dass die verbesserte Pumpfunktion durch strukturelle Veränderung der Infarkt Narbe einhergehen, diese aber nicht bis zur Langzeit-Untersuchung andauern.

Auch die in den Kurzzeit-Experimenten festgestellte signifikante Verdickung der Vorderwand innerhalb der Cx43-Gruppe, konnte nach Langzeit Beobachtung nicht mehr festgestellt werden (Abb. 29C). So konnten ähnlich Werte für die Gruppe mit den Cx43-eCF ($\Delta\text{AWT} = 0,25 \text{ mm}$) im Vergleich zur Kryokontrolle ($\Delta\text{AWT} = 0,26 \text{ mm}$) und der Gruppe mit den Kontrollfibroblasten ($\Delta\text{AWT} = 0,19 \text{ mm}$) gemessen werden. Eine signifikante Vorderwandverdickung im Vergleich zu allen drei Infarktgruppen, konnte bei der Sham-Gruppe ($\Delta\text{AWT} = 0,42 \text{ mm}$) auch nach Langzeit-Beobachtung gemessen werden. Insgesamt kam es jedoch zu einer Abnahme der Vorderwandverdickung in allen Läsions-Gruppen bei den Langzeit-Experimenten im Vergleich zu den Kurzzeit-Experimenten. Bei den infarzierten Gruppen lässt sich dies auf das kardiale Remodeling und mit der einhergehenden Verdünnung der Infarkt Narbe erklären. In Bezug auf die Herzfrequenz (Abb. 29D) wurden keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt.

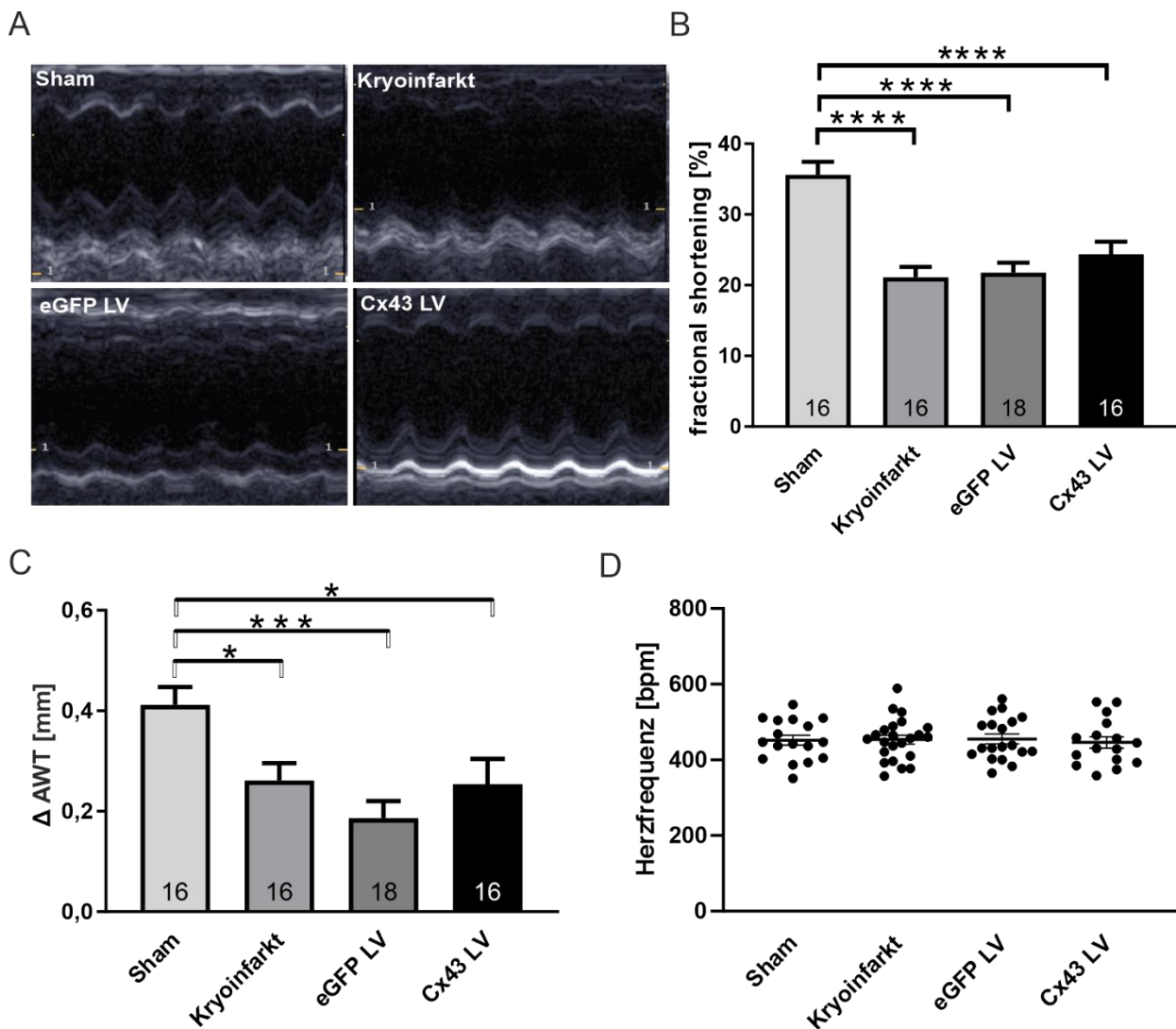


Abbildung 29: Echokardiographische Analyse der Herzfunktion nach Langzeit- Transplantation der transduzierten eCF. (A) Beispielhafte M-Mode Echokardiographie-Aufnahmen auf Papillarmuskelebene für Sham, Kryoinfarkt, eGFP LV und Cx43 LV Gruppe. (B) Analyse der linksventrikulären Pumpfunktion durch Vergleich der Werte des fractional shortening (FS) [%] und (C) der Vorderwandverdickung (= „anterior wall thickening“, AWT) gegeben als Differenz der gemittelten systolischen und diastolischen Abmessungen (in mm) innerhalb der einzelnen Gruppen. (D) Herzfrequenzen während der Echo-Untersuchung (in „beats per minute“, bpm).

Neben der linksventrikulären Pumpfunktion, wurde ebenfalls eine EPU mit elektrischer Stimulation am Tag des Versuchsendes (Tag 56) durchgeführt. Abb. 30B zeigt, dass die VT Inzidenz in der Cx43-Gruppe ebenfalls in den Langzeit-Messungen signifikant

reduziert war. Die Gesamt VT Inzidenz der Cx43-Gruppe (31 % VT Inzidenz) war vergleichbar mit der Sham-Gruppe (35 % VT Inzidenz) und signifikant geringer im Vergleich zur Kryoinfarkt- (94 % VT Inzidenz) und eGFP LV Kontrollgruppe (72 % VT Inzidenz).

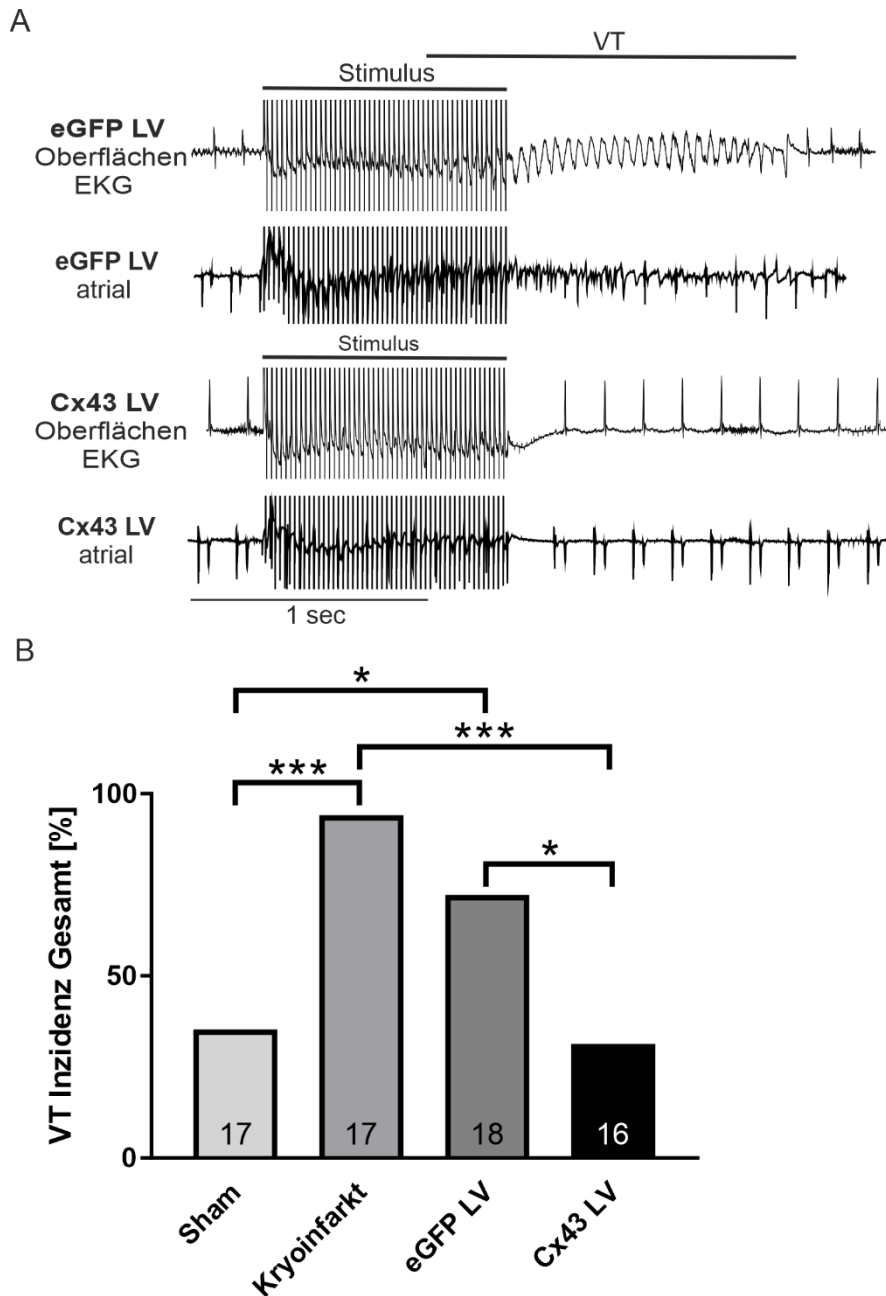


Abbildung 30: Quantifizierung der Gesamt-VT-Inzidenz *in vivo* nach Langzeit- Transplantation der transduzierten eCF. (A) Beispielhafte Oberflächen- und intra-atriale EKG Aufnahme einer Kontrollmaus (eGFP LV, obere EKG Aufnahmen) und einer Cx43- LV Maus (untere EKG Aufnahmen). (B) Gesamte VT

Inzidenz nach Burst-Stimulation der Langzeit EPU Untersuchung (56 Tage nach Transplantation) von Sham, Kryoinfarkt, eGFP LV und Cx43 LV Gruppe im Vergleich.

Genauere Analysen der einzelnen VTs pro Maus (Abb. 31A) ergaben eine signifikant reduzierte Anzahl der VTs pro Maus innerhalb der Cx43 LV-Gruppe (0,4 VTs/ Burst Stimulation), im Vergleich zur Kryoinfarkt (4,8 VTs/ Burst Stimulation) und eGFP LV Kontrollgruppe (4,1 VTs/ Burst Stimulation). Bei gesunden Mäusen (Sham-Gruppe) lag die VT-Anzahl bei 0,4 VTs/ Burst Stimulation. Außerdem waren die ausgelösten VTs der Gruppe mit den Cx43 überexprimierenden eCF tendenziell kürzer andauernd als die VTs der Gruppe mit den Kontroll- eCF (Abb. 31B, p-Wert= 0,05, Cx43 LV= 0,5 s vs. eGFP LV= 0,8 s). Diese deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen (vor allem in Bezug auf die VT Anzahl pro Maus) könnten daran liegen, dass die Infarktnarbe nach 56 Tagen vollständig ausgeheilt ist. Wohingegen nach 14 Tagen noch Unterschiede zwischen den Infarktnarben innerhalb der einzelnen Gruppen vorliegen können.

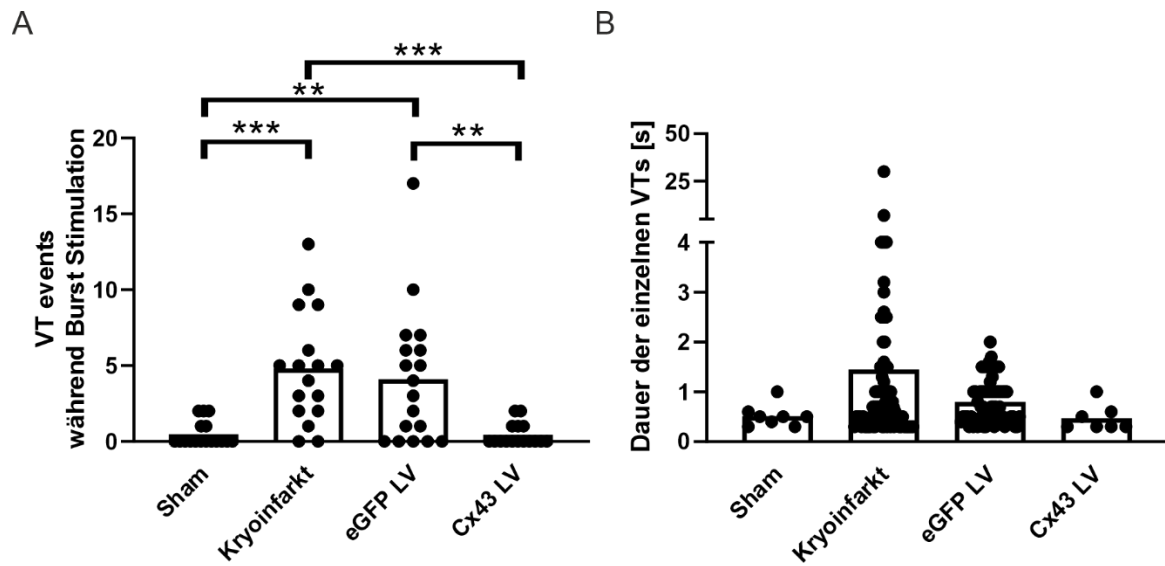


Abbildung 31: Quantitative und qualitative Analyse der einzelnen VTs pro Maus nach Langzeit-Transplantation der transduzierten eCF. (A) Quantitative (Anzahl) Bestimmung der einzelnen VTs pro Gruppe und Maus während der EPU. (B) Qualitative (VT Dauer) Untersuchung der einzelnen VTs pro Gruppe und Maus mit Bestimmung der VT-Dauer [s].

4.1.4 Morphologische Analyse der eingewachsenen Zellen, sowie der Cx43 Expression auf Zell-Protein- und Genexpressionsebene

Die Integration der injizierten Zellen und die je nach transplantierten Zelltyp daraus resultierende gesteigerte Cx43 Expression, wurde anhand von histologischen, sowie immunhistochemischen Untersuchungen untersucht. Zusätzlich wurde Infarktgewebe zur Proteinisolierung gewonnen. Analog zu den funktionellen Messungen, wurden diese Untersuchungen an nach 14 und 56 Tagen postoperativ entnommenen Herzen durchgeführt. Initial wurden unmittelbar nach Herzentnahme makroskopische Aufnahmen der einzelnen Herzen aufgenommen und Areale mit integrierten Zellen, anhand der eGFP Fluoreszenz der Zellen nach lentiviralem Gentransfer identifiziert. Zunächst konnten Areale mit integrierten eGFP⁺ eCF unmittelbar nach Herzentnahme via makroskopischer Aufnahme detektiert werden (Abb. 32A). Sowohl in den Kurzzeit- (Abb. 32A), als auch in den Langzeit-Versuchen (Abb. 32B) konnten über fast den ganzen Narbenbereich verteilt eGFP⁺ Areale nachgewiesen werden.

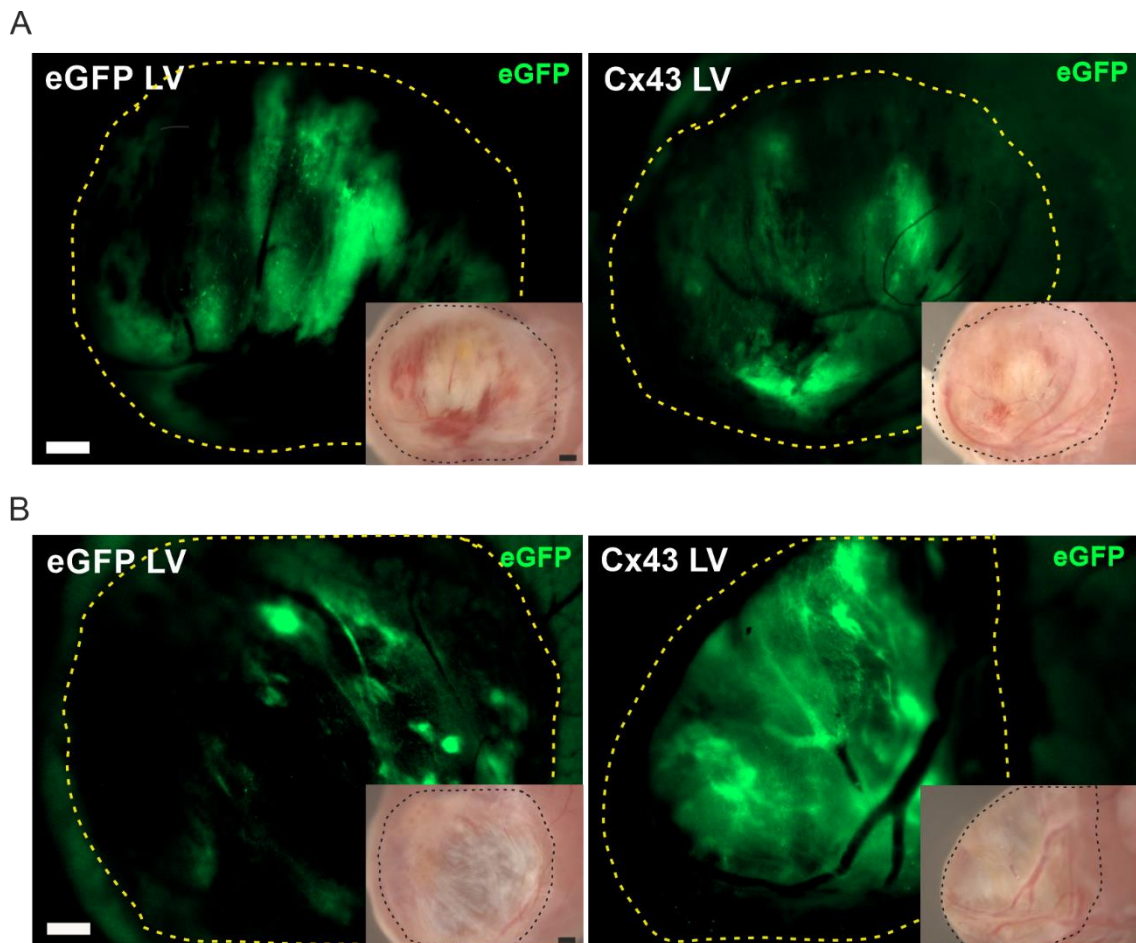
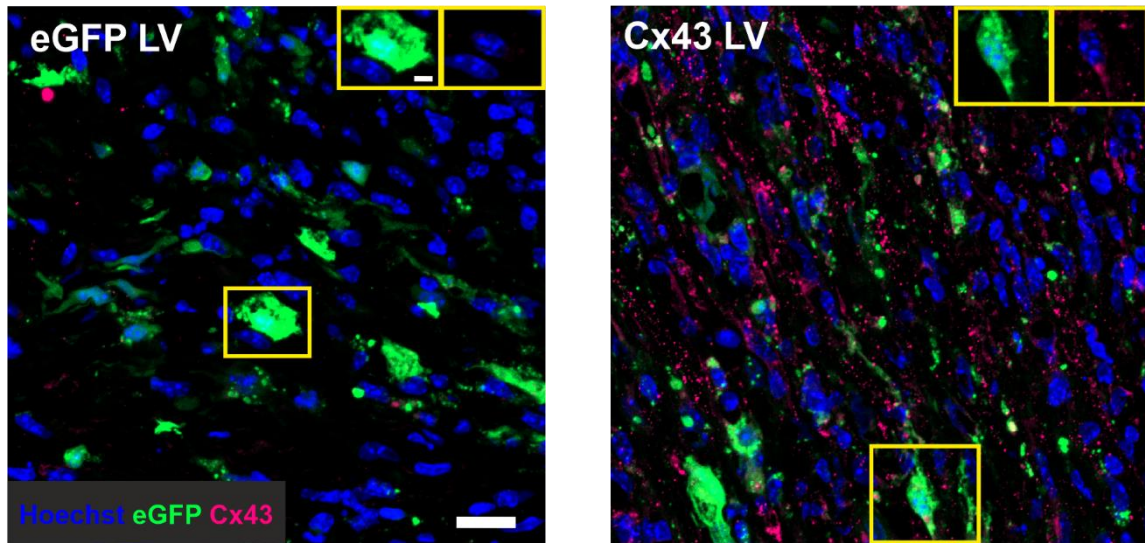


Abbildung 32: Makroskopische Aufnahmen zur Bestimmung des Zellengraftments nach Transplantation transduzierter Fibroblasten. Fluoreszenz Aufnahme (großes Bild) der eGFP Fluoreszenz nach Kurzzeit (A) und Langzeit (B) Transplantation von eGFP LV oder Cx43 LV transduzierten Fibroblasten (gestrichelte gelbe Linie= Infarktareal). Zusätzlich dargestellt: Durchlicht-Aufnahmen des Infarktareals (kleines Bild unten rechts) mit eingezeichnetem Infarkt (gestrichelte schwarze Linie). Maßstabsbalken= 500 µm.

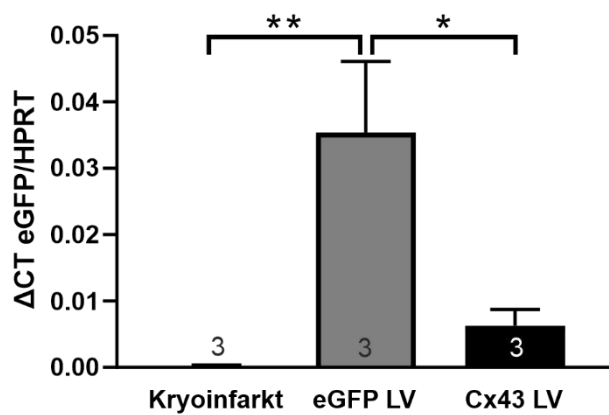
Es wurde bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, dass eCF nach Transduktion mit Cx43 LV *in vitro* vermehrt Cx43 exprimieren. Diese Überexpression hatte auch nach Zelltransplantation messbare Auswirkungen auf den Cx43 Gehalt der gesamten Narbe. Abb. 33A zeigt histologische Aufnahmen nach Cx43 Immunfärbung von Infarktarealen nach Transplantation von eGFP-eCF, sowie nach Injektion von Cx43 überexprimierenden eCF. In beiden Infarkten konnten die eingewachsenen eGFP⁺ eCF wiedergefunden werden. Allerdings ist in den vergrößerten Ausschnitten einer eGFP⁺ Zelle der beiden Bilder rechts oben deutlich zu erkennen, dass nach Transduktion mit Cx43 LV vermehrt

Cx43 im Vergleich zur Kontrolle exprimiert wird (Abb. 33A rechts, pinke Färbung). Zusätzlich wurde die eGFP Expression auf RNA Ebene mittels qPCR untersucht. In Abb. 33B ist eine eGFP Expression nur in den Infarktarealen mit transduzierten eCF zu sehen. Dennoch kann ein deutlich signifikanter Anstieg der eGFP Expression in den Infarktarealen mit den eGFP-eCF ($\Delta\text{CT eGFP/HPRT} = 0,035$) im Vergleich zur Cx43 LV-Gruppe ($\Delta\text{CT eGFP/HPRT} = 0,0063$) und der Kryokontrolle ($\Delta\text{CT eGFP/HPRT} = 0,0003$) verzeichnet werden. Der große Unterschied in der eGFP Expression zwischen beiden lentiviralen Konstrukten wurde bereits *in vitro* festgestellt und lässt sich auf die IRES-Sequenz des Cx43 LV zurückführen (siehe Diskussion). Die Quantifizierung in Abb. 33C zeigt, dass tatsächlich signifikant mehr Cx43 Gehalt (Cx43 LV= 133,4 %) in den Infarkten der transplantierten Cx43⁺ eCF im Vergleich zu den Kontrollinfarkten vorhanden ist (Kryoinfarkt= 17,2 % und eGFP LV= 23,4 %).

A



B



C

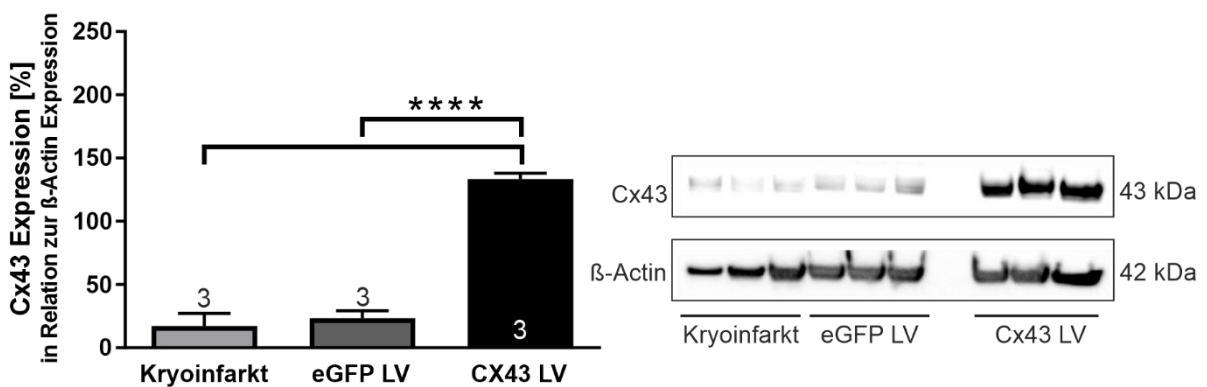
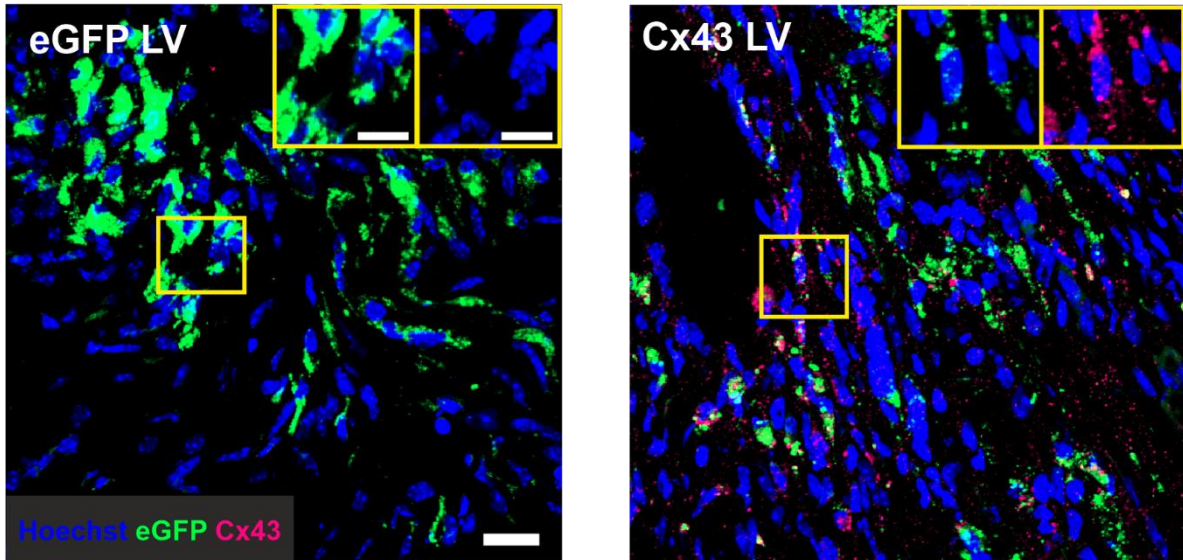


Abbildung 33: Analyse der Cx43 Expression im Infarktareal nach Kurzzeit Transplantation der transduzierten eCF. (A) Histologische Aufnahme des Infarktareals 14 Tage nach Transplantation von eGFP LV transduzierten Kontrollfibroblasten (linkes Bild, eGFP LV) und nach Transplantation von Cx43 überexprimierenden Fibroblasten (rechtes Bild, Cx43 LV). Es wurde eine immunohistologische Färbung

von Cx43 durchgeführt (blau= Zellkerne, grün= eGFP, pink= Cx43). (B) Nachweis der eGFP Expression auf RNA Ebene mittels quantitativer qPCR der Infarktareale von Kryoinfarkt im Vergleich zu den transplantierten Infarkten. Angegeben sind hier die Δ CT-Werte aus den gemittelten CT-Werten der eGFP Expression in Relation zu den gemittelten CT-Werten der HPRT Expression (=Housekeeper Gen). (C) Quantifizierung der Cx43 Expression mittels Western blot im Vergleich zur β -Actin Expression (=Housekeeper Protein) innerhalb der Infarktareale von Cx43 LV und Kontrollen (Kryoinfarkt und eGFP LV). Maßstabsbalken= 20 μ m.

Ähnliche Analysen wurden auch innerhalb der Langzeit Experimente vorgenommen. Hier konnten die eGFP⁺ Fibroblasten mikroskopisch innerhalb des Infarktareals wiedergefunden werden (Abb. 34A). Der Vergleich mit eGFP⁺ Kontrollfibroblasten zeigte, dass die mit Cx43 LV transduzierten eCF immer noch vermehrt Cx43 exprimieren (Abb. 34A, Bildausschnitte oben rechts). Das Cx43 Signal konnte ebenfalls wieder mittels Western Blot quantifiziert werden (Abb. 34B). So ist der Gehalt an Cx43 in der Infarktnarbe auch nach 56 Tagen bei Transplantation von Cx43⁺ eCF (Cx43 LV= 209 %) stets signifikant erhöht im Vergleich zu den beiden verwendeten Kontrollen (Kryoinfarkt= 62,1 % und eGFP LV= 65,5 %).

A



B

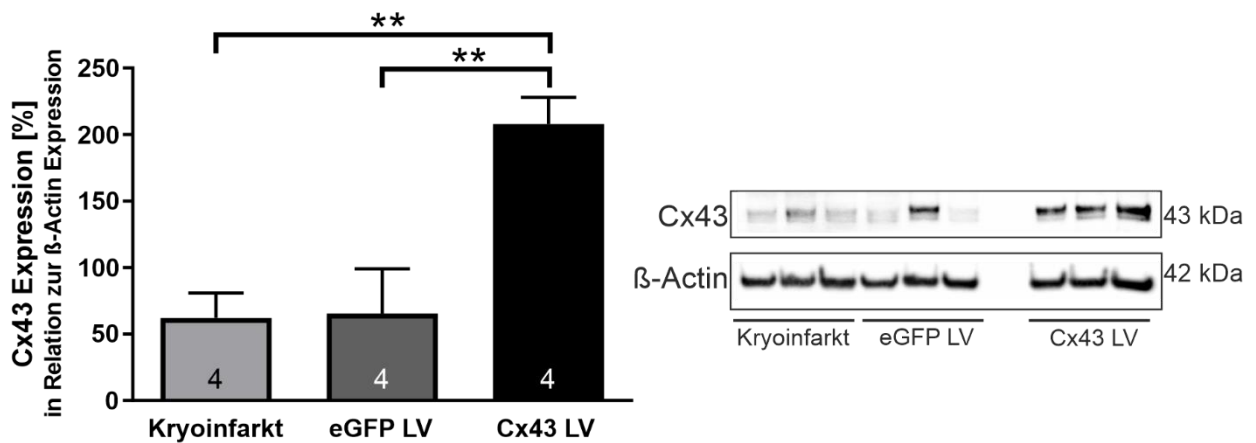


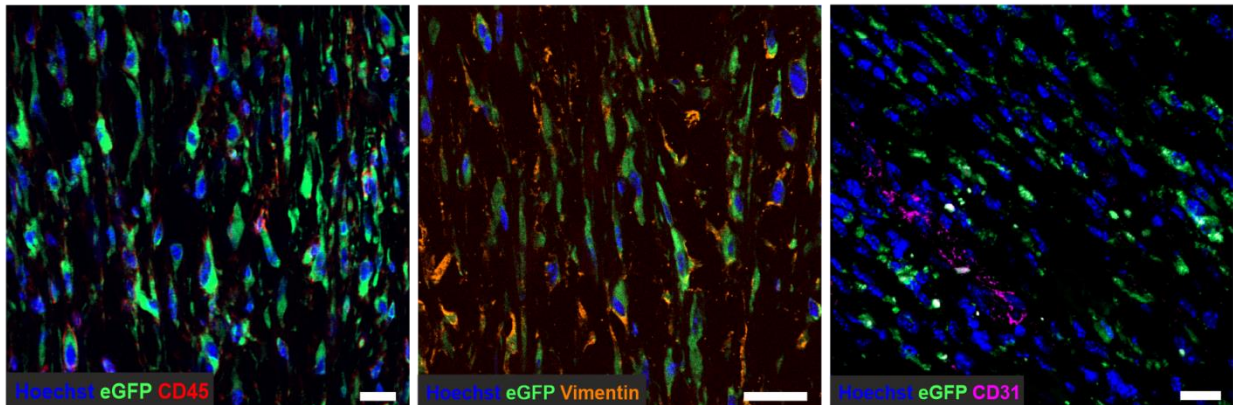
Abbildung 34: Analyse der Cx43 Expression im Infarktareal nach Langzeit Transplantation der transduzierten eCF. (A) Histologische Aufnahme des Infarktareals 56 Tage nach Transplantation von eGFP LV transduzierten Kontrollfibroblasten (linkes Bild, eGFP LV) und nach Transplantation von Cx43 überexprimierenden Fibroblasten (rechtes Bild, Cx43 LV). Es wurde eine immunohistologische Färbung von Cx43 durchgeführt blau= Zellkerne, grün= eGFP, pink= Cx43). (B) Quantifizierung der Cx43 Expression mittels Western blot blot im Vergleich zur β -Actin Expression (=Housekeeper Protein) innerhalb der Infarktareale von Cx43 LV und Kontrollen (Kryoinfarkt und eGFP LV). Maßstabsbalken= 20 μ m.

4.1.5 Immunhistochemische Charakterisierung des Infarktareals im Bereich der integrierten transduzierten eCF und Verbleib der Nanopartikel

Um einen Einblick in potentielle morphologische Veränderungen des Infarktgewebes nach Transplantation der transduzierten eCF zu bekommen, wurden histologische Färbungen einiger wichtiger Zellmarker durchgeführt. Interessant war hierbei die Frage, ob die Cx43 überexprimierenden eCF einen Effekt auf zellulären Strukturen der Infarktnarbe haben. Zusätzlich wurde analysiert ob eine Immunantwort auf die injizierten eCF und MNP vorlag. Zwar waren die behandelten Mäuse immunsupprimiert, dennoch kann durch die Kombination aus Virusbehandlung und MNP Beladung der transplantierten Zellen eine Immunantwort nicht ausgeschlossen werden.

In Abb. 35 sind die immunhistochemischen Färbungen von Infarktarealen 14 Tage nach Transplantation von eGFP LV (Abb. 35A) oder Cx43 LV (Abb. 35B) transduzierten eCF zu sehen. Im Allgemeinen waren keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen zu erkennen. Nach 14 Tagen waren jedoch in beiden Gruppen vereinzelt CD45⁺ Immunzellen zu finden (Abb. 35A,B; rote Fluoreszenz). In beiden Versuchsgruppen konnte ein Vimentin⁺ Signal (Abb. 35A,B; orange Fluoreszenz) der transplantierten eCF (eGFP positiv, grüne Fluoreszenz) nachgewiesen werden. Insgesamt dominieren die Vimentin⁺ Zellen das Infarktareal bei beiden Gruppen. Dies ist allerdings zu erwarten, da Vimentin vor allem von Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen exprimiert wird und diese drei Zelltypen vorwiegend in der Infarktnarbe zu finden sind (Wan et al. 2013, Prabhu and Frangogiannis 2016). Bezüglich der ebenfalls vereinzelt sichtbaren CD31⁺ Endothelzellen zeigte sich mengenmäßig ebenfalls kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

A



B

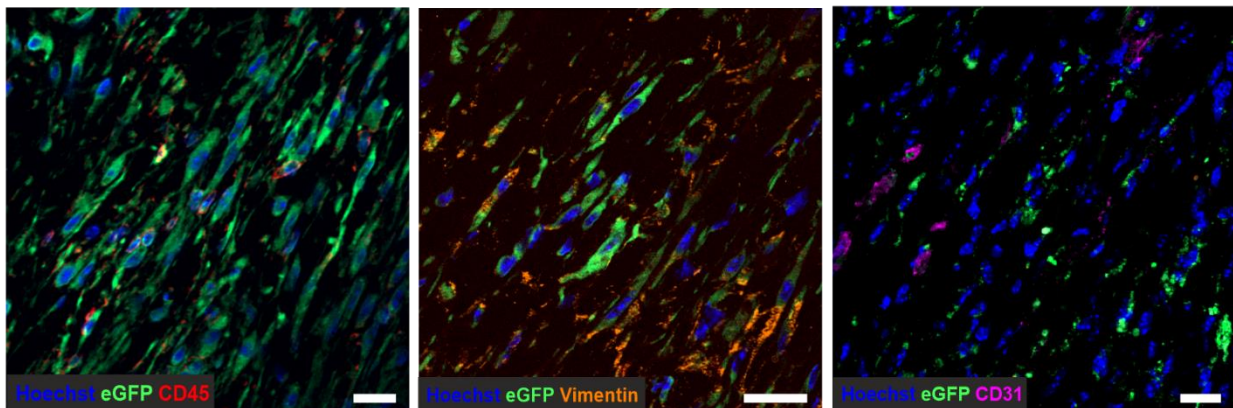
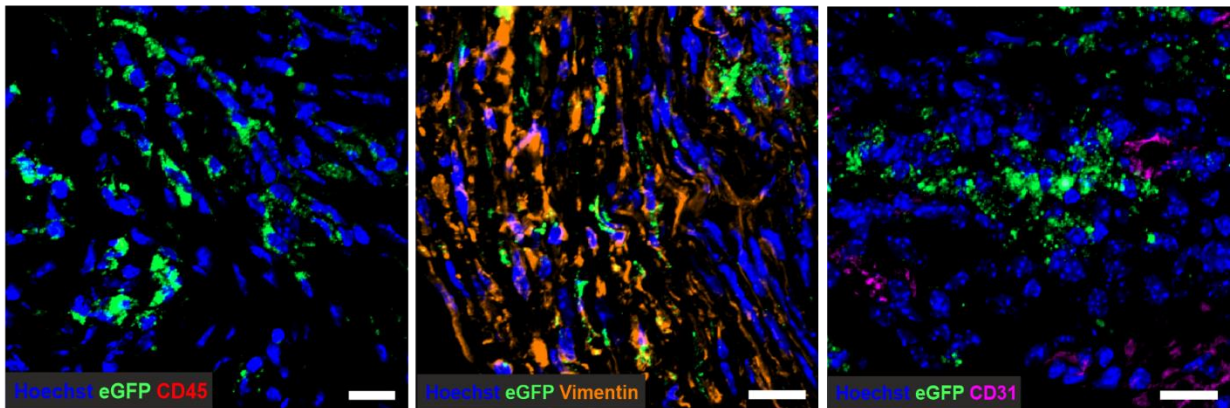


Abbildung 35: Histologische Analyse der engrafteten Zellen des Infarktareals nach Kurzzeit Transplantation von transduzierten embryonalen Fibroblasten. Immunhistologische Färbung von Immunzellen (blau= Zellkerne, grün= eGFP, rot= CD45), Zellen des Zytoskeletts (u.a. Fibroblasten, blau= Zellkerne, grün= eGFP, orange= Vimentin) und Endothelzellen (blau= Zellkerne, grün= eGFP, pink= CD31) 14 Tage nach Transplantation von eGFP LV transduzierten Fibroblasten (A) und Cx43 überexprimierenden Fibroblasten (B). Maßstabsbalken 20 μ m.

Auch im Infarktgewebe der Langzeit überlebenden Tiere sind keine zellulären Unterschiede nach Transplantation von eGFP LV (Abb. 36A) und Cx43 LV transduzierten eCF (Abb. 36B) zu erkennen. Bei beiden Gruppen waren keine Immunzellen (CD45⁺) mehr in den Infarktenarealen nachzuweisen. Dies liegt vor allem daran, dass nach 56 Tagen die Narbenbildung vollständig abgeschlossen ist. Endothelzellen der größeren Gefäße sind ebenfalls auch nach 56 Tagen in beiden Gruppen nachweisbar, jedoch scheinen diese deutlich mehr vasikulär organisiert zu sein. Die in den Zellverband integrierten eGFP⁺ eCF konnten deutlich in der Narbe bei beiden Gruppen identifiziert

werden und zeigten erwartungsgemäß ein Vimentin positives Signal (Abb. 36A,B; mittlere Bilder).

A



B

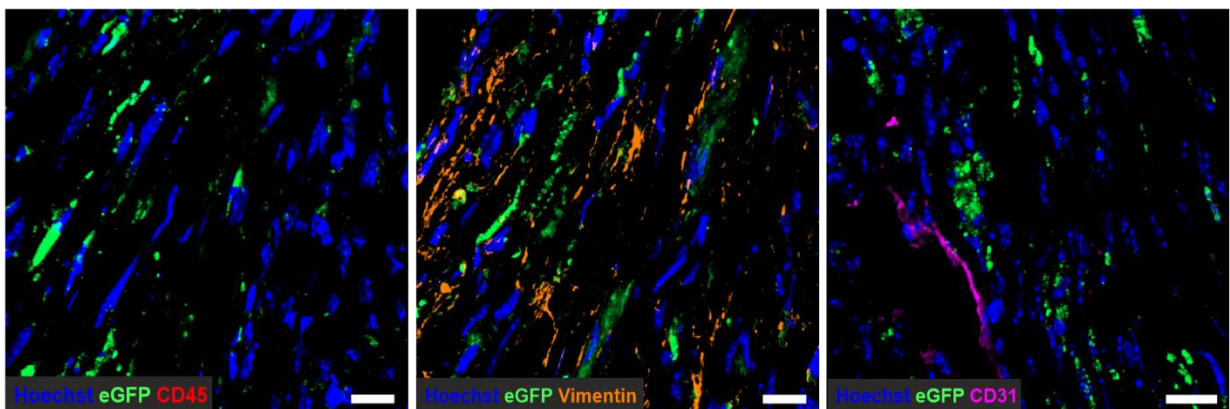


Abbildung 36: Histologische Analyse der engrafteten Zellen des Infarktareals nach Langzeit Transplantation von transduzierten embryonalen Fibroblasten. Immunhistologische Färbung von Immunzellen (blau= Zellkerne, grün= eGFP, rot= MNP, weiß= CD45), Zellen des Zytoskeletts (u.a. Fibroblasten, blau= Zellkerne, grün= eGFP, orange= Vimentin) und Endothelzellen (blau= Zellkerne, grün= eGFP, pink= CD31) 56 Tage nach Transplantation von eGFP LV transduzierten Fibroblasten (A) und Cx43 überexprimierenden Fibroblasten (B). Maßstabsbalken 20 μ m.

Neben dem Cx43-Gehalt in der Narbe, interessierte mich, wie viele der injizierten Fibroblasten ($2,0 \times 10^5$ eCF/Infarkt) letztendlich in die Narbe integrierten und vor allem nach einer längeren Beobachtungszeit noch im Infarkt verblieben. Dazu wurden exemplarisch drei Herzen aus beiden Gruppen (eGFP LV und Cx43 LV) histologisch gefärbt und die einzelnen Zellen anhand ihrer eGFP Expression ausgezählt (siehe Punkt 3.5.7 Zellquantifizierung). Da vorallem mit Verwendung des Cx43 LV eine relativ schwache eGFP-Fluoreszenz einhergeht, wurden die Schnitte mit einem eGFP Antikörper

nachgefärbt. Abb. 37 zeigt die Anzahl der eingewachsenen eGFP⁺ und Vimentin⁺ Fibroblasten nach Extrapolation. In Abb. 37A wird deutlich, dass nach 14 Tagen post Transplantation noch sehr viele eGFP⁺ Fibroblasten im Infarkt vorhanden waren (eGFP LV= ca. 67.000 Zellen und Cx43 LV= ca. 61.000 Zellen). Im Laufe des kardialen Remodelings gehen einige Zellen verloren, sodass die Anzahl der eGFP⁺ Fibroblasten nach 56 Tagen in beiden Gruppen deutlich reduziert wurde (Abb. 37B: eGFP LV= ca. 20.000 Zellen und Cx43 LV= ca. 15.000 Zellen). Abhängig vom verwendeten viralen Vektor wurden in Kurz- und Langzeit Experimenten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Gruppen festgestellt.

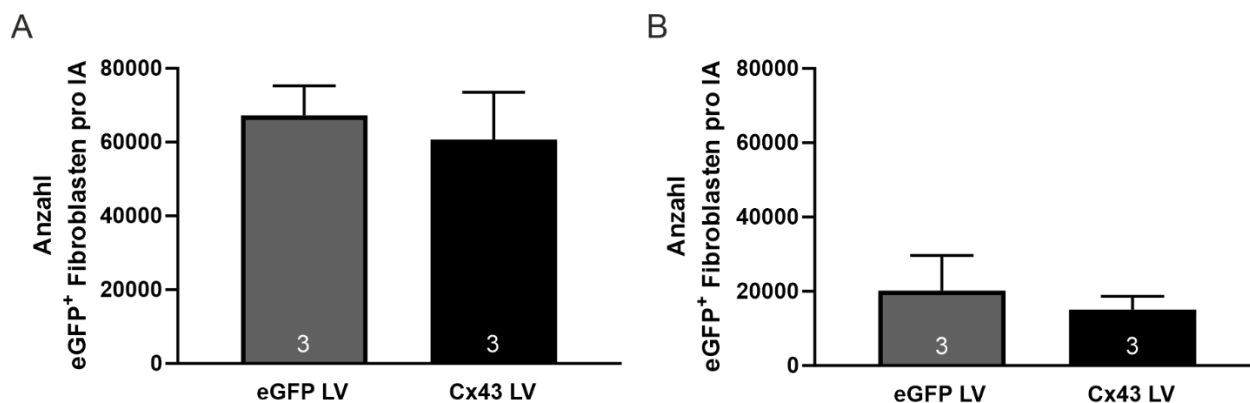


Abbildung 37: Quantifizierung der eingewachsenen transplantierten eCF. Anzahl der eGFP⁺ Fibroblasten im Infarktareal nach Kurzzeit- (A) und Langzeit Transplantation (B).

Ein kritischer Punkt ist der Verbleib der MNP innerhalb der Narbe. Die in früheren Studien verwendeten SoMag5-MNP zeichneten sich durch einen relativ langen Verbleib in der Narbe aus, sodass auch nach 56 Tagen noch viele Partikel mittels Eisenfärbung detektiert werden konnten (Ottersbach et al. 2018). Charakteristisch für die in diesem Projekt verwendeten Tamra-MNP, ist vor allem eine geringere Neigung zur Aggregatbildung (im Vergleich zu den SoMag5), sodass sie mittels Eisenfärbung nur schlecht nachweisbar sind (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für die Beurteilung des MNP-Verbleibes Übersichtsbilder der Infarktareale nach Kurz- und Langzeit Transplantation aufgenommen und die Eigenfluoreszenz der MNP anhand des enthaltenen roten Fluorochroms beurteilt (Abb. 38). In Abb. 38A ist in allen Herzen deutlich die Ansammlung von MNP im Infarktareal (rote Fluoreszenz) zu erkennen, die sich aufgrund der magnetbasierten Transplantation auf einen Teil der Narbe beschränkt. Allerdings waren deutliche Variationen in Bezug auf

die MNP-Menge zwischen den einzelnen Herzen zu erkennen. Dies lässt sich zum einen auf die Qualität der Injektionen zurückführen, außerdem wurden die zu transplantierten Fibroblasten vorab nicht sortiert, sodass sie nicht unbedingt dieselbe Menge an MNP aufwiesen. Es ist auch nicht auszuschließen, dass 14 Tage postoperativ schon ein Teil der initial injizierten MNP von den vor allem während der ersten Woche eingewanderten Immunzellen resorbiert worden ist. Im Langzeitverlauf waren oftmals keine oder nur sehr wenige MNP in den untersuchten Herzen zu sehen (Abb. 38B), was für eine weitere Elimination der MNP spricht. In Voruntersuchungen erfolgte diese v.a. renal und hepatisch (Ottersbach et al. 2018).

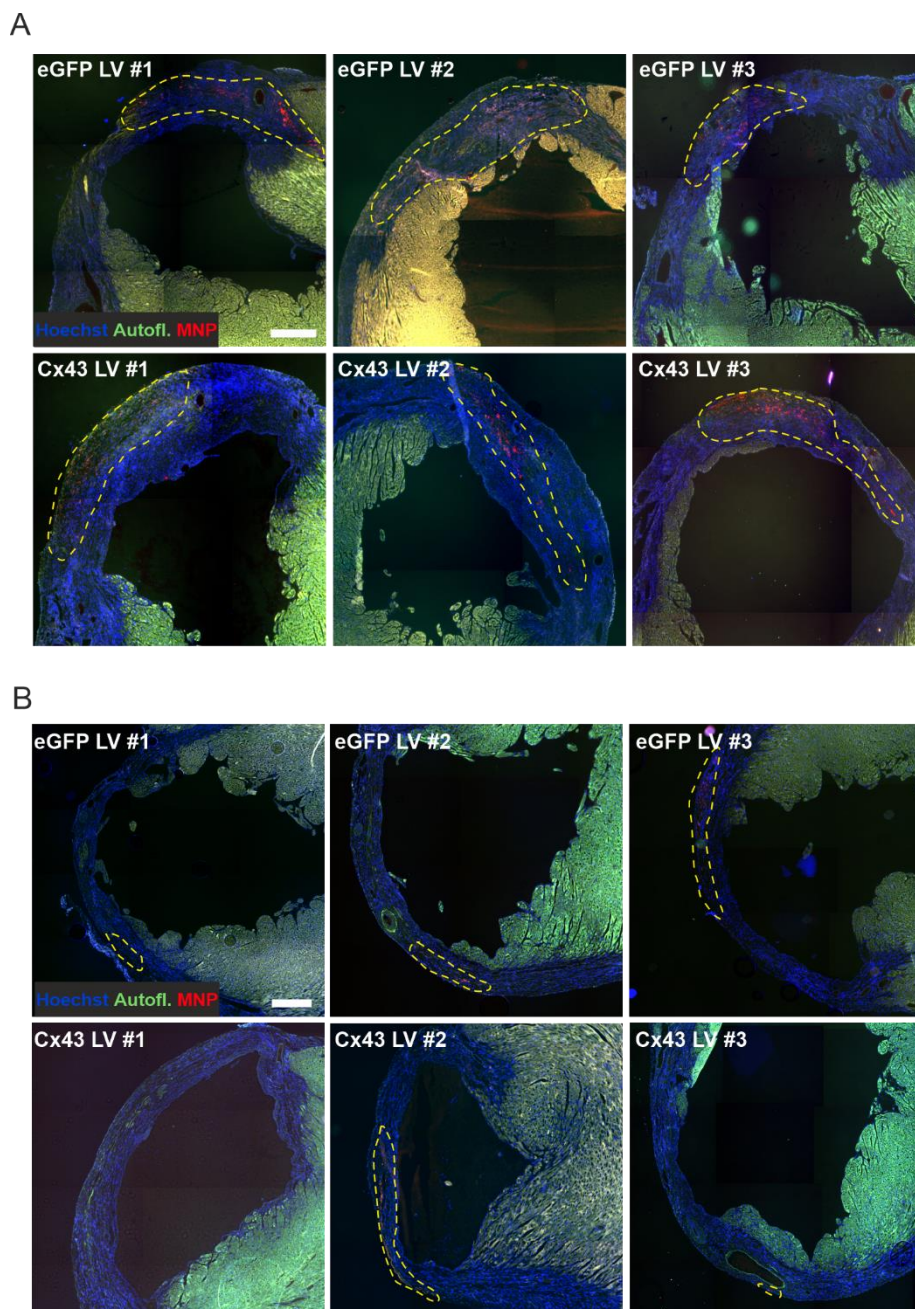


Abbildung 38: Histologische Übersichtsbilder der Infarktareale nach Transplantation der transduzierten und mit MNP beladenen Fibroblasten. (A) Beispielhafte Fluoreszenzaufnahmen (jeweils drei pro Gruppe) der Infarktareale nach Kurzzeit und (B) nach Langzeit Transplantation der behandelten Fibroblasten (blau= Zellkerne, grün= Autofluoreszenz, rot= MNP). Das eingezeichnete Areal (gelbe gestrichelte Linie) zeigt die Ansammlung der MNP. Maßstabsbalken= 500 μ m.

4.1.6 Infarktgrößenbestimmung

Mich interessierte ebenfalls, ob das Einbringen von Kollagen produzierenden Fibroblasten einen Einfluss auf die Narbenbildung im Läsionsbereich hat. Fibroblasten sind z.B.

Hauptproduzenten von Kollagen, welches Auswirkungen auf die Infarktgröße oder Infarktstärke haben könnte und sich somit auch indirekt auf die ventrikuläre Pumpfunktion auswirken könnte. Daher wurden morphometrische Messungen von Herzen nach isoliertem Kryoinfarkt und Herzen mit zusätzlich transplantierten eCF vorgenommen. Die Größe der Infarkte wurde auf zwei verschiedene Weisen ermittelt.

So wurde zunächst die Infarktoberfläche anhand der makroskopischen Aufnahmen ermittelt (Abb. 39) und alle drei Gruppen (Kryoinfarkt, eGFP LV und Cx43 LV) verglichen. Zwischen diesen Gruppen waren nach Kurzzeit Transplantation (Abb. 39A) keine Unterschiede vorhanden. Dasselbe galt für die Langzeit Versuche (Abb. 39B). Dennoch ist zu erkennen, dass die Infarktoberfläche von ca. 15-17 mm² in den Kurzzeit-Versuchen auf ca. 20-23 mm² in den Langzeit Versuchen zunahm.

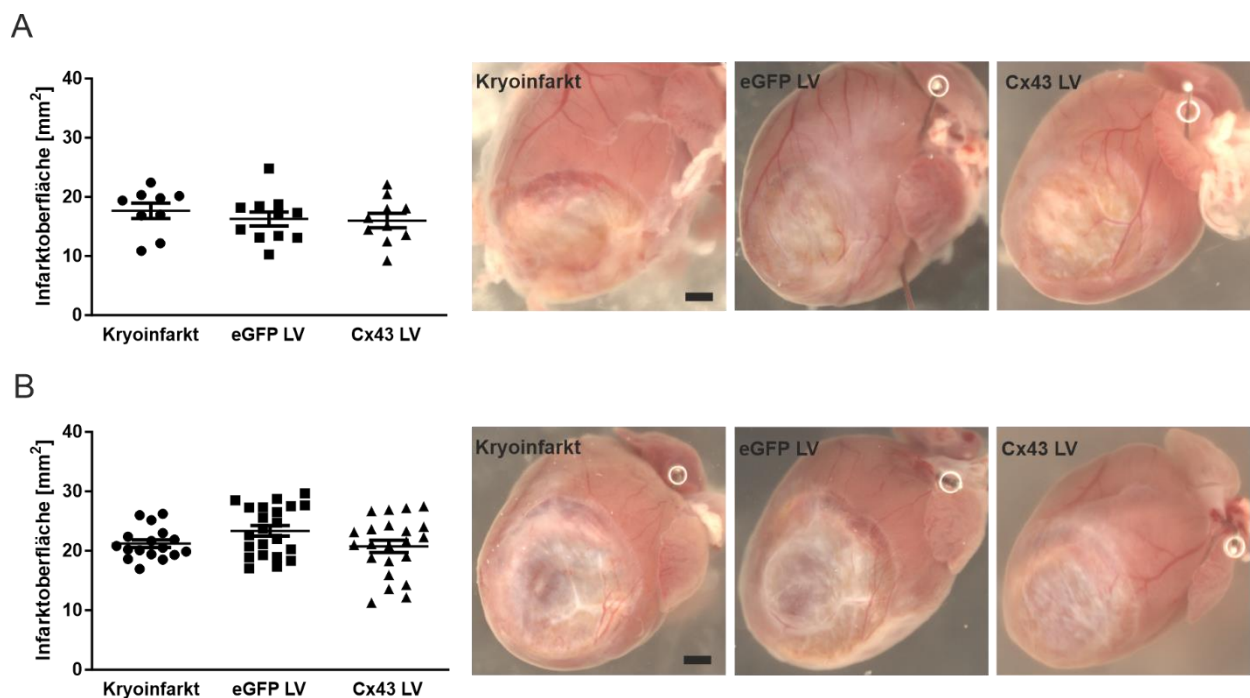
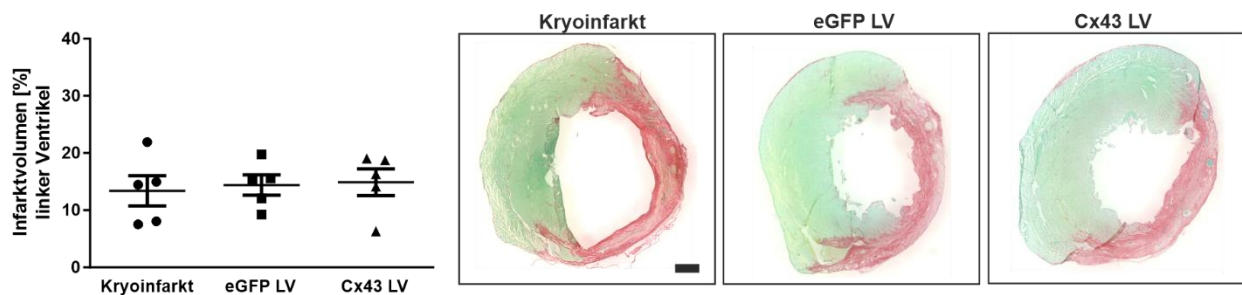


Abbildung 39: Bestimmung der Infarktoberfläche anhand makroskopischer Aufnahmen. (A) nach Kurzzeit und (B) nach Langzeit Transplantation von LV transduzierten Fibroblasten im Vergleich zur Kryoinfarkt Kontrollgruppe. Maßstabsbalken= 1000 µm.

Als zweite Methode, wurde die Analyse des Infarktvolumens des gesamten linken Ventrikels vorgenommen. Dazu wurden histologische Aufnahmen der Sirius-red/fast-green Färbungen verwendet (siehe Punkt 3.5.8.2). Es waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nach Kurzzeit Transplantation (Abb. 40A), sowie nach

Langzeit Transplantation (Abb. 40B) erkennbar. Vergleicht man jedoch Kurzzeit- und Langzeitwerte, so verringerte sich das Infarktvolumen von ca. 15 % bei den Kurzzeit Versuchen auf ca. 11 % bei den Langzeit Versuchen. Bei tendenziell eher größer werdender Infarktoberfläche (Abb. 39) ist dies durch, auch in den Abbildungen deutlich zu erkennende, Ausdünnung des infarzierten Myokards im Zeitverlauf zu erklären. Die transplantierten eCF scheinen keine direkte Stabilisierung der Infarkt Narbe zu besitzen, was auch die echokardiographischen Untersuchungen unterstützen, sodass die geringere Arrhythmieneigung nach Cx43 überexprimierenden eCF vor allem durch den erhöhten Cx43 Gehalt in der Narbe zu erklären ist.

A



B

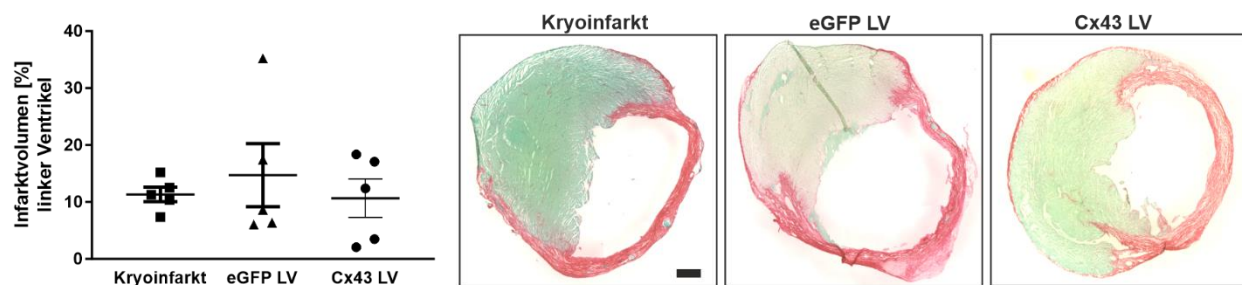


Abbildung 40: Bestimmung des Infarktvolumens des linken Ventrikels. (A) nach Kurzzeit und (B) nach Langzeit Transplantation von LV transduzierten Fibroblasten im Vergleich zur Kryoinfarkt Kontrollgruppe. Histologische Färbungen: Sirius-red/Fast-green Färbung (grün= nativ Gewebe, rot= kollagenreiches Narbengewebe). Maßstabsbalken= 500 μ m.

4.1.7 Analyse des Magneteffektes

Wie bereits weiter oben beschrieben, wurden die transduzierten eCF zusätzlich mit MNP beladen, um die Zellretention nach der Injektion zu erhöhen. Folglich interessierte mich, inwieweit die Verwendung der magnetbasierten Transplantation einen Effekt auf die Zellretention hatte. Dazu wurden makroskopischen Aufnahmen der Herzen mit und ohne

Magneteinwirkung betrachtet. Als Quantifizierung der Zellretention wurde eine Western blot Analyse in Bezug auf Cx43, eGFP und Vimentin Expression der Herzen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden lediglich auf die Kurzzeit Versuche fokussiert, da hier der größte Effekt der magnetbasierten Transplantation zu erwarten war.

In Abb. 41A ist ein deutlicher Unterschied der Anzahl an eingewachsenen Zellen nach intramyokardialer Transplantation von transduzierten und MNP beladenen eCF mit und ohne Anwendung eines Magnetfeldes für 10 Minuten während und nach dem Zellinjektionsvorgang zu erkennen. Sowohl das rote Fluoreszenzsignal der MNPs, als auch die grüne eGFP Fluoreszenz war bei Verwendung des Magneten deutlich erhöht. Quantitativ wurde eine Western blot Analyse von Cx43 und Vimentin (als Fibroblastenmarker) Expression in Infarktarealen durchgeführt (Abb. 41B,C). Verglichen wurde hier die Expression in den Infarktarealen mit Cx43 LV transduzierten eCF ohne und mit magnetbasierter Transplantation. Für beide Proteine ist eine deutlich erhöhte Expression bei Verwendung eines Magneten zu sehen. Die Tatsache, dass der Vimentin-Gehalt im Vergleich zur Cx43 Expression innerhalb der beiden Gruppen signifikant erhöht war, lässt sich dadurch erklären, dass nach den *in vitro* Daten nur zwischen 24,8 % (eGFP LV) und 25,1 % (Cx43 LV) der injizierten Zellen lentiviral transduziert war und somit ein Großteil der injizierten Zellen das Transgen nicht in sich trug. Um den Effekt der magnetbasierten Transplantation weiter zu analysieren, wurde das Einwachsen der transplantierten Fibroblasten quantitativ untersucht (siehe Punkt 3.5.7 Zellquantifizierung). Als Identifikationsmarker für die transplantierten Zellen dienten hierbei Vimentin und eGFP. Auch bei dieser quantitativen Analyse wurde ein deutlich signifikanter Unterschied bei Anwendung eines Magneten festgestellt, sodass die Anzahl der eingewachsenen Zellen verdreifacht werden konnte (Abb. 41D: Cx43 LV-mag= ca. 18.000 Zellen vs. Cx43 LV+mag= 60.000 Zellen).

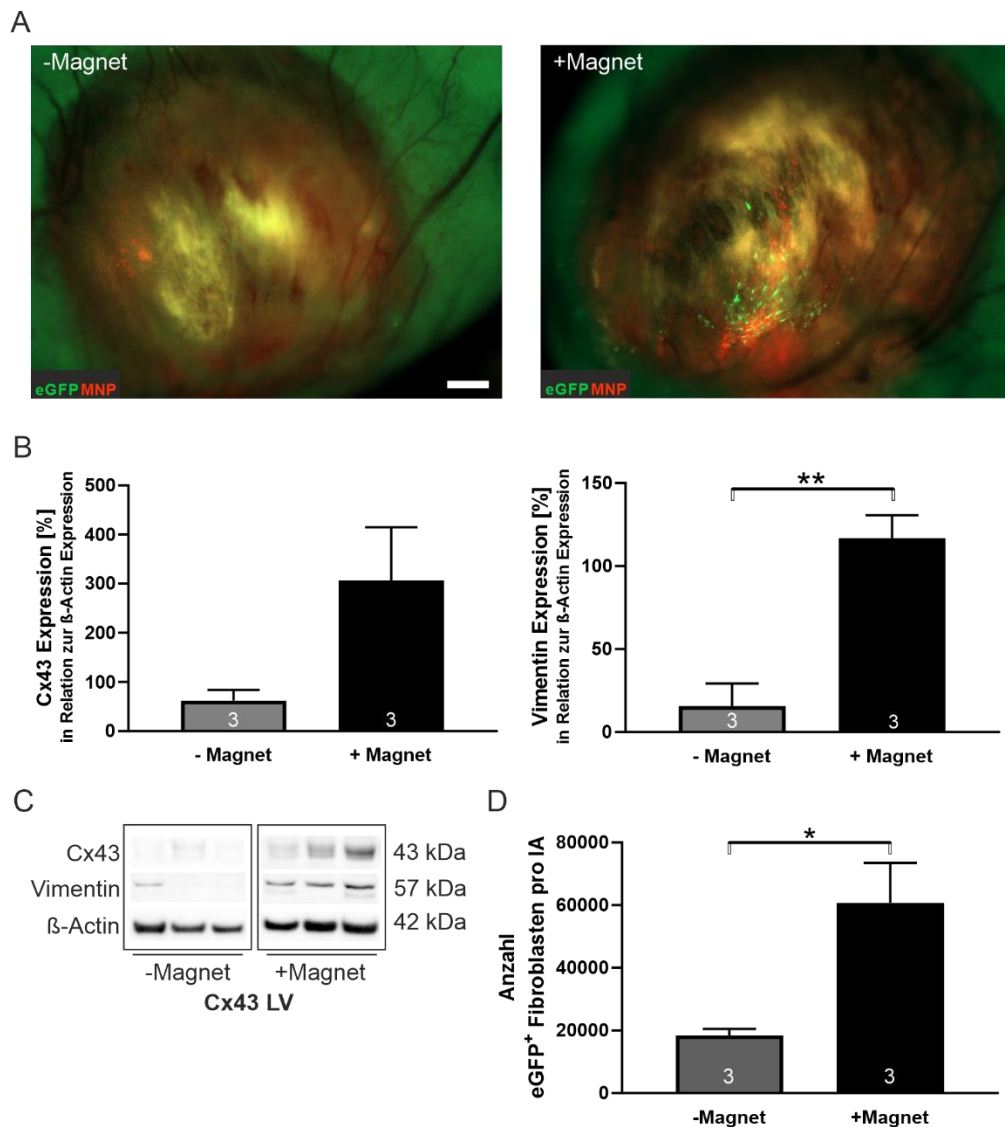


Abbildung 41: Analyse des Magneteffektes bei der Magnet-unterstützten Transplantation von MNP beladenen kardialen Fibroblasten in kryoinfarziertes Myokard. (A) Makroskopische Fluoreszenz Aufnahmen der Infarktareale nach Transplantation transduzierter Fibroblasten ohne und mit Magnetapplikation während der Transplantation im Vergleich (grün= eGFP/ Autofluoreszenz, rot= Tamra-MNP). (B) Proteinchemische Quantifizierung der Expression von Cx43 und Vimentin (als Fibroblastenmarker) in Infarktarealen nach eCF Transplantation ohne und mit Magnetunterstützung. (C) Zugehöriger Western blot der in B dargestellten Quantifizierung. (D) Quantifizierung der eingewachsenen eGFP⁺ Zellen nach Transplantation ohne und mit Einwirkung eines Magnetfeldes. Maßstabsbalken= 500 µm.

Der Magneteffekt wurde auch funktionell untersucht, sodass bei der Cx43 LV Gruppe ohne Magnet quantitativ die Gesamt VT Inzidenz bestimmt wurde (Abb. 42). Es wurde eine leicht verbesserte VT Inzidenz festgestellt (63,6 % VT Inzidenz Gesamt, Cx43 LV -

Mag) im Vergleich zur Kryoinfarkt- und eGFP LV Kontrollgruppe (Kryoinfarkt= 100 % VT Inzidenz Gesamt und eGFP LV= 89,5 % VT Inzidenz Gesamt). Dies lag daran, dass bereits ohne Verwendung eines Magneten vereinzelt Zellen im Infarkt einwuchsen (Abb. 41D: ca. 18.000 Zellen). Dennoch konnte nur die magnetbasierte Transplantation von Cx43 überexprimierenden Fibroblasten zu einer signifikant verbesserten VT Inzidenz im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen führen (Cx43 LV = 40 % VT Inzidenz Gesamt). Zusammenfassend, führte die Anwendung einer magnetbasierten Transplantation von MNP beladenen eCF zu einer signifikant verbesserten Zellintegration ins Gewebe und somit in der Cx43 LV Gruppe zu einer verbesserten Cx43 Expression in der Infarkt Narbe. Im Gruppenvergleich führte dies auch zu einer verbesserten Arrhythmieprotektion im Vergleich zu einer Transplantation ohne Magnet.

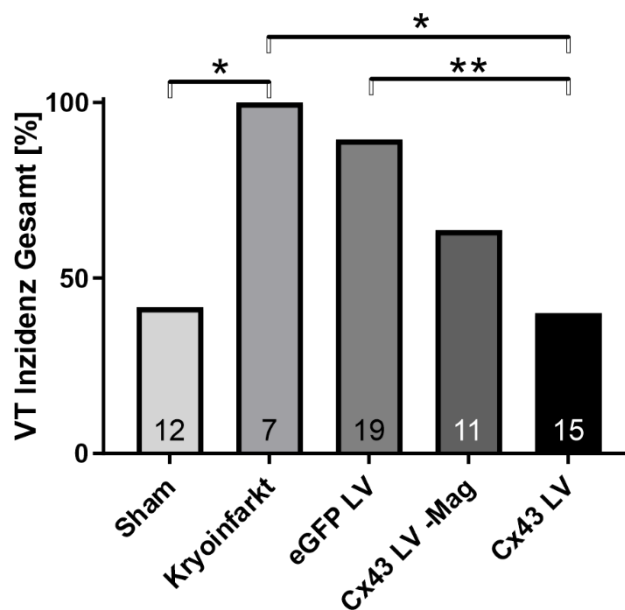


Abbildung 42: Auswirkungen der Anzahl an in das Infarktareal integrierten Cx43 überexprimierenden eCF auf die VT Inzidenz. VT Inzidenzen nach EPU mittels Burst-Stimulation 14 Tage postoperativ von Sham oder Kryoinfarkt operierten Tieren oder nach Kryoinfarkt und Transplantation von eGFP LV eCF , sowie der Cx43 LV eCF Tieren ohne und mit Magnetapplikation während der Transplantation im Vergleich.

4.2 Transduktionseffizienz des murinen moloney Leukämievirus (MMLV) in Abhängigkeit von der Viruskonzentration und Verwendung des MNP/Magnet Systems in Fibroblasten

Das Narbengewebe und insbesondere die sich darin befindlichen Fibroblasten sind genetisch relativ schwer zu manipulieren. Die im Myokard effizienten AAV zeigen hier nur einen geringen Effekt. Die intramyokardiale Injektion von Lentiviren führte in den Händen der AG *in vivo* zu einer sehr geringen Transduktionseffizienz (Roell et al. 2018). Auch in den unter Punkt 4.1 dargestellten Ergebnisse, ist eine relativ niedrige Transduktionseffizienz der Fibroblasten *in vitro* nach Transduktion mit lentiviralen Konstrukten mit und ohne Kopplung an Tamra-MNP (Abb. 22C: max. 25 % Transduktionseffizienz) zu erkennen. Folglich wurde in dieser Arbeit der Umweg über die Transplantation von zuvor *in vitro* transduzierten eCF gewählt. Für zukünftige therapeutische Ansätze wären jedoch Vektoren von Vorteil, welche mit oder ohne Hilfe des MNP/Magnet Systems in kurzer Zeit zu einer hohen Transduktionseffizienz von kardialen Fibroblasten führen.

4.2.1 *In vitro* Analyse des MMLV an 3T3 Fibroblasten

In den vorherigen Ergebnissen konnte bei Verwendung von lentiviralen Konstrukten, selbst bei Komplexierung mit MNP und Verwendung eines Magnetfeldes, lediglich eine Transduktionseffizienz von max. 25-30 % erzielt werden. Dementsprechend wurde ein zweites Retrovirus an Fibroblasten getestet. Das MMLV wurde bereits von *Ramanujam D. et al.* (2018) *in vivo* verwendet und es wurde gezeigt, dass er im embryonalen Herzen vor allem auch Fibroblasten transduziert. Initial wurden bereits vorhandene MMLV's an 3T3 Fibroblasten getestet. In Zusammenarbeit mit Prof. Engelhardt, D. Ramanujam, C. Geisen und P. Niemann wurden hierauf zwei MMLV Konstrukte generiert, welche für die Expression von mCherry oder über ein P2A Element die Expression von mCherry und Cx43 kodieren. Ausgangspunkt hierfür war ein GSG-Cx43-P2A-mCherry Konstrukt (generiert von P. Niemann, Abb. 10, (Niemann et al. 2022)).

Begonnen wurde mit der Bestimmung der Transduktionseffizienz von MMLV's in 3T3 Fibroblasten. Dazu wurden zunächst einfache Kontrollviren (MMLV-dsred und MMLV-eGFP, zur Verfügung gestellt von Prof. Engelhardt) über Nacht in das Zellkulturmedium gegeben und die Transduktionseffizienz nach drei Tagen ermittelt. Die MML-Viren wurden

in drei verschiedenen Konzentrationen (100 VG, 500 VG und 1000 VG pro Zelle) getestet. In Abb. 43 ist zu sehen, dass die Effizienz bei steigender Viruskonzentration für beide Viren signifikant zunahm. Die niedrigere Effizienz bei MMLV-dsred (23 % bei 500 VG/Zelle) im Vergleich zu MMLV-eGFP (41,1 % bei 500 VG/Zelle) könnte daran liegen, dass die rote Fluoreszenz für das menschliche Auge schlechter wahrnehmbar ist und deswegen nicht alle transduzierten Zellen gezählt wurden. Dennoch konnte bereits ohne Verwendung einer MNP/Magnet basierten Transduktion eine viel höhere Effizienz mittels MMLV im Vergleich zur Lentivirus-Transduktion erreicht werden (Abb. 43B: 46,9 % Effizienz mit MMLV-eGFP und 1000 VG/Zelle).

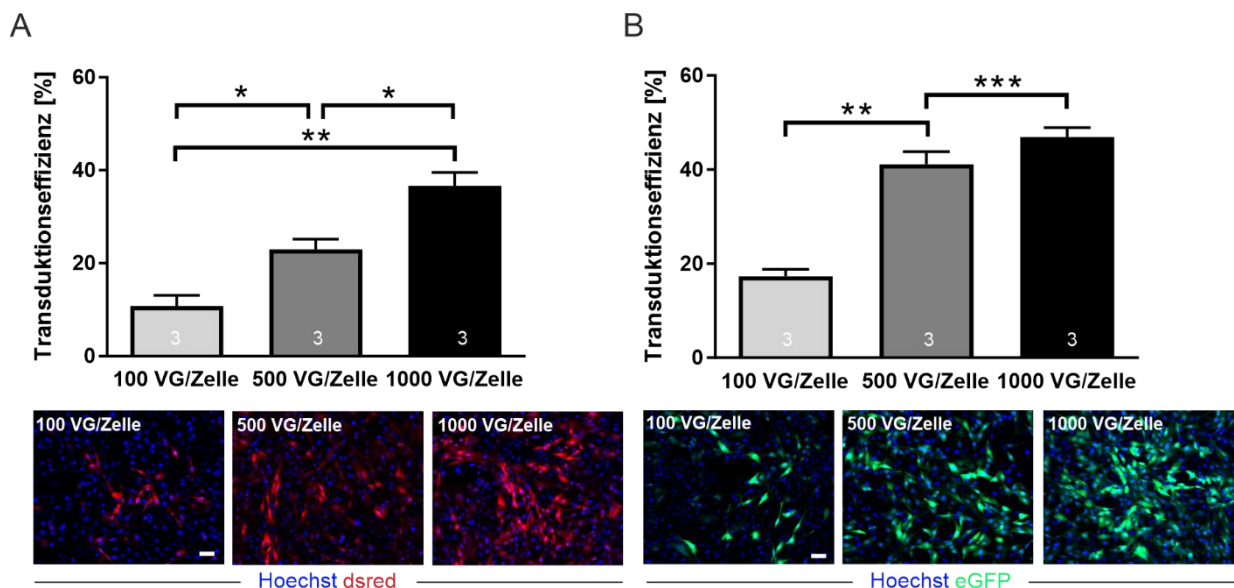


Abbildung 43: Konzentrationsabhängige Transduktionseffizienz von 3T3 Fibroblasten durch das MMLV. Vergleich der Transduktionseffizienzen inkl. Quantifizierung nach über Nacht Transduktion mit drei verschiedenen Konzentrationen (100, 500 und 1000 VG/Zelle) von MMLV-dsred (A, blau= Zellkerne, rot= dsred) und MMLV-eGFP (B, blau= Zellkerne, grün= eGFP). Maßstabsbalken= 50 µm. Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

In einem weiteren Schritt wurde die Transduktion von 3T3 Fibroblasten unter Verwendung der MMLV Konstrukte, sowie des MNP/Magnet Systems analysiert. Dazu wurde die mittlere Virusmenge des MMLV-eGFP (Abb. 43B, 500 VG/Zelle) an Tamra-MNP (25 pg Fe/Zelle) gekoppelt und die Fibroblasten für 30 Minuten unter Magneteinwirkung mit diesen Komplexen transduziert. Nach 30 Minuten wurden die nicht gebundenen Komplexe (= Überstand) entnommen und auf eine neue Zellkulturplatte mit 3T3 Fibroblasten für 30 Minuten unter Magnetweirwirkung gegeben. Mit Hilfe dieses

Versuches wollte ich ermitteln, ob das Virus/MNP Verhältnis optimal gewählt ist und sich die Fibroblasten möglichst effizient transduzieren lassen. Als Kontrolle wurden Fibroblasten verwendet, die lediglich mit MMLV-eGFP ohne MNP für 30 Minuten (MMLV-eGFP 30') oder über Nacht transduziert wurden (MMLV-eGFP ü.N.).

Drei Tage nach der 30-minütigen Virusexposition sind signifikante Unterschiede in der Transduktionseffizienz, je nach Protokoll erkennbar. Mit Hilfe der MNP/Magnet basierten Transduktion konnten fast 100 % der Fibroblasten transduziert werden, wohingegen bei Verwendung von MMLV-eGFP ohne MNP für 30 Minuten die Transduktionseffizienz nur bei ca. 20,2 % lag (Abb. 44A). Auf der anderen Seite konnte die Transduktionseffizienz mit Hilfe einer über Nacht Transduktion verdoppelt werden (Abb. 44A, MMLV ü.N.= 43,2 %). Auffällig ist jedoch, dass die Effizienz nach Transduktion mit dem Überstand mit 27 % relativ hoch war und sogar noch mehr Zellen transduziert wurden als bei der Verwendung des MMLV für 30 Minuten (Abb. 44A, MMLV 30'= 20,2 %). Aufgrund dessen wurde dieser Versuch mit einer geringeren Virusmenge wiederholt. In Abb. 44B sind die Transduktionseffizienzen mit einer Virusmenge von 250 VG/Zelle (MMLV-eGFP) und gleicher MNP-Konzentration von 25 pg Fe/Zelle (Tamra-MNP) dargestellt. Zunächst ist zu sehen, dass die Effizienz innerhalb des MNP-Magnet basierten System, trotz halbiertes Virusmenge immer noch effizient und signifikant erhöht war, im Vergleich zu allen anderen Gruppen (Abb. 44B, Komplexe= 97,7 %). Die Transduktionseffizienzen für die Transduktion mit Virus ohne MNP waren leicht gesunken (Abb. 44B, MMLV ü.N.= 27,2 % und MMLV 30'= 18,3 %). Ebenfalls gesunken war die Effizienz nach Transduktion mit den Komplexen im Überstand (Abb. 44B, Überstand= 10,6 %). Folglich kann die Virusmenge von 500 VG/Zelle auf 250 VG/Zelle halbiert werden, sodass bei gleichbleibender Eisenmenge der MNP, signifikant mehr Fibroblasten im MNP-Magnet basierten System nach 30 Minuten transduziert wurden, als nach Verwendung der Viruspartikel ohne MNP (Abb. 44C,D; MMLV 30'= 18,3 % vs. MMLV+MNP 30'= 97,7 %).

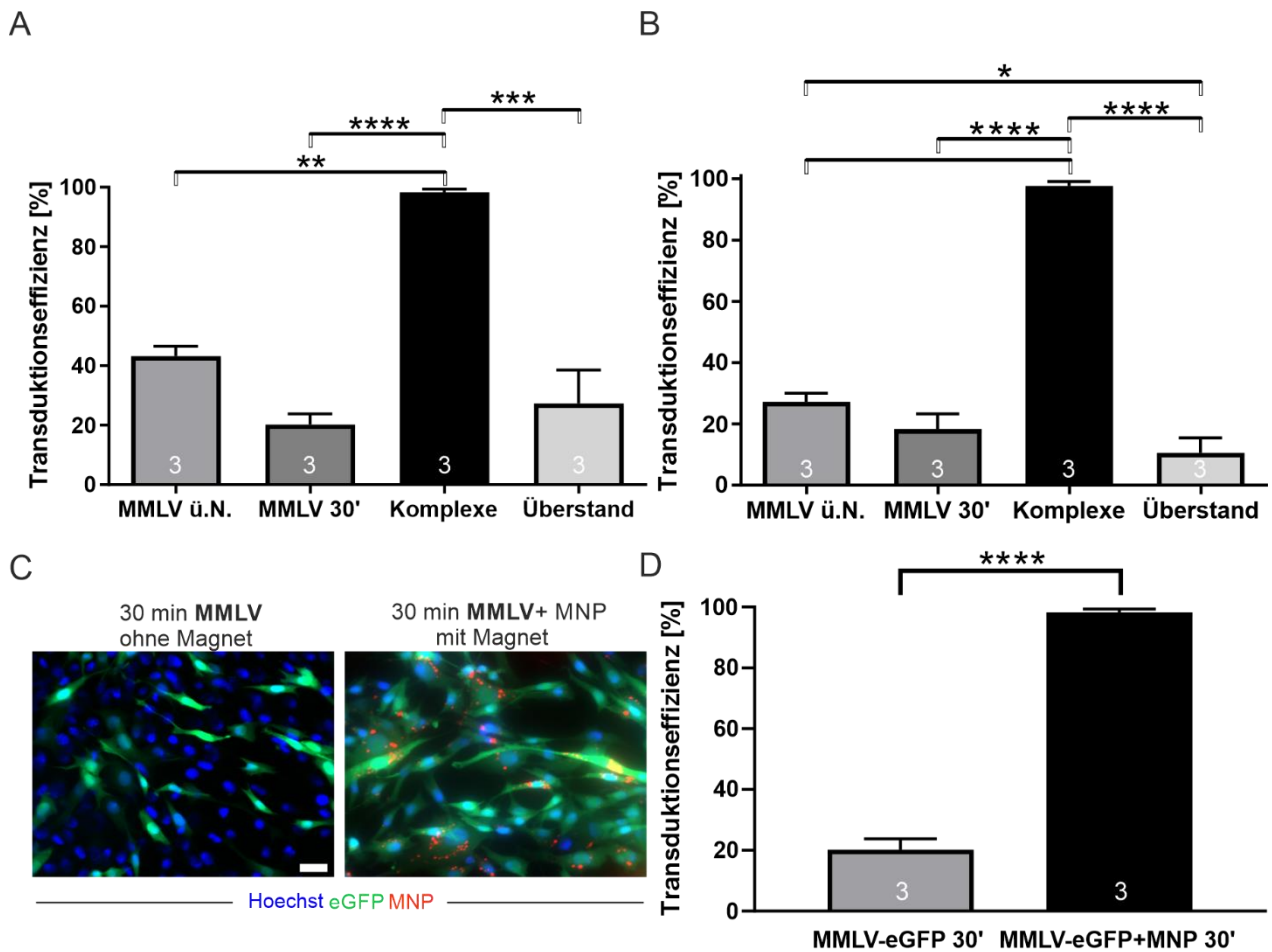


Abbildung 44: Analyse der MNP/Magnet basierten Transduktionseffizienz von MMLV an 3T3 Fibroblasten. (A) Vergleich der Transduktionseffizienzen nach Transduktion mit MMLV-eGFP (500 VG/Zelle) ohne (= MMLV 30') und mit Kopplung an Tamra-MNP (25 pg Fe/Zelle)+ Magneteinwirkung (= Komplexe). Die nicht gebunden Komplexe wurden anschließend abgesaugt und auf eine neue Zellkulturplatte mit 3T3 Fibroblasten für 30 Minuten unter Magneteinwirkung gegeben (= Überstand). Zusätzlich wurde als Kontrolle die Transduktionseffizienz nach über Nacht Transduktion mit MMLV ermittelt (= MMLV ü.N.). (B) Wiederholung des Versuches aus A mit reduzierter Virusmenge (250 VG/Zelle). (C) Histologische Aufnahmen der transduzierten 3T3-Fibroblasten (blau= Zellkerne, grün= eGFP, rot= Tamra-MNP) und (D) die dazu gehörige Quantifizierung der Transduktionseffizienz. Maßstabsbalken= 20µm. Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

4.2.2 *In vitro* Testung der neu generierten MMLV Konstrukte unter besonderer Berücksichtigung der Cx43 Expression

In einem weiteren Schritt wurde der neu generierte MMLV-Cx43 im Vergleich zum etablierten Lentivirus, auch unter Verwendung des MNP/Magnet Systems an Fibroblasten getestet. Dazu wurden 3T3 Fibroblasten mittels Lentivirus (LV)-MNP- oder MMLV- MNP-

Komplexen transduziert. Als MNP wurde das SoMag5-MNP (Ottersbach et al. 2018) gewählt, da sich die Fluoreszenz-Bereiche des Tamra-MNP und die mCherry Fluoreszenz des MMLV-Cx43 überschneiden. Nach 30 min Transduktion mit den Virus/MNP Komplexen, konnte eine deutlich höhere Effizienz des MMLV im Vergleich zur LV Transduktion erzielt werden (Abb. 45A, LV= 35 % vs. MMLV= 75 %). Die Effizienzen von Kontrollvirus (MMLV-mCherry) und Zielvirus (MMLV-Cx43) waren jedoch vergleichbar (Abb. 45B, MMLV-mCherry= 68,6 % vs. MMLV-Cx43= 73,1 %). Außerdem konnte die hohe Effizienz des MNP/Magnet Systems bei der Unterstützung der retroviralen Transduktion von Fibroblasten erneut verifiziert werden. So führte die Verwendung von SoMag5-MNP und eines Magnetfeldes zu einer stark gesteigerten Proteinexpression, (Abb. 45C,D; MMLV-CX43 ohne MNP= 19 %, MMLV-Cx43+MNP= 80 %) nach nur 30 min Inkubation mit dem MMLV.

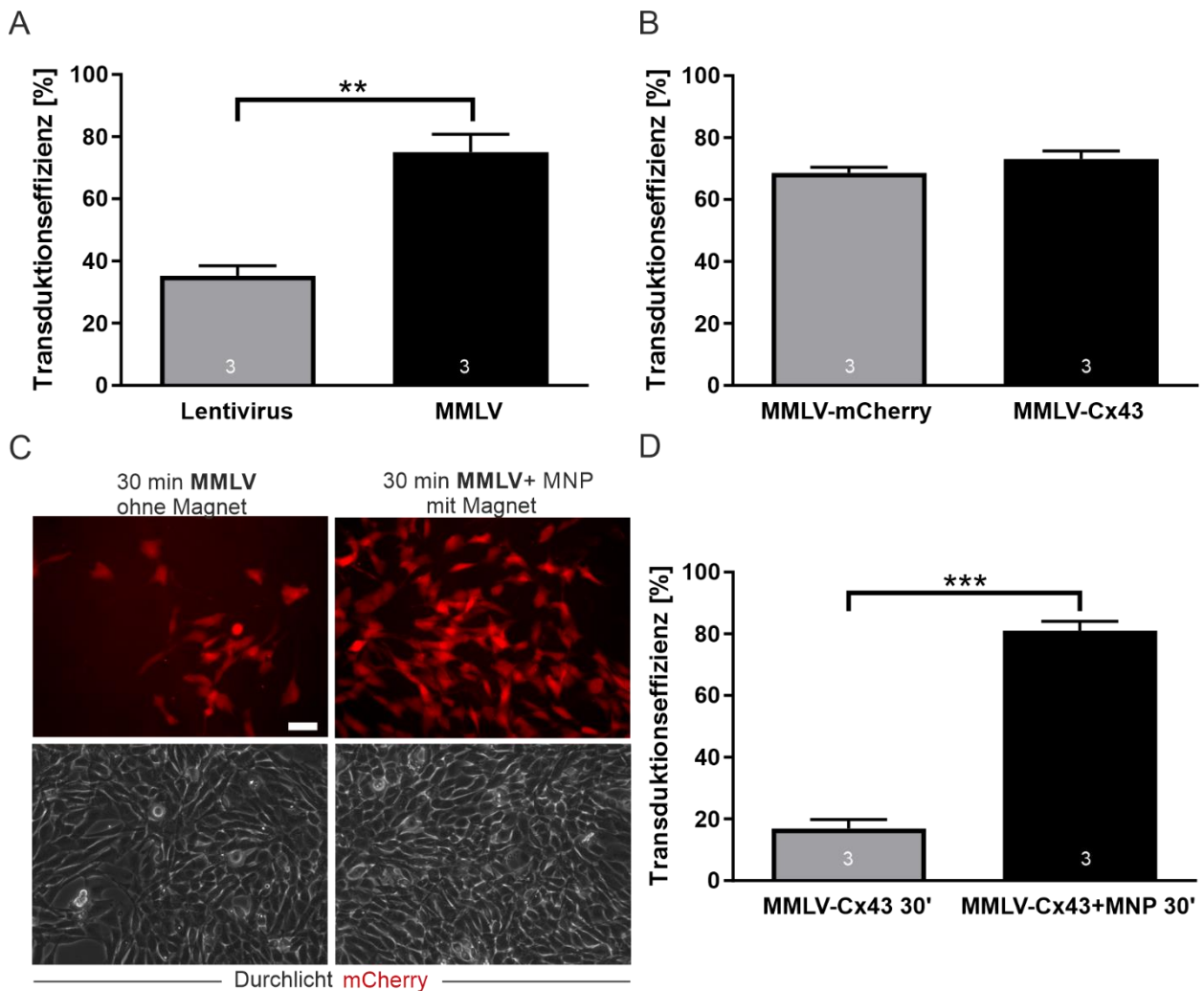


Abbildung 45: Analyse der Transduktionseffizienzen des neu generierten MMLV an 3T3 Fibroblasten. (A) Vergleich der Effizienz zwischen LV-SoMag5 (MOI= 10, 500 fg Fe/Viruspartikel) und MMLV-SoMag5 Komplexen (250 VG/Zelle und 500 fg Fe/VG). (B) Quantifizierung der Transduktionseffizienz des neu generierten Kontrollvirus (MMLV-mCherry) und Zielvirus (MMLV-Cx43). Analyse des Magneteffektes bei Komplexierung von MMLV-Cx43 und SoMag5 anhand von histologischen Aufnahmen (C, rot= mCherry) und Quantifizierung der Transduktionseffizienz (D). Alle Versuche wurden in drei Ansätzen (n=3), einer Viruskonzentration von 250 VG/Zelle und einer MNP-Konzentration von 500 fg Fe/VG (SoMag5) durchgeführt. Maßstabsbalken= 50 µm. Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die Cx43 Expression des neu generierten MMLV-Cx43 in 3T3 Fibroblasten getestet. Nach Transduktion konnte in der DNA der Fibroblasten erfolgreich die Sequenz des verwendeten Konstruktes via PCR nachgewiesen werden (siehe Abb. 46A). Bei nativen und mit Kontrollvirus transduzierten Fibroblasten konnte keine

Bande detektiert werden. Als Positivkontrolle diente hierbei die DNA eines erfolgreich transfizierten und selektierten Zellklons (Klon 29.1, P. Niemann). Auf Proteinebene wurde mittels Western blot eine signifikant höhere Cx43 Expression bei MMLV-Cx43 transduzierten Fibroblasten nachgewiesen (Abb. 46B, MMLV-mCherry= 36,2 % vs. MMLV-Cx43= 53,2 %). Zusätzlich konnte die an Cx43 gekoppelte, P2A Sequenz nur in den MMLV-Cx43 Proben nachgewiesen werden. Damit wird letztendlich auch eine Unterscheidung zwischen endo- und exogener Cx43 Expression ermöglicht. In Abb. 46B ist zu sehen, dass Cx43 bereits auf einem geringen Level endogen von Fibroblasten exprimiert wird. Auch histologisch konnte ein erhöhtes Cx43 Signal, in den mit MMLV-Cx43 transduzierten Zellen, im Vergleich zur Kontrolle gesehen werden (Abb. 46C vs. D). Zusätzlich zeigt Abb. 46D die Co-Lokalisation von Cx43 und P2A innerhalb der transduzierten mCherry⁺ Fibroblasten.

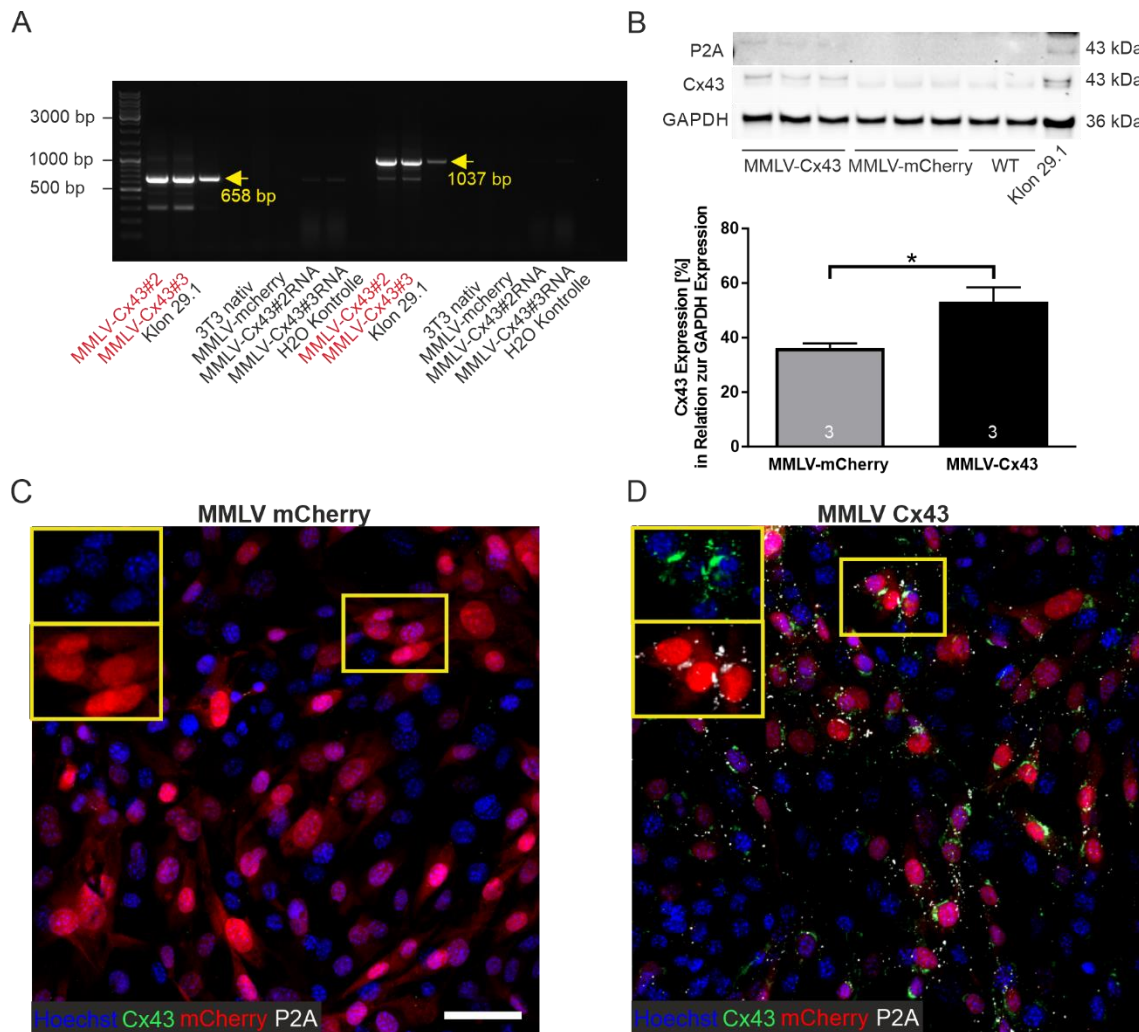


Abbildung 46: Analyse der Cx43 Expression des neu generierten MMLV-Cx43 an 3T3 Fibroblasten. (A) Gelelektrophoretischer Nachweis des Viruskonstruktes mittels PCR aus isolierter DNA von transduzierten Zellen. Proteinchemischer Nachweis und Quantifizierung mittels Western blot (B) und histologische Aufnahmen nach MMLV-mCherry (C) und MMLV-Cx43 (D) Transduktion (blau= Zellkerne, grün= Cx43, rot= mCherry, weiß= P2A). Die Bildausschnitte oben links (C,D) zeigen ausgewählte Zellen im Hoechst/Cx43 (oberes Bild) und mCherry/P2A Kanal (unteres Bild). Alle Versuche wurden mit einer Viruskonzentration von 250 VG/Zelle und einer MNP-Konzentration von 500 fg Fe/VG (SoMag5) durchgeführt. Maßstabsbalken= 50 μ m. Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

4.2.3 *In vitro* Transduktion von primären kardialen Fibroblasten mit MMLV/SoMag5

Im Hinblick auf eine spätere *in vivo* Anwendung der MMLV-MNP Komplexe wurden diese an einer weiteren Fibroblastenart getestet. Neben der bereits beschriebenen 3T3 Fibroblasten Zelllinie, welche aus dissoziierten murinen Embryonen (E18/19) generiert wurde und von selbst immortalisierte (Todaro and Green 1963), wurden auch primäre

kardiale Fibroblasten (eCF, Isolationsprotokoll siehe Punkt 3.1.4) verwendet. Die eCF wurden wie unter Punkt 3.1.7.1 mit den MMLV-MNP Komplexen für 30 min transduziert und die Effizienz, sowie die Cx43 Expression nach drei Tagen analysiert.

Die Transduktion mittels MMLV-Konstrukten verlief auch bei den kardialen Fibroblasten wesentlich effizienter als mit Lentiviruspartikeln (Abb. 47A, LV= 25,7 % vs. MMLV-Cx43= 72 %). Kontroll- und Zielvirus transduzierten die eCF in gleichem Ausmaß (Abb. 47B,C; für MMLV-mCherry und MMLV-Cx43 ca. 70 % Transduktionseffizienz). Auf der anderen Seite konnte die Effizienz wieder deutlich, durch Verwendung des MNP/Magnet basierten Systems gesteigert werden (Abb. 47D). So führte alleine die Transduktion mit MMLV-Cx43 für 30 min zu einer Effizienzsteigerung von ca. 15 %, während in der gleichen Zeit durch Verwendung von MMLV/MNP Komplexen und Magnetfeld, ca. 70 % der Fibroblasten transduziert wurden.

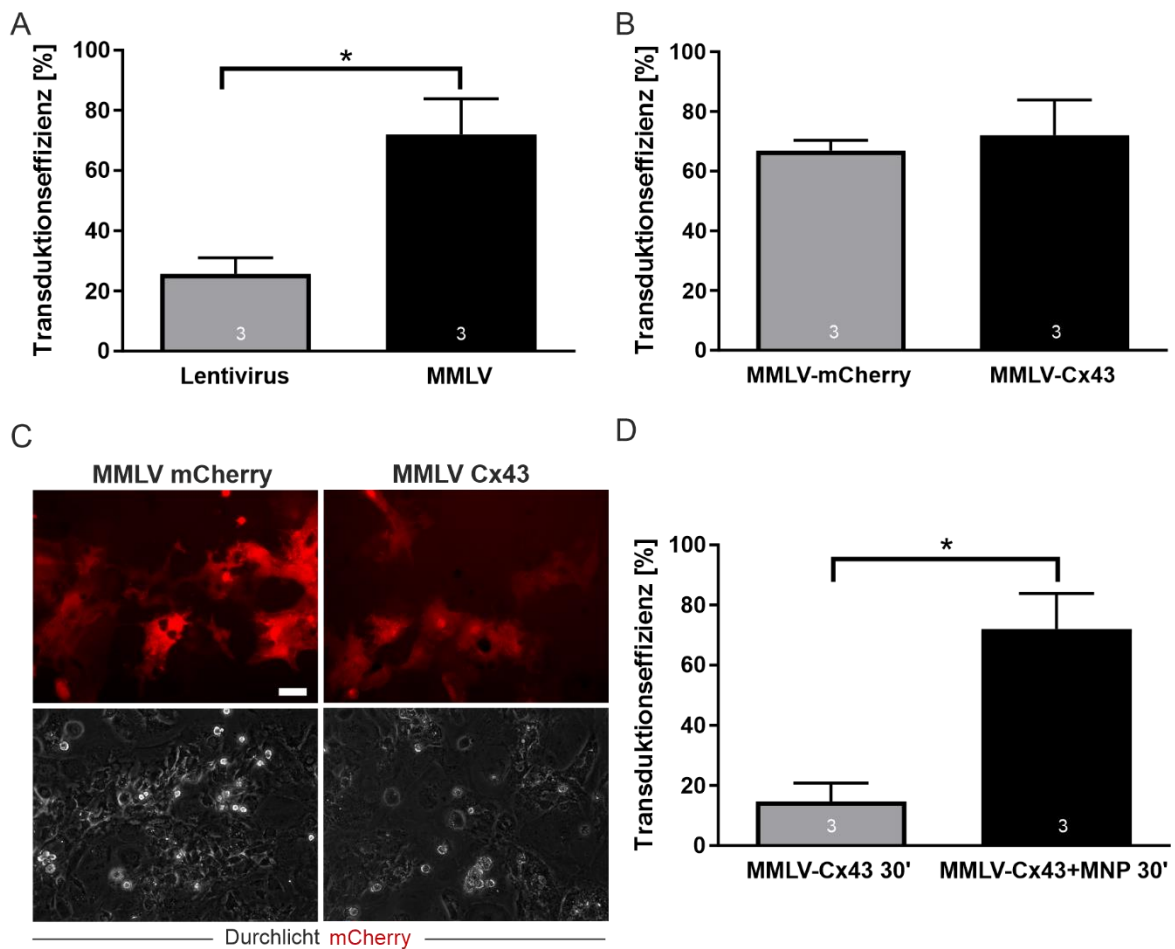


Abbildung 47: Analyse der Transduktionseffizienzen des neu generierten MMLV an primären kardialen Fibroblasten (eFC). (A) Vergleich der Effizienz zwischen LV-SoMag5 (MOI= 10, 500 fg Fe/Viruspartikel) und MMLV-SoMag5 Komplexen (250 VG/Zelle und 500 fg Fe/VG). Quantifizierung der Transduktionseffizienz (B) des neu generierten Kontrollvirus (MMLV-mCherry) und Zielvirus (MMLV-Cx43) und dazugehörige histologische Aufnahmen (C, rot= mCherry). Quantifizierung der Transduktionseffizienz bei Komplexierung von MMLV-Cx43 mit SoMag5 und Transduktion der eCF unter Anlage eines Magnetfeldes für 30 Minuten (D). Alle Versuche wurden mit einem n=3, einer Viruskonzentration von 250 VG/Zelle und einer MNP-Konzentration von 500 fg Fe/VG (SoMag5) durchgeführt. Maßstabsbalken= 50 μ m. Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

Der neu generierte MMLV-Cx43 führte nicht nur zu einer stark verbesserten Transduktionseffizienz bei kardialen Fibroblasten, sondern erzielte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von Cx43 in diesen Zellen. So konnte in den Western blot Analysen neben einem stärkeren Cx43 Signal (Abb. 48A), auch ein P2A Signal nach Transduktion mit MMLV-Cx43 detektiert werden. P2A wurde in unbehandelten und mit

Kontrollvirus transduzierten Fibroblasten nicht detektiert, dies ist ein Hinweis auf exogene Cx43 Expression. Die Quantifizierung der Signale ergab eine signifikant höhere Cx43 Expression nach MMLV-Cx43 Transduktion (Abb. 48B) von ca. 35 % (in Relation zur GAPDH Expression), im Vergleich zu unbehandelten (15 % Cx43 Expression) und mit Kontrollvirus transduzierte (ca. 18 % Cx43 Expression) kardialen Fibroblasten. Die Cx43 Überexpression in den primären kardialen Fibroblasten konnte ebenfalls in den histologischen Aufnahmen nachgewiesen werden. So zeigten die mCherry⁺ Fibroblasten nach Transduktion mit MMLV-Cx43 eine deutlich höhere Cx43 Expression. Die Cx43 Signale korrelierten ebenfalls mit den P2A Signalen, was auf eine exogene Cx43 Expression hinwies (Abb. 48D). Zusätzlich konnte nach Transduktion mit MMLV-mCherry bei den mCherry⁺ Fibroblasten keine P2A und kaum Cx43 Expression detektiert werden (Abb. 48C). Neben der erhöhten Cx43 Expression, nach Transduktion mit MMLV-Cx43, konnte ebenfalls eine zusätzliche Bande (Abb. 48A, Doppelbande) detektiert werden. Diese Bande wies eine größere Molekülgröße auf, als die Banden der endogenen Cx43 Proteine bei den WT und MMLV-mCherry Kontrollen. Dies könnte ein Hinweis auf eine post-translationale Modifikation (z.B. Phosphorylierung) sein. In der Literatur sind bisher drei Phosphorylierungsformen von Cx43 bekannt (Solan and Lampe 2020), die auf eine erhöhte Funktionalität der Cx43 Kanäle hinweisen. Im nachfolgenden Experiment sollte nun die Funktionalität der exogenen Cx43 Kanäle analysiert werden.

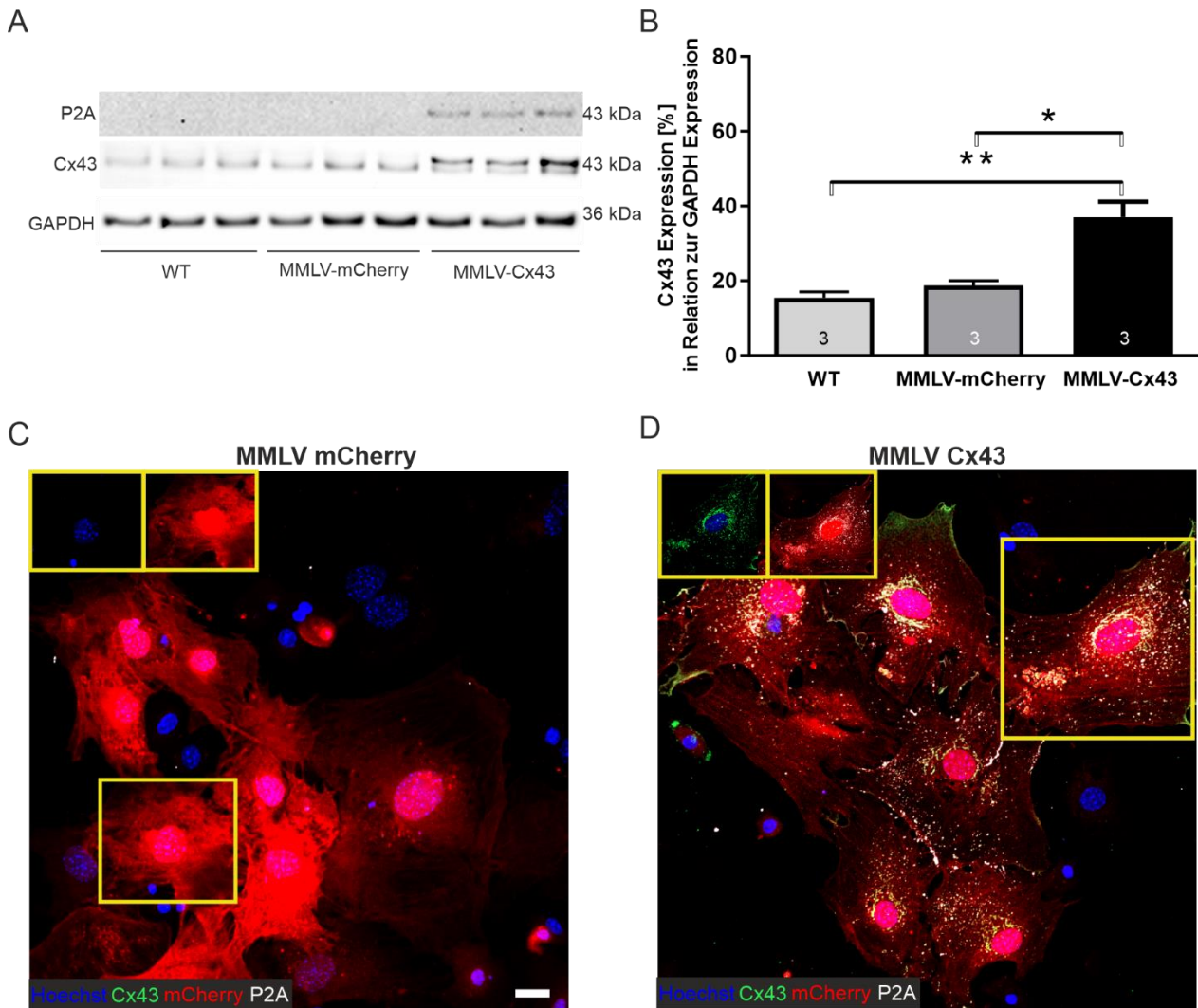


Abbildung 48: Analyse der Cx43 Expression des neu generierten MMLV-Cx43 an primären kardialen Fibroblasten (eCF). Die Überexpression von Cx43 nach MMLV Transduktion (250 VG/Zelle und 500 fg Fe/VG SoMag, 30 Minuten Transduktion) wurde mittels Western blot (A) nachgewiesen und in Relation zur GAPDH Expression quantifiziert (B). Histologische Aufnahmen der Immunfärbung von Cx43 und P2A (blau= Zellkerne, grün= Cx43, rot= mCherry, weiß= P2A) nach Transduktion mit MMLV-mCherry (C) und MMLV-Cx43 (D). Die Bildausschnitte oben links (C,D) zeigen ausgewählte Zellen im Hoechst/Cx43- (linkes Bild) und mCherry/P2A- Kanal (rechtes Bild). Maßstabsbalken= 20 μ m. Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

4.2.4 Analyse der Funktionalität mittels des MMLV-Cx43 generierten Gap junctions

Wie zuvor gezeigt, konnte durch Verwendung des MMLV-CX43 eine hohe Transduktionseffizienz, mit signifikant erhöhter Cx43 Expression in Fibroblasten, erzielt werden. In diesem Abschnitt soll nun die Funktionalität dieser vermehrt exprimierten Cx43-Kanäle (Gap junctions, Gj) untersucht werden (Kuzma-Kuzniarska et al. 2016).

Dazu wurden 3T3 Fibroblasten mittels MMLV und MNP+ Magnet transduziert (MMLV-mCherry und MMLV-Cx43) und an Tag drei nach Transduktion einer FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) Messung unterzogen (siehe Protokoll Punkt 3.1.8). Für die Messung wurde eine einlagige Zellgruppe (Monolayer) von mCherry⁺ Fibroblasten ausgewählt und die Fluoreszenz einer Zelle gebleicht.

Abb. 49A,B zeigt mikroskopische Aufnahmen der FRAP-Messung, bei welchen für Fibroblasten, welche entweder mit dem MMLV-mCherry oder dem MMLV-Cx43 transduziert und mit CalceinAM Farbstoff beladen wurden, deutlich die Ausgangs-Fluoreszenzen (grün= CalceinAM, rot= mCherry) vor dem Bleichvorgang zu erkennen waren. Unmittelbar nach dem Bleichen einer ausgewählten Zelle (Abb. 49A gelbe gestrichelte Linie) ist sowohl die Fluoreszenz des Calcein AM-Farbstoffes, als auch die mCherry Fluoreszenz nicht mehr vorhanden. Bereits 17 s nach Bleichen war bei den MMLV-Cx43 Fibroblasten eine Wiedergewinnung der Calcein AM-Fluoreszenz (grüne Färbung) zu erkennen, wohingegen bei den Kontrollzellen keine grüne Färbung zu sehen war. Durch die vermehrten Cx43-Kanäle in der Zellmembran der MMLV-Cx43 transduzierten Fibroblasten, kann der Farbstoff schneller in die gebleichte Zelle zurückdiffundieren, als bei den MMLV-mCherry transduzierten Zellen. Die mCherry Fluoreszenz geht in allen Zellen nach dem Bleichvorgang verloren, da dieses von den Zellen erst nachgebildet werden müsste und Moleküle >1 kDa, wie z.B. mCherry (26 kDa), die Gj nicht passieren können.

Die Wiedergewinnung der CalceinAm Fluoreszenz wurde schließlich noch in Abhängigkeit der Zeit quantifiziert (Abb. 49C). Hier ist zu sehen, dass bereits 17 s nach dem Bleichvorgang eine signifikante Zunahme der Fluoreszenz Intensität bei der gebleichten MMLV-Cx43 Zelle, im Vergleich zu der Kontrolle vorlag. Die Zunahme der Fluoreszenz-Intensität stieg in der MMLV-Cx43 Zelle im Zeitverlauf auch schneller an, bis sie nach 4 min schon die max. Sättigung erreichte. Zu diesem Zeitpunkt war diese mehr als doppelt so hoch wie die Sättigung der mCherry Kontroll-Zelle (Abb. 49D, Fluoreszenz-Intensitäten von MMLV-mCherry= 0,2 vs. MMLV-Cx43= 0,5 nach 4 Minuten).

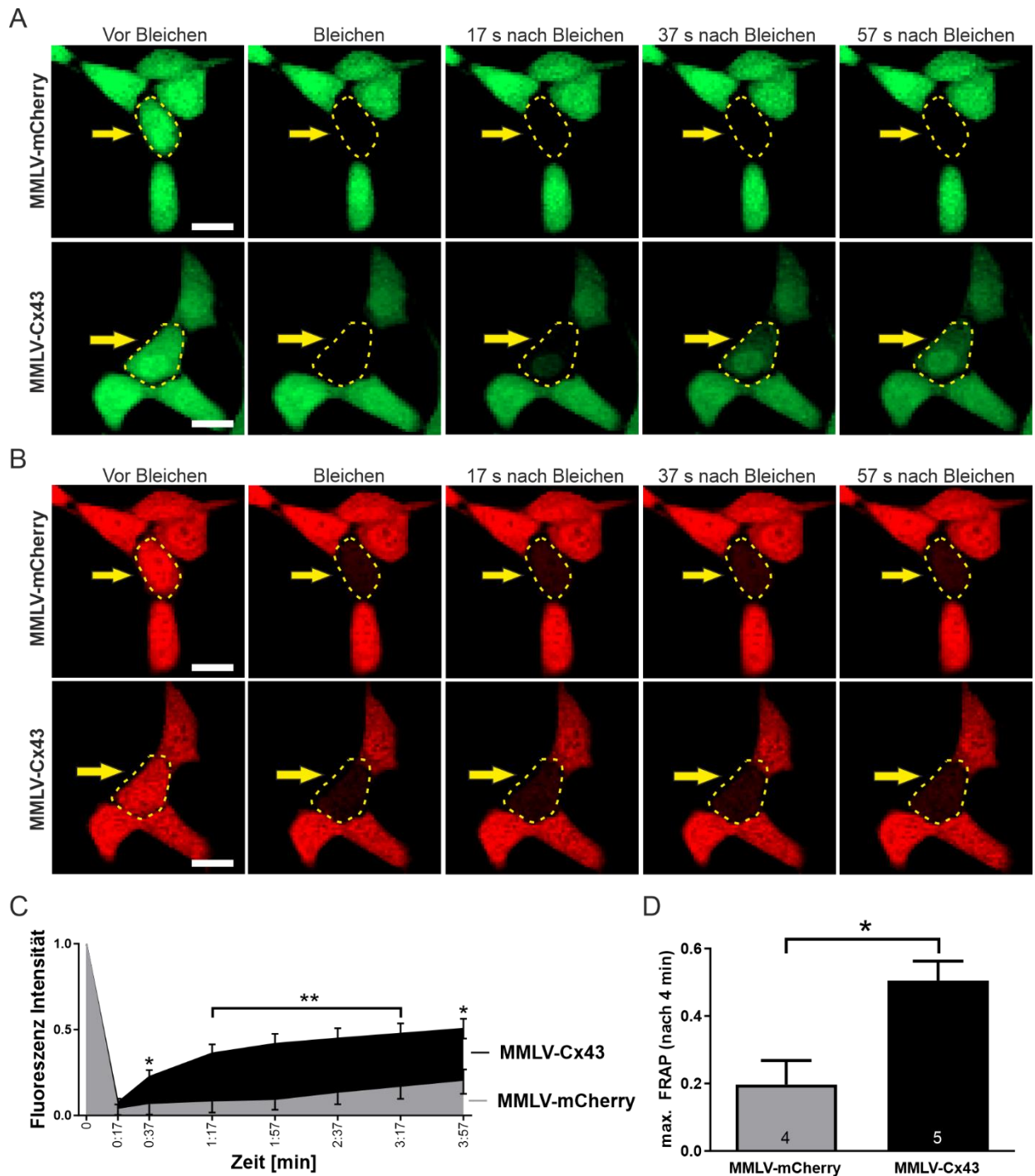


Abbildung 49: Überprüfung der Funktionalität der Virus exprimierten Cx43 Gap junctions (Gj). 3T3 Fibroblasten wurden mit MMLV/SoMag5 Komplexen (250 VG/Zelle MMLV-mCherry oder MMLV-Cx43 und 500 fg Fe/VG SoMag5) für 30 min+ Magnet transduziert und einer FRAP-Messung unterzogen. (A) zeigt die histologischen Einzelkanal Aufnahmen von transduzierten und mit dem Gj gängigen Farbstoff CalceinAM beladenen Fibroblasten im zeitlichen Verlauf (vor und nach Bleichen (mittels Laser) der Grün-

Fluoreszenz einer Zelle aus dem Zellverband, sowie 17 s, 37 s und 57 s nach Bleichvorgang) eines transduzierten Fibroblasten innerhalb eines Zellverbandes (gebleichte Zelle= gestrichelte gelbe Linie; grün= CalceinAM). (B) zeigt die dazugehörigen Einzelkanal Aufnahmen der exogenen mCherry Fluoreszenz desselben Zellverbands (gebleichte Zelle= gestrichelte gelbe Linie; rot= mCherry). Die Intensität der Fluoreszenz wurde anschließend mittels konfokaler Mikroskopie im zeitlichen Verlauf (C) und 4 Minuten nach Bleichvorgang mit Erreichen der max. FRAP (D) quantifiziert. Maßstabsbalken= 20 μm . Die Analyse wurde drei Tage nach Transduktion durchgeführt.

5 Diskussion

Die eigene und andere Arbeitsgruppen (Roell et al. 2007, Shiba et al. 2014, Roell et al. 2018) konnten in der Vergangenheit bereits zeigen, dass ein zellbasierter Cx43 Transfer in murine Herzen zu einer Reduktion der Vulnerabilität nach Myokardinfarkt führt. Allerdings handelte es sich bei den transplantierten Zellen, um Muskelzellen, wie embryonale oder ES- (Embryonale Stammzellen) Zell-abgeleitete CM, sowie transgene skeletale Myoblasten, welche alle die Fähigkeit besitzen, Aktionspotentiale auszubilden (He et al. 2003). Trotz signifikant gesteigerter Menge der primär in das Infarktgewebe integrierten Zellen, durch den Einsatz des MNP/Magnet Systems (Ottersbach et al. 2018), ist das Langzeitüberleben von transplantierten Myozyten im Infarktgewebe gering (Suzuki et al. 2004, Roell et al. 2007, van Laake et al. 2010). Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz, die direkte Transduktion von kardialen Fibroblasten mit Cx43 kodierenden lentiviralen Vektoren versucht. Überraschenderweise konnte trotz sehr geringen Transduktionsraten ein klinischer Effekt beobachtet werden (Roell et al. 2018). Um den Cx43 Gehalt in kardialen Fibroblasten signifikant zu erhöhen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Schritt zurückgegangen und kardiale Fibroblasten *in vitro* mit den zur Verfügung stehenden lentiviralen Vektoren über Nacht inkubiert, womit eine Transduktionseffizienz von knapp 25 % erreicht werden konnte. Diese Zellen wurden dann mittels des etablierten MNP/Magnet Systems in frisch infarzierte Herzen transplantiert. Da Fibroblasten natürlicherweise den größten Zellanteil in der Infarktnarbe stellen und im Rahmen der Narbenbildung in das (post-) entzündliche Gewebe einwandern (Nahrendorf et al. 2003, Frangogiannis 2014), wurde auch auf eine akzeptable (Langzeit-) Integration der transplantierten Cx43 exprimierenden kardialen Fibroblasten (eCF) spekuliert. Parallel wurden zusammen mit den Kooperationspartnern nach effektiveren Vektoren für eine schnelle und zuverlässige Transduktion von (Myo-) Fibroblasten gesucht.

5.1 Transplantation von Cx43 überexprimierenden kardialen Fibroblasten in die Infarktnarbe

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte das anti-arrhythmische Potential von Cx43 überexprimierenden eCF in der Infarktnarbe untersucht werden. Im Rahmen einer früheren Studie (Roell et al. 2007) wurden bereits unbehandelte kardiale Fibroblasten als

Kontroll-Zellen in eine Kryoläsion transplantiert. Damals wurde kein protektiver anti-VT Effekt *in vivo* beobachtet. In den im Ergebnisteil dargestellten *in vitro* Ergebnissen exprimieren frisch isolierte Fibroblasten nach 10-tägiger Zellkulturphase, trotz einer in der Literatur postulierten zellkulturbedingten Transdifferenzierung Richtung Myofibroblasten, mit vermehrter Cx43 Expression, bei signifikant gesteigertem α SMA Gehalt (Zhang et al. 2010, Tarbit et al. 2019). Aufgrund dieser Tatsache können, wie in dieser Arbeit auch bestätigt, nach Transplantation dieser Zellen, keine Arrhythmie-protaktiven Effekte erwartet werden. In bisherigen Studien wurde meistens ein „Fibroblast growth factor“ mit anderen Zelltypen in die Infarktzone co-transplantiert, um das Einheilen und damit die funktionellen Effekte dieser Zellen zu unterstützen (Cho et al. 2007, Wang et al. 2016). Studien über langfristig positive Effekte nach Transplantation von nativen (Myo-) Fibroblasten liegen nicht vor. Deshalb untersuchte ich vor der Transplantation meiner *in vitro* gereiften und lentiviral Cx43 transduzierten Zellen, ob diese Behandlung auf Genexpressionsebene zu Veränderungen führt. Erwartungsgemäß exprimierten die lentiviral Cx43 transduzierten Fibroblasten dreimal mehr Cx43, als unbehandelte Wildtyp Fibroblasten. Interessanterweise waren aber auch andere Gene, neben der Cx43 Expression differentiell exprimiert. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Expression von Strukturprotein- sowie Ionenkanalgenen auf Transkriptionsebene, welche die beobachteten positiven Effekte nach Transplantation dieser Zellen erklären könnten. So induzieren Integrine, die Umwandlung von Myofibroblasten und erhöhen die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen (Frangogiannis 2021). Kardiales Troponin (Tnnt2) spielt sowohl bei der Kontraktion im Herzen, als auch bei der Kontraktion von glatter Muskulatur eine entscheidende Rolle (Gomes et al. 2002, Kajioka et al. 2012), ebenso wie die im endoplasmatischen bzw. sarkoplasmatischen Retikulum lokalisierte Kalzium ATPase „Serca2“ (Atp2a2, kardiale Isoform) (Eisner 2014). In den Cx43 LV eCF war zusätzlich eine signifikante Hochregulation von Kollagen Typ 1a1 (Col1a1) zu finden. Kollagen 1a1 exprimierende kardiale Fibroblasten sind vor allem nach Regeneration/Remodeling im Herzen zu finden und stark assoziiert mit CM (MacKenna et al. 2000, Pan et al. 2013, Karsdal et al. 2017). Darüber hinaus beschreiben *Furtado et al.* die Expression kardialer Gene, wie Gata4 in kardialen Fibroblasten in der Infarktzone (Furtado et al. 2014). *Dittrich et al.* postulieren eine Korrelation zwischen Gata4 und VEGF-Überexpression in kardialen Fibroblasten, welche ebenfalls von uns beobachtet

wurde (Dittrich et al. 2021). Weiterführend müsste noch analysiert werden, ob die unterschiedliche Genregulation auch Auswirkungen auf die Proteinexpression hat. Dazu würden entweder histologische Färbungen der einzelnen Marker oder der Nachweis mittels Western blot durchgeführt werden. Bezüglich aSMA und TGFb Proteinexpression waren keine Unterschiede zwischen den transduzierten bzw. unbehandelten Wildtyp eCF nachweisbar. Dies könnte daran liegen, dass der Beobachtungszeitraum zu lang war. So wurde von *Asazuma-Nakamura et al.* publiziert, dass eine erhöhte Expression von aSMA und Cx43 bei kultivierten kardialen Fibroblasten nach Stimulation mit TGFb auf 72 Stunden limitiert ist (Asazuma-Nakamura et al. 2009). Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich jedoch auf einen Untersuchungszeitraum von 12 Tagen nach Isolation.

Gerade bei Studien zu Zellersatztherapien spielt vor allem die Frage eine Rolle, wie viele der transplantierten Zellen sich nach einem bestimmten Zeitpunkt noch im Infarktbereich befinden. Es ist bereits bekannt, dass der größte Teil der injizierten Zellen, unmittelbar nach Injektion über den Injektionskanal oder das Gefäßsystem verloren geht (Suzuki et al. 2004, van Laake et al. 2010, Ottersbach et al. 2018). In den vorliegenden Studien, habe ich zur Verbesserung der *in vivo* Detektion der eingebrachten Zellen, das Reportergen eGFP mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgefärbt, da deutliche Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und Zielvirus in Bezug auf die eGFP Expression vorlagen. Diese Unterschiede wurden bereits auf zelluärer Ebene mittels Westernblot und qPCR festgestellt und sind auf das IRES Element des lentiviralen Vektors zurückzuführen. IRES Elemente werden verwendet, um zwei Transgene co-exprimieren zu können, der Nachteil ist, dass das distale Transgen normalerweise schwächer exprimiert wird. So liegt beim Zielkonstrukt (Cx43 LV) das Cx43-Gen vor einer IRES (internal ribosomal entry site) - Sequenz, die für eine Coexpression des Reportegens eGFP notwendig ist, das hinter der IRES-Sequenz liegt. Dies hat zur Folge, dass Cx43 überexprimiert wird, aber die Expression von eGFP im Vergleich zum eGFP Kontrollvirus reduziert ist. Dieses Phänomen ist jedoch bereits in der Literatur bekannt, sodass Gene, welche sich „downstream“ der IRES-Sequenz befinden schwächer exprimiert werden (Bouabe et al. 2008). Darüber hinaus könnte auch noch eine Rolle spielen, dass für die Reifung des GFP Proteins Sauerstoff benötigt wird (Shaner et al. 2005). Es wurde bereits im Jahre 1998 von *Tsien et al.* publiziert, dass Sauerstoff für die

Dehydrogenierung der Aminosäuren im GFP-Protein benötigt wird (Tsien 1998). So wäre es denkbar, dass das vorherrschende hypoxische Milieu nach einem Myokardinfarkt (Lindsey et al. 2018), die Bildung der eGFP-Fluoreszenz beeinträchtigt.

Die Quantifizierung der eingewachsenen FB ist schließlich aufgrund der schwachen eGFP Expression (vor allem bei Cx43 LV), als auch der geringen Transduktionseffizienz (25 % für beide Viren) sehr schwierig. Teilweise ist es auch möglich, dass die eGFP Fluoreszenz durch die Fluoreszenz der Tamra-MNP aufgrund der spektralen Überlappung beeinflusst wird. Daher wurde das Rot-Signal der MNP in den histologischen Aufnahmen für die Zellquantifizierung ausgeblendet. Nach Auszählung und Extrapolation, wurde dennoch ein deutlich signifikanter Unterschied der Anzahl an eingewachsenen Zellen bei Verwendung eines Magneten erzielt (-mag= 18.000 Zellen vs. +mag= 60.000). Wird die Anzahl der eingewachsenen FB mit anderen Zellersatztherapien (z.B. CM) verglichen, so scheinen die FB deutlich besser in der Infarktnarbe zu verbleiben als CM. Wird zusätzlich die eher geringe Transduktionsrate der FB (ca. 25 % von $2,0 \times 10^5$ injizierten Zellen) mit in Betracht gezogen, ist die hohe Zahl an eingewachsenen Zellen noch erstaunlicher. Die Zellen wurden vor Transplantation nicht sortiert, sodass auch eGFP-negative Zellen transplantiert wurden. Außerdem wurden die eingewachsenen Zellen zur Quantifizierung mittels eGFP Antikörper nachgefärbt. Die hohe Zahl an eingewachsenen eGFP⁺ FB könnte an der zum Zeitpunkt der Transplantation immer noch vorhandenen Proliferationsfähigkeit der Fibroblasten liegen, andererseits tolerieren Fibroblasten vermutlich besser die in der Infarktnarbe vorherrschenden Bedingungen bezüglich Sauerstoff- und Nährstoffgehaltes, sowie die gewebstrukturellen Bedingungen. Um dies weiter zu analysieren, könnten die zu transplantierten Zellen zukünftig mit BrdU gelabelt und Zellquantifikationen zu mehreren Zeitpunkten postoperativ durchgeführt werden.

Histologisch wurden die Herzen der behandelten Mäuse mittels Immunfluoreszenzfärbung für Immunzellen (CD45⁺), Endothelzellen (CD31⁺, Pecam) und Vimentin als Fibroblastenmarker untersucht. Wie bereits zuvor dargestellt, wurden optisch keine Unterschiede innerhalb der Gruppen festgestellt. Dennoch wäre eine Quantifizierung der Immunzellen ein entscheidender nächster Schritt. Auffällig war jedoch, dass bei beiden Gruppen mit den transplantierten Fibroblasten trotz

Immunsuppression nach 14 Tagen post Transplantation noch relativ viele CD45⁺ Immunzellen im Infarkt vorhanden waren. Es wurde erst kürzlich von der Arbeitsgruppe J. Molкетин (Vagnozzi et al. 2020) gezeigt, dass die akute Immunantwort bei Zelltransplantations-Versuchen essentiell zur Funktionsverbesserung beiträgt und dies nicht auf parakrine Effekte zurückzuführen ist. Interessant ist außerdem, dass die Aktivität der kardialen Fibroblasten durch bestimmten Makrophagen-Subtypen (CCR2⁺ und CX3CR1⁺ gewebständige Makrophagen) beeinflusst wird. In Bezug auf diese Arbeit, wäre es daher sehr interessant die einzelnen Makrophagen-Subtypen für die unterschiedlich behandelten Mäuse zu analysieren. So konnte *Vagnozzi et al* (2020) in einer Co-Kultur von isolierten kardialen Makrophagen und Fibroblasten zeigen, dass CCR2⁺ Makrophagen die Expression von u.a. α SMA in den Fibroblasten erhöhen (Vagnozzi et al. 2020). Auf der anderen Seite führten CX3CR1⁺ Makrophagen zur Reduktion von α SMA in Fibroblasten.

In Bezug auf die kardiale Pumpfunktion, konnte innerhalb der Kurzzeit Experimente eine leichte, aber dennoch signifikante Verbesserung in der Cx43-Gruppe gesehen werden. Dieser Effekt ist bisher noch nicht in Zusammenhang mit einer erhöhten Cx43 Expression in der Narbe publiziert worden. So führte z.B. die intramyokardiale Injektion des Cx43 LV zu keiner Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion (Roell et al. 2018). Es wäre daher denkbar, dass der Effekt von den injizierten Cx43 überexprimierenden Fibroblasten ausgeht. Eine erst kürzlich publizierte Studie von *Fiedorowicz et al.* (2021) konnte ebenfalls zeigen, dass die Transplantation von Cx43 überexprimierenden humanen Skelettmyoblasten (Cx43-huSkM) in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen zur signifikanten Verbesserung der links-ventrikulären Pumpfunktion führte (Fiedorowicz et al. 2021). Hierbei gilt es allerdings zu beachten, dass dieser Effekt auch bei der Kombination von huSkM (ohne Cx43 Überexpression) in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen gesehen werden konnte, sodass die Augmentation der Pumpfunktion sicher den transplantierten kontraktile Muskelzellen zuzuschreiben ist. Interessanterweise konnte nur bei Verwendung der Cx43-huSkM mit mesenchymalen Stammzellen eine signifikant erhöhte Kolonisierung der Stammzellen nach MI detektiert werden. Da sich in der vorliegenden Arbeit morphometrisch keine Unterschiede im Bereich der Infarktareale zeigten, ist die Verbesserung der kardialen Pumpfunktion am

wahrscheinlichsten auf Unterschiede in der Funktionalität der Zellen und hier v.a. der CM zurückzuführen. Es ist bekannt, dass CM in einem minderperfundierten Areal zwar noch vital, aber nicht mehr funktionell sein können, man spricht von myokardialer Hibernation. Als möglicher Mechanismus der Hibernation wird die herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Kalzium in der Herzmuskelzelle diskutiert, dauert dieser Zustand länger an, wandelt sich das Gewebe fibrotisch um (Martin et al. 1998). Da die heterozelluläre Kopplung z.B. mit Cx43 überexprimierenden eCF neben der elektrophysiologischen Komponente auch den Austausch anderer Substrate zulässt (Ribeiro-Rodrigues et al. 2017), können zumindest vorübergehend supportive Effekte durch die transplantierten Zellen auf das infarzierte Myokard der Grenzzone postuliert werden, dass eine mögliche Erklärung für die vorübergehend beobachtete Verbesserung der Pumpfunktion wäre. Um dies in Zukunft weiter zu untersuchen, wäre es interessant die behandelten Mäuse innerhalb einer Linksherz Druck-Volumen-Katheter Untersuchung über die rechte A. carotis zu analysieren, da diese Methode genauere Ergebnisse liefert als die Ultraschall Untersuchung alleine. Weiterhin kann die verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion auf strukturelle Veränderungen der Narbe (z.B. verringerte Steifheit) und parakrine Effekte nach Einbringen von Cx43 überexprimierenden Fibroblasten zurückzuführen sein, welche von der Arbeitsgruppe schon für Cx43 exprimierende CM nachgewiesen wurde (Sasse et al. 2008). Dazu könnte eine Expressionsstudie verschiedener Kollagene (z.B. Kollagen Typ 1a1), z.B. via Western blot durchgeführt werden. Eine aktuelle Studie konnte zeigen, dass auch der Reifestatus der Fibroblasten eine Rolle spielt. So zeichnen sich pränatale Fibroblasten durch eine hohe Proliferationsrate und eine hohe Kollagen Expression aus, während adulte/reife Fibroblasten dies nicht tun (Wu et al. 2020). Wie bedeutend die Aktivierung der kardialen Fibroblasten nach MI ist, zeigt eine aktuelle Studie von *Song et al.* (Song et al. 2020). Es konnte gezeigt werden, dass die Micro-RNA 145 (miR-145) entscheidend für die Aktivierung von Fibroblasten (aSMA⁺) ist und diese wiederum die Wundheilung beeinflussen. So konnte die Arbeitsgruppe in miR-145 KO Mäusen, eine massive Reduktion der aSMA⁺ Fibroblasten im Infarktareal im Vergleich zu Wildtyp-Tieren sehen, dass letztendlich zu einer signifikanten Ausdünnung der Narbe und Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion in den miR-145 KO Mäusen führte. Langfristig dünnnten die Infarktarnen aller Versuchsgruppen der vorliegenden Studie aus, die Ausdehnung (Oberfläche) der Läsionen konnte durch keine der durchgeführten

Therapien initial reduziert werden und nahm im Langzeitverlauf gruppenübergreifend zu, sodass die Tatsache, dass die initial sowieso schon quantitativ eher geringe Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion in den Langzeituntersuchungen nicht mehr nachweisbar war, nicht verwundert.

Den wohl größten funktionellen Effekt zeigte die elektrophysiologische Testung der Tiere. So zeigte die Transplantation Cx43 überexprimierender kardialer Fibroblasten, einen starken protektiven Effekt auf die Arrhythmieentstehung, auch innerhalb des längeren Beobachtungszeitraums. Dies wird durch eine signifikante Abnahme der VT Inzidenz, sowohl in den Kurzzeit-, als auch in den Langzeit Experimenten deutlich. So konnte bei den Mäusen mit Cx43-eCF eine Reduktion der VT Inzidenz von 45 % (Kurzzeit) und 40 % (Langzeit), im Vergleich zu Infarkttieren und Mäusen, welchen nicht Cx43 exprimierende eCF in das frisch infarzierte Myokard injiziert worden waren, gemessen werden. Die qualitative Auswertung der EPU Daten zeigte, dass bei den Cx43-eCF injizierten Mäusen, bei gleichem Testprotokoll, im Vergleich zu Kryoinfarkt und eGFP-eCF behandelten Tieren, insgesamt weniger VTs pro Tier induziert werden konnten, dass ebenfalls für eine geringere elektrische Vulnerabilität der Cx43 behandelten Infarktnarbe spricht. Innerhalb der Kurzzeit Versuche war dieser Effekt, im Vergleich zu der Gruppe mit den Kontrollfibroblasten (eGFP LV), nicht signifikant detektierbar (p-Wert= 0,05). Dies könnte daran liegen, dass durch das Einbringen von kardialen Fibroblasten, auch ohne Cx43 Überexpression, zumindest vorübergehend eine gewisse funktionelle Augmentation des Gewebes bedingt wird, welche auch in den Ultraschall Untersuchungen messbar war. Weiterhin werden sicherlich auch von diesen Zellen parakrine Effekte ausgehen (Mureli et al. 2013, Lim et al. 2018). Diese Effekte waren jedoch nicht so ausgeprägt, um die VT Induzierbarkeit dieser Tiere per se zu beeinflussen, welche bei 85 % in der Kurzzeitgruppe bzw. 80 % in der Langzeitgruppe lag. Neben der Anzahl an ausgelösten VTs, waren auch in Bezug auf die Dauer der beobachteten VTs signifikante Unterschiede der beiden zellinjizierten Gruppen, im Vergleich zu isoliert kryoinfarzierten Tieren, detektierbar. Auch dieses Ergebnis spricht insbesondere in der eGFP-eCF Gruppe dafür, dass, wie bereits beschrieben, das Einbringen vitaler Bindegewebszellen gewisse biophysikalische Effekte haben könnte. Vergleicht man die jetzt erhobenen Daten mit der Studie von *Röll et al.* (2007), so wurden damals lediglich die Tiere in VT auslösbar bzw. VT nicht auslösbar

eingeteilt und nicht wie hier beschrieben VT-Anzahl bzw. – Dauer pro Tier und EPU näher beleuchtet. Außerdem ist davon auszugehen, dass durch Verwendung des MNP/Magnet basierten Systems, während der Transplantation in der aktuellen Studie mehr Fibroblasten in der Narbe zurückgeblieben und in das Narbengewebe integriert sind, als in der im Jahr 2007 publizierten Studie von *Röll et al.* (Roell et al. 2007).

Es sollte erwähnt werden, dass auch bei Sham operierten Tieren eine gewisse Varianz bei der VT Anzahl und -Dauer auftrat. Denkbar wäre hier, dass die Perikardiotomie per se und die unterschiedliche starke Ausbildung von Adhäsionen des Epikards mit pulmonalem oder Thoraxgewebe, Auswirkungen auf die elektrophysiologische Stabilität während der EPU hat. Um dies auszuschließen, müssten zusätzlich CD1 Wildtypiere ohne Thorakotomie bzw. Perikardektomie untersucht werden. Diese Varianzen innerhalb der Sham-Gruppe waren lediglich auf den kürzeren Untersuchungszeitraum limitiert. Außerdem muss beachtet werden, dass je nach genetischem Hintergrund, Züchter und Wurf, die Empfindlichkeit bei der elektrophysiologischen Untersuchung variieren kann (Maguire et al. 2003). Deshalb wurden die in meinen Studien verwendeten Tiere immer bei demselben Züchter bestellt und aus einem Wurf, Kontroll- als auch Versuchsgruppen generiert. Im Allgemeinen scheint jedoch die VT Quantifizierung der wichtigere Faktor bei der elektrophysiologischen Beurteilung zu sein, wobei die Dauer der einzelnen VTs zweitrangig ist. Interessanterweise wurde kürzlich im Menschen mit Myokardinfarkt und reduzierter LVEF, welche kurz nach dem Infarkt ereignis eine EPU erhielten, gezeigt, dass bereits Patienten mit kurz andauernden induzierbaren VTs (2-10 s) eine ähnliche Prognose in Bezug auf Tod oder das Wiederauftreten von VTs haben, als Patienten mit lang andauernden induzierbaren VTs (> 10 s) während der initialen EPU (Deshmukh et al. 2020). Um weitere Informationen zur potentiell gesteigerten Reizleitungsgeschwindigkeit im Infarkt und vor allem in Bezug auf den Reentry-Mechanismus zu erhalten, sollten die Tiere elektrophysiologisch mittels „Optical voltage mapping“ untersucht werden. Das „Optical voltage mapping“ bietet eine quantitative Visualisierung der Reizleitungsgeschwindigkeit oder auch der Aktionspotentiale, innerhalb eines Langendorff-perfundiertem Herzens. Somit können weitere Aufschlüsse in Bezug auf die Reizweiterleitungsgeschwindigkeit im Infarkt getroffen werden (Roell et al. 2007, Lee et al. 2019, Filice et al. 2020). Bereits in der Vorstudie, mit direkter Injektion

der lentiviralen Konstrukte, in die sich organisierende Infarkt Narbe, zwei Tage nach initialer Läsion, wurden umfangreiche Untersuchungen zum möglichen protektiven Mechanismus durchgeführt (Roell et al. 2018). Es konnte eine signifikante Zunahme der Reizleitungsgeschwindigkeit innerhalb der Infarktzone nach Cx43 Gentransfer nachgewiesen werden. Die Voltage-mapping Daten zeigten eindeutig eine langsame (0,05 mm/ms) elektrotonische Weiterleitung der elektrischen Aktivität in die Narbenregion. Es ist bekannt, dass Myofibroblasten in der Lage sind *in vitro* elektrische Aktivität über Distanzen bis zu 300 μm zu leiten (Gaudesius et al. 2003, Kohl and Gourdie 2014, Tribulova et al. 2015). Weiterhin unterstreichen Studien mit spannungsempfindlicher Fluoreszenzproteinexpression in kardialen nicht-Myozyten, die heterotypische Zell-Zell-Kopplung (Quinn et al. 2016). Die Ergebnisse dieser Studie deuten also darauf hin, dass die Überexpression von Cx43 in Myofibroblasten, die Entstehung von Reentry Tachykardien um das Infarktareal herum vermindert, indem sie die elektrotonische Leitung der elektrischen Aktivität durch die Infarkt Narbe verstärkt (Roell et al. 2018). Sehr erstaunlich war in dieser Studie, dass bereits eine sehr geringe Zunahme der Längenkonzstante und der Leitungsgeschwindigkeit zu einer signifikanten Reduktion der VT Inzidenz führten. Es muss kritisch erwähnt werden, dass die geringe Größe des Mäuseherzens diesen funktionellen Effekt möglicherweise übertreibt. Zudem ist die Herzfrequenz bei der Maus (500-600 bpm) wesentlich schneller als im Menschen (60-70 bpm) (Wessels and Sedmera 2003) und die Dauer der murinen Aktionspotentiale wesentlich kürzer (Glukhov et al. 2010, Glukhov et al. 2010, Fedorov et al. 2011). Diese Tatsachen tragen andererseits dazu bei, dass die murinen VTs in der Regel, so auch im Rahmen dieser Studie, selbstlimitierend sind. Dies reduziert den technischen Aufwand und die Anzahl der zu untersuchenden Tiere, sodass die Testung neuer Therapieansätze, sowie die Beantwortung von grundlagenwissenschaftlichen Fragestellungen erleichtert werden. Trotz der beschriebenen Einschränkungen, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die Verringerung der Leitungsinhomogenität, auch innerhalb lokaler Bereiche größerer Herzen eine wichtige Auswirkung auf die Entstehung von post-Infarkt Arrhythmien haben könnte. Dies muss jedoch in großen Tiermodellen getestet werden, was aktuell im Rahmen des DFG SFB 1425 geschieht.

5.2 Cx43 als therapeutisches Target für eine (Myo-) Fibroblasten vermittelte anti-VT Therapie

Dass eine erhöhte Cx43 Expression in der Narbe durch Gen- oder Zelltransfer ein potentiell therapeutisches Target für eine anti-VT Therapie ist, wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt (Ke et al. 2020). Es ist dennoch bis heute nicht ausreichend nachgewiesen, inwieweit CM und FB vor allem im Bereich der BZ nach MI elektrisch gekoppelt sind (Driesen et al. 2007). Eine kürzlich publizierte Studie (Nagaraju et al. 2019) konnte jedoch *in vitro* eine Kopplung zwischen FB und CM nachweisen. *In vivo* wurde eine Kopplung von Quinn et al. (2016), sowie von Rubart et al. (2018) nachgewiesen (Quinn et al. 2016, Rubart et al. 2018). Diese heterozelluläre Kopplung war allerdings auf Myofibroblasten (mFB) limitiert, sodass zwischen residenten FB und CM keine Kopplung nachgewiesen werden konnte. Charakteristisch konnte bei mFB eine signifikant erhöhte aSMA Expression, eine Zunahme der Zellgröße und eine erhöhte Cx43 Expression gesehen werden (im Vergleich zu residenten FB). In Bezug auf die elektrische Kopplung zwischen CM und mFB konnte Schultz et al. (Schultz et al. 2019) zeigen, dass die heterozelluläre Kopplung aufgrund von Cx43 Gap junctions erfolgte. Bereits in einer früheren Studie demonstrierten Hou et al. (Hou et al. 2013), dass die eine erhöhte Cx43 Expression in primären ventrikulären FB zu einer verbesserten Weiterleitung von APs innerhalb von Co-Kulturen aus FB und CM *in vitro* führt. Innerhalb dieser Studie wurde allerdings auch demonstriert, dass eine Überexpression anderer Ionenkanäle (Kalium: Kir 2.1 oder Natrium: Nav1.5) in den kardialen FB ebenfalls positiv auf die Reizweiterleitung zwischen FB und CM wirken, allerdings nur in Zusammenhang mit einer Überexpression von Cx43. So wurde bereits in einer *in vivo* Studie (im Ratten- und Schweinemodell) nach Transplantation von Kv1.3 überexprimierenden Fibroblasten in den Myokardinfarkt demonstriert, dass zwar eine heterozelluläre Kopplung vorliegt, es allerdings zur einer Verlängerung der Refraktärperiode und Verkürzung der AP-Dauer kommt (Yankelson et al. 2008).

Die in der vorliegenden Studie transplantierten eCF sind aufgrund der hohen aSMA Expression strukturell ebenfalls als mFB anzusehen. Sie zeigen nach lentiviraler Transduktion (Cx43 LV) eine deutlich erhöhte Cx43 Expression. Es ist aufgrund der elektrophysiologischen Ergebnisse der Studie, der *in vitro* erhobenen FRAP Daten

(allerdings wurde die Cx43 Transduktion dieser Zellen mit dem MMLV durchgeführt), sowie der eben beschriebenen Vordaten anderer Arbeitsgruppen davon auszugehen, dass diese Zellen (deren Transplantation erfolgte meist mittig im Infarkt) an der Reizweiterleitung beteiligt sind und die Inzidenz von Reentry's an der BZ reduzieren.

Es bleibt offen, ob die Menge, die Lokalisation und/oder das Verteilungsmuster von Cx43 in der Narbe eine entscheidende Rolle bei der elektrischen Reizweiterleitung spielt. Dies bedeutet, ob eine steigende Cx43 Expression, auch eine analog ansteigende Verbesserung der Reizweiterleitung und damit Reduktion der elektrischen Vulnerabilität bewirkt, oder eher kleine „Zellinseln“ mit erhöhtem Cx43 Gehalt, wie in der vorliegenden Arbeit optimal für die Prävention von post-Infarkt Arrhythmien sind? Denn gerade durch die Transplantation von Cx43⁺ Zellen (z.B. transduzierte Fibroblasten) oder durch die intramyokardiale Injektion von Virus/MNP Komplexen, wäre eine Expression von Cx43 über die ganze Narbe nicht zu erreichen. Diese Fragestellung wird aktuell innerhalb der Arbeitsgruppe in einem neu generierten Mausmodell bearbeitet. In diesem Modell ist die Cx43 Expression an ein mFB spezifisches Gen gekoppelt (Periostin) (Kanisicak et al. 2016), dass zu einer homogenen Cx43 Expression in der Mehrzahl der Myofibroblasten im Läsionsbereich führt.

5.3 Optimierung der Transduktionseffizienz kardialer Fibroblasten

Kardiale Fibroblasten spielen eine bedeutende Rolle in der kardiovaskulären Forschung. Bisher fehlte jedoch ein Virus bzw. eine Transduktionsmethode, um diese Zellen möglichst effizient zu transduzieren. In früheren Studien wurden bereits Lentiviren (Roell et al. 2018), Adenoviren (Lattanzi et al. 2008) oder AAV's (Francisco et al. 2021) getestet. Diese verschiedenen Virustypen weisen erhebliche Nachteile auf, u.a. eine geringe Transduktionseffizienz, kein spezifischer Zelltropismus oder hohe Lebertoxizität. So werden z.B. mittels Lentivirus, auch andere Zellen im Infarktgebiet, wie z.B. Endothelzellen oder Immunzellen transduziert (Roell et al. 2018). Aufgrund dessen wurde parallel zu den Transplantationsexperimenten mittels *in vitro* lentiviral transduzierten Fibroblasten, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. S. Engelhardt (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, TU München), nach effizienteren und spezifischeren Vektoren gesucht. Die AG hatte bereits vorher das MMLV *in vivo* zur Transduktion von embryonalen Herzen verwendet, indem das Virus in den Herzbeutel gesunder Mäuser

3- 4 Tage nach der Geburt injiziert wurde. Drei Wochen später konnten die Autoren eine relativ spezifische Transduktion von Fibroblasten und Endothelzellen nachweisen, während CM kaum durch diesen Vektor beeinflusst wurden (Ramanujam et al. 2016). Ich habe in meiner Dissertationsarbeit deshalb das MMLV *in vitro* zur Transduktion von Fibroblasten verwendet.

Die *in vitro* Transduktion von Fibroblasten habe ich entweder durch Zugabe der Viruskonstrukte über Nacht oder mittels Zugabe von Virus/MNP Komplexen und Applikation von entsprechenden Magneten für 30 Minuten, wie bereits im Jahre 2016 von Vosen et al. publiziert (Vosen et al. 2016) durchgeführt. Durch Komplexierung des Virus an MNP kann die Transduktion zum einen zielgerichtet stattfinden und zwar nur dort, wo ein Magnet platziert wird. Außerdem gelangt durch die magnetische Anziehung der Virus/MNP Komplexe eine größere Menge an viralen Vektoren in die Zielzellen und die Transduktionseffizienz wird deutlich gesteigert. Innerhalb des hier dargestellten Projektes konnte mit Hilfe der Kopplung von MMLV und SoMag5-MNP eine signifikant verbesserte Transduktionseffizienz bei Fibroblasten erzielt werden (ca. 80 % vs. 20 % bei Transduktion mit Virus ohne MNP). Dieses Ergebnis konnte sowohl bei 3T3- Fibroblasten, als auch bei primären kardialen Fibroblasten erreicht werden. Im Vergleich dazu konnte eine Transduktion mit Lentivirus unter denselben Bedingungen nur eine Transduktionseffizienz von ca. 25 % erzielen. Diese Ergebnisse zeigen, dass das MMLV sich hervorragend für die Transduktion von Fibroblasten, u.a. auch kardialen Fibroblasten eignet. Um bei einer eventuellen späteren klinischen Anwendung die Spezifität weiter zu steigern, müssten fibroblastenspezifische Promotoren, wie z.B. Periostin oder TCF21 in die Vektoren integriert werden. Eine Studie von Francisco et al. (2021) hat dies bereits adressiert und so konnte durch Verwendung eines AAV-TCF21 Vektors *in vitro* gezielt ein Protein in kardialen Fibroblasten exprimiert werden (Francisco et al. 2021). Auf der anderen Seite ist es fraglich, inwieweit man dies an infarzierten Mäusen analysieren könnte. AAV's integrieren nicht ins Wirtsgenom und können somit nur bei nicht-proliferierenden Fibroblasten verwendet werden.

5.3.1 MMLV in der Gentherapie

Die oben gezeigten Ergebnisse veranschaulichen zwar, dass Retroviren wie z.B. MMLV sehr effektive Vektoren zur Transduktion kardialer Fibroblasten darstellen, dennoch muss

für eine spätere Anwendung im Menschen für eine ausreichende Patientensicherheit (Integration in Proto-Onkogene und Immunantwort) gesorgt sein. Ein wichtiger Aspekt hierbei, ist die Immunantwort des Organismus möglichst gering zu halten. Es ist bekannt, dass z.B. bei der Anwendung von Adenoviren das angeborene Immunsystem durch die viralen Hüllproteine oder Genprodukte schon 24 Stunden nach Virus-Applikation aktiviert wird. Dies führt zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, welche wiederum zusätzliche Immunzellen rekrutieren. Folglich werden innerhalb der ersten 24 Stunden nach Virus-Applikation schon 80 % der viralen Partikel aus dem Organismus entfernt. Die Immunantwort kann durch einige Faktoren (Viruspromotoren, Dosierung des Vektors, Administrationsroute oder auch die individuellen Eigenschaften des Patienten) bestärkt oder vermindert werden (Bessis et al. 2004). Weiterhin spielt die Biosicherheit bei der Verwendung von viralen Vektoren in der Gentherapie eine entscheidende Rolle. Um dies zu umgehen, ist die *ex vivo* Gentherapie z.B. mit Patienteneigenen (Stamm-) Zellen beliebt. Die aus dem Patienten entnommenen Zellen werden zunächst genetisch modifiziert, z.B. via viraler Partikel und anschließend wieder in den Patienten gebracht, um so eine Immunantwort auf das Virus zu vermeiden (Rejali et al. 2007, Razi Soofiyan et al. 2013). Insbesondere MMLVs können onkogen wirken und aufgrund ihrer potentiellen Integration in das Wirtsgenom bestimmte Onkogene aktivieren oder Tumorsuppressorgene deaktivieren (Coffin 1996). Das MMLV wurde bereits vor mehreren Jahren in ersten klinischen Studien bei der Therapie der Immunschwächenkrankheit X-SCID verwendet. Damals entwickelten 3 von 10 behandelten Kindern eine premaligne T-Zell Proliferation und die Verwendung des MMLV als Vektor in humanen Studien wurde zunächst ausgesetzt (Cavazzana-Calvo et al. 2000). Eine potentiell bessere Biosicherheit könnte die Verwendung von self-inactivating (SIN) Vektoren geben. Hierbei ist zwar der viruseigene Promoter (LTR) am 5'-Ende intakt, wohingegen der LTR-Promoter am 3'-Ende inaktiviert vorliegt. Die Inaktivierung erfolgt als Basendeletion, sodass vor allem viruseigene Enhancer und Promotoren betroffen sind. Dadurch ist die Gefahr der Transkription von Onkogenen potentiell minimiert. Anstelle des viralen Promoters kann ein anderer Promoter (z.B. Tcf21) fungieren (Yu et al. 1986, Cavazza et al. 2013, Acevedo et al. 2018). Basierend auf früheren Studien mit retroviralen SIN-Vektoren und deren geringeren onkogenen Potential, wurde erneut eine klinische Studie zur humanen Therapie von X-SCID angesetzt. Dieses Mal unter Verwendung von

retroviralen SIN-Vektoren, die mit einer gleichen Effizienz wie ihre Vorgänger einhergingen und erfreulicherweise entwickelte keiner der Patienten eine Leukämie (Hacein-Bey-Abina et al. 2014). Folglich wäre eine *in vivo* Gentherapie mittels MMLV unter Verwendung von SIN-Vektoren denkbar.

5.4 Verwendung magnetischer Nanopartikel in Gen- bzw. Zellersatztherapien

Die Verwendung magnetischer Nanopartikel im Zusammenhang mit Gen- bzw. Zellersatztherapien ist ein eleganter und effektiver Ansatz, um die Effizienz der Transduktion oder Zellretention nachhaltig zu erhöhen. Ich konnte in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Zellretention nach Transplantation von kardialen Fibroblasten in die Infarktnarbe mit Hilfe der Tamra-MNP und Magneteinwirkung um das dreifache gesteigert wird. Andererseits wurde die Transduktionseffizienz von Fibroblasten *in vitro* durch die Kopplung von MMLV und MNP signifikant verbessert und auf ein sehr hohes Niveau gebracht (ca. 80 % Transduktionseffizienz). Nichtsdestotrotz birgt die Verwendung von MNP auch einige Risiken, weshalb heutige Forschungsansätze meist auf Verwendung von MNP verzichten und Nanopartikel (NP) mit anderen physikalischen Eigenschaften verwenden. Das wohl größte Problem von MNP, stellt der Eisenkern dar, da Eisen ab gewissen Konzentrationen (20-60 mg Fe/kg Körpergewicht (Hahn 2009)) toxisch ist. Eine Alternative ist es, die MNP mit einer Hüllschicht zu umschließen (Ali et al. 2022, Fang et al. 2022). So haben bereits unsere Kooperationspartner aus Zaragoza (Spanien) Eisenoxid MNP entwickelt, die dieselbe Struktur wie die Tamra-MNP besitzen, allerdings mit zusätzlichen PEG- (Polyethylen Glykol) oder Glucose-Molekülen auf der Hüllschicht versehen sind. Diese PEG- oder Glucose-MNP werden präferentiell für die intravenöse Applikation verwendet, da sie im Vergleich zu den Tamra-MNP eine geringe Aggregation mit Plasmaproteinen und eine höhere Stabilität z.B. im Zellkulturmedium aufweisen (Stepien et al. 2018). Die Tamra-MNP (nur PMAO Hülle) werden von ihnen hauptsächlich bei der direkten Injektion in Tumorgewebe verwendet, bei der die Stabilität der MNP keine große Rolle spielt (Beola et al. 2021).

Eine andere Möglichkeit um die Toxizität des Eisenkerns zu umgehen, wäre die Verwendung eines Kerns aus Gold (Fratila et al. 2014). Zwar fällt dann das Prinzip der magnetischen Anziehung von Virus/MNP Komplexen weg, aber die NP könnten zusätzlich mit Antikörpern versehen werden und so eine Kopplung mittels Antigen-Antikörper

Bindung an den Zielzellen ermöglichen (Cheng et al. 2014). Schwierig ist allerdings die Selektion eines spezifischen Fibroblastenmarkers als Antikörper. Denn die häufig verwendeten Fibroblastenmarker, wie z.B. Vimentin, α SMA und Periostin sind teilweise unspezifisch oder werden je nach Zeitpunkt nach MI, nicht von allen Fibroblasten exprimiert (Tallquist and Molkenin 2017). Eine Möglichkeit wäre die Verwendung z.B. Tcf21 oder PDGFR α (Tallquist and Molkenin 2017). Auf der anderen Seite bietet die Verwendung von MNP bei zell- oder gentherapeutischen Ansätzen die Möglichkeit der nicht-invasiven Darstellung der Verteilung der eingebrachten MNP *in vivo* in den verschiedenen Organen des Organismus via Magnetresonanztomographie (MRT) (Mathiasen et al. 2013, Parashurama et al. 2016).

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen das protektive Potential von Cx43 die Entstehung von post-Infarkt Arrhythmien zu unterdrücken. Es wurde herausgestellt, dass Cx43 nicht nur Auswirkungen auf die Leitfähigkeit der Narbe hat, sondern auch biologische Veränderungen durch potentielle parakrine Effekte entstehen können. Um dies weiter zu untersuchen, wurden im Institut für Physiologie I der Universität Bonn bereits zwei Mausmodelle generiert (von P. Niemann), die Cx43 in bestimmten Zelltypen überexprimieren. Aktuell wird zum einen untersucht, inwieweit eine induzierbare Cx43 Überexpression in CM (Rosa26^{CAG-Cx43-GSGP2A-mCherry} x Myh6^{MCM}) ohne oder mit MI Auswirkungen auf die biologischen und physiologischen Eigenschaften der Narbe hat. Außerdem wurde zusätzlich ein Mausmodell generiert, das konditionell Cx43 in Myofibroblasten (Rosa26^{CAG-Cx43-P2A-mCherryloxP} x Postn^{MCM}) nach MI überexprimiert. Hierbei ist es besonders interessant, welchen Effekt eine homogene Cx43 Expression der gesamten Narbe hat. Zusätzlich kann hier erstmals die elektrische Kopplung von FB und Cx43 überexprimierenden CM in der Borderzone von Myokardinfarkten *in-* und *ex vivo* im Gewebeverband genau untersucht werden.

Durch diese Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass das MMLV bei der Transduktion von murinen kardialen Fibroblasten wesentlich effizienter ist, als der bisher verwendete Lentivirus. Die hier gezeigten *in vitro* Ergebnisse sind Vorversuche zu geplanten *in vivo* Versuchen. Die *in vivo* Versuche sind bereits über den TVA (AZ= 81.02.04.2018.A120) genehmigt und Teil einer weiteren wissenschaftlichen Doktorarbeit. Zusätzlich soll als

weiterer Zwischenschritt für eine geplante humane Anwendung, das MMLV an isolierten kardialen Fibroblasten aus dem Schwein und an humanen kardialen Fibroblasten *in vitro* getestet werden. Dazu muss zunächst ein neuer MML-Vektor kloniert bzw. produziert werden. Das in dieser Arbeit verwendete MMLV ist ein ecotroper Vektor und infiziert lediglich Nagerzellen. Um Säugetier-Zellen zu infizieren müsste ein amphotroper Vektor verwendet werden. Der Unterschied zwischen beiden Vektoren, liegt in der Art der Verpackungslinie. So wurde für den hier verwendeten MMLV die 3T3-Zelllinie (muriner Ursprung) als Verpackung verwendet, während für den amphotropen MMLV z.B. HEK293-Zellen (humaner Ursprung) verwendet werden müssten. (Katen et al. 2001).

Funktionieren die bereits in Produktion befindlichen Retroviren wie geplant im Großtiermodell, würden neben der intramyokardialen Applikationsroute auch weitere Applikationsmöglichkeiten (z.B. ante- oder retrograd intrakoronar oder intramyokardial via endokardialer Injektion, Applikation über Bypassgrafts) zur Verfügung stehen.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit umfasste zwei Hauptthemenkomplexe. Im ersten Teil wurde die MNP/Magnet basierte Transplantation von Cx43 überexprimierenden primären kardialen Fibroblasten in die murine Infarkt Narbe, nach vorausgehender lentiviralen Transduktion und MNP Beladung untersucht. Im zweiten Teil erfolgte die Optimierung der Transduktionseffizienz von kardialen Fibroblasten unter Verwendung des murinen moloney Leukämievirus (MMLV) mittels MNP/Magnet basierter Transduktion.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Hauptfragestellung geklärt, ob funktionell die Inzidenz von ventrikulären Tachykardien (VTs) nach Infarkt durch Erhöhung des Cx43 Gehalts in der Narbe reduziert werden und das Einwachsen der Zellen durch Verwendung von MNP/Magnet basierter Transplantation erhöht werden kann. Als Zielzellen wurden kardiale Fibroblasten (eCF) durch direkten myokardialen Gentransfer in die Infarkt Narbe gebracht. Durch vorherigen lentiviralen Gentransfer wurde der Cx43 Gehalt dieser Zellen mehr als verdoppelt. Außerdem zeigten die Cx43 überexprimierenden Myofibroblasten eine Hochregulation von kardialen Genen (z.B. Tnnt2, Gata4). Nach Transplantation dieser Zellen (Cx43 überexprimierend), konnte sowohl nach 2 als auch nach 8 Wochen eine deutlich reduzierte Arrhythmieneigung bei den Mäusen gesehen werden. Es wurde ebenfalls eine leichte Zunahme der linksventrikulären Pumpfunktion in den Mäusen mit Cx43-eCF gesehen, welche allerdings nicht bis zu den Langzeit-Versuchen anhielt. Die Untersuchung des Cx43 Gehalts, speziell in der Narbe der behandelten Mäuse, ergab eine deutlich gesteigerte Cx43 Expression in den Mäusen mit den Cx43-überexprimierenden eCF. Dies konnte sowohl nach 2 als auch nach 8 Wochen in histologischen Aufnahmen gesehen bzw. mittels Western blot quantifiziert werden. Die Analyse des Zellengraftment ergab, dass durch die Verwendung der MNP/Magnet basierten Zelltransplantation, die Anzahl der eingewachsenen eCF um das dreifache gesteigert werden konnte. Die Gesamtzahl der nach intramyokardialer Injektion integrierten Zellen, war mit keinem der bisher verwendeten Zelltypen derart hoch. Dies ist vermutlich nicht nur der Verwendung des MNP/Magnet Systems geschuldet, sondern auch der Verwendung von kardialen Fibroblasten als Zielzellen. Die Transplantation und

das verbesserte Zelleinwachsen der kardialen Fibroblasten hatte allerdings keine Auswirkungen auf die Infarktgröße.

Durch die vorherige Transduktion der eCF mittels Lentivirus konnte lediglich eine geringe Effizienz erzielt werden, sodass im 2. Teil dieser Arbeit ein weiteres Retrovirus (MMLV) für den Gentransfer in kardialen Fibroblasten analysiert wurde. Durch die Verwendung des MMLV konnte sowohl mit den Viruspartikeln alleine, als auch mit der MNP/Magnet basierten Transduktionsmethode, eine stark verbesserte Effizienz in kardialen Fibroblasten im Vergleich zum bisher verwendeten Lentivirus gesehen werden. Die anschließenden Analysen ergaben, dass das neu generierte MMLV sowohl zur zuverlässigen Überexpression von Cx43 in den kardialen Fibroblasten führte, als auch, dass die eprimierten Cx43 Kanäle funktionell aktiv waren und somit ein wertvolles neues „Werkzeug“ für weitere Studien zur Verfügung steht.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung eines Myokardinfarktes (MI).	10
Abbildung 2: Reizweiterleitung im Herzen.	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines normalen EKG und beispielhafter VT.	16
Abbildung 4: Phasen des kardialen Remodelings nach Infarkt in der Maus.	18
Abbildung 5: Experimentelle Infarktmodelle.	20
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Cx43 Transmembran Kanals.	22
Abbildung 7: Phänotypen der kardialen Fibroblasten und deren Expressionsprofil vor und nach Myokardinfarkt.	27
Abbildung 8: Schematische Abbildung der MNPs.	29
Abbildung 9: Lentivirale Vektoren.	46
Abbildung 10: Vektorkarte des Ai6-Cx43-GSGP2A-mCherry Konstruktes.	47
Abbildung 11: MMLV Vektoren.	47
Abbildung 12: Verwendete Magnete für die Virus/MNP basierte Transduktion.	50
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Gewinnung und Kultivierung von primären murinen embryonalen Fibroblasten (eCF).	56
Abbildung 14: Schematische Darstellung des FRAP Experiments.	60
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Vorbereitung der eCF für die intramyokardiale Transplantation in die Infarktnarbe.	61
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Kryoläsion.	61
Abbildung 17: Intramyokardiale Injektion von MNP beladenen transduzierten Zellen.	64
Abbildung 18: Zeitliche Darstellung der funktionellen Experimente nach eCF Transplantation.	64
Abbildung 19: Schematische Darstellung der echokardialen Auswertung.	66

Abbildung 20: Darstellung des oktapolaren Katheters (A), sowie die Oberflächen-Elektroden (B) während der elektrophysiologischen Untersuchung.	68
Abbildung 21: Makroskopische Aufnahme einer Kryoläsion mit eingezeichnetem Infarktareal.	82
Abbildung 22: Charakterisierung der isolierten eCF vor Transduktion und Bestimmung der Transduktionseffizienz.	88
Abbildung 23: Analyse der Cx43 Expression der transduzierten eCF an t12.	90
Abbildung 24: RNA Sequenzierung (Seq) der eGFP LV oder Cx43 LV transduzierten eCF an t12.	93
Abbildung 25: Analyse der aSMA und TGFb Expression der nativen (WT) und transduzierten eCF an t12.	95
Abbildung 26 Echokardiographische Analyse der Herzfunktion nach Kurzzeit-Transplantation der transduzierten eCF.	97
Abbildung 27: Quantifizierung der Gesamt-VT-Inzidenz <i>in vivo</i> nach Kurzzeit-Transplantation der transduzierten eCF.	99
Abbildung 28: Quantitative und qualitative Analyse der einzelnen VTs pro Maus nach Kurzzeit-Transplantation der transduzierten eCF.	100
Abbildung 29: Echokardiographische Analyse der Herzfunktion nach Langzeit-Transplantation der transduzierten eCF.	102
Abbildung 30: Quantifizierung der Gesamt-VT-Inzidenz <i>in vivo</i> nach Langzeit-Transplantation der transduzierten eCF.	103
Abbildung 31: Quantitative und qualitative Analyse der einzelnen VTs pro Maus nach Langzeit-Transplantation der transduzierten eCF.	105
Abbildung 32: Makroskopische Aufnahmen zur Bestimmung des Zellengraftments nach Transplantation transduzierter Fibroblasten.	107
Abbildung 33: Analyse der Cx43 Expression im Infarktareal nach Kurzzeit Transplantation der transduzierten eCF.	109

Abbildung 34: Analyse der Cx43 Expression im Infarktareal nach Langzeit Transplantation der transduzierten eCF.	111
Abbildung 35: Histologische Analyse der engrafteten Zellen des Infarktareals nach Kurzzeit Transplantation von transduzierten embryonalen Fibroblasten.	113
Abbildung 36: Histologische Analyse der engrafteten Zellen des Infarktareals nach Langzeit Transplantation von transduzierten embryonalen Fibroblasten.	114
Abbildung 37: Quantifizierung der eingewachsenen transplantierten eCF.	115
Abbildung 38: Histologische Übersichtsbilder der Infarktareale nach Transplantation der transduzierten und mit MNP beladenen Fibroblasten.	117
Abbildung 39: Bestimmung der Infarktoberfläche anhand makroskopischer Aufnahmen.	118
Abbildung 40: Bestimmung des Infarktvolumens des linken Ventrikels.	119
Abbildung 41: Analyse des Magneteffektes bei der Magnet-unterstützten Transplantation von MNP beladenen kardialen Fibroblasten in kryoinfarziertes Myokard.	121
Abbildung 42: Auswirkungen der Anzahl an in das Infarktareal integrierten Cx43 überexprimierenden eCF auf die VT Inzidenz.	122
Abbildung 43: Konzentrationsabhängige Transduktionseffizienz von 3T3 Fibroblasten durch das MMLV.	124
Abbildung 44: Analyse der MNP/Magnet basierten Transduktionseffizienz von MMLV an 3T3 Fibroblasten.	126
Abbildung 45: Analyse der Transduktionseffizienzen des neu generierten MMLV an 3T3 Fibroblasten.	128
Abbildung 46: Analyse der Cx43 Expression des neu generierten MMLV-Cx43 an 3T3 Fibroblasten.	130
Abbildung 47: Analyse der Transduktionseffizienzen des neu generierten MMLV an primären kardialen Fibroblasten (eFC).	132

Abbildung 48: Analyse der Cx43 Expression des neu generierten MMLV-Cx43 an primären kardialen Fibroblasten (eCF). 134

Abbildung 49: Überprüfung der Funktionalität der Virus exprimierten Cx43 Gap junctions (Gj). 136

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und gekaufte Lösungen	32
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	35
Tabelle 3: Verwendete Geräte	37
Tabelle 4: Verwendete Software	39
Tabelle 5: Zusammensetzung von Puffer und Lösungen	40
Tabelle 6: Verwendete Kits	44
Tabelle 7: Zellkulturmedium und Zusätze	45
Tabelle 8: Zusammensetzung des Zellkulturmediums	45
Tabelle 9: Physikalische Eigenschaften der MNP	49
Tabelle 10: Primer Sequenzen	51
Tabelle 11: TaqMan™ Sonden	51
Tabelle 12: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen	51
Tabelle 13: Primäre Antikörper zur Western Blot Detektion	52
Tabelle 14: Sekundäre Antikörper	53
Tabelle 15: Erste Runde der programmierten Stimulation	68
Tabelle 16: Zweite Runde der programmierten Stimulation	69
Tabelle 17: Dritte Runde der programmierten Stimulation	70
Tabelle 18: Burst Stimulation	70
Tabelle 19: Übersicht der Kooperationen	85

9 Literaturverzeichnis

(WHO) WHO. (2020). "The top 10 causes of death." from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

Acevedo ML, García-de Gracia F, Miranda-Cárdenas C, Soto-Rifo R, Aguayo F and León O. Differences in the internalization of self-inactivating VSVG-pseudotyped murine leukemia virus-based vectors in human and murine cells. *J Virol Methods* 2018; **255**: 14-22. 10.1016/j.jviromet.2018.02.005

Agah R, Kirshenbaum LA, Abdellatif M, Truong LD, Chakraborty S, Michael LH and Schneider MD. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo. *J Clin Invest* 1997; **100**(11): 2722-2728. 10.1172/jci119817

Agullo-Pascual E, Cerrone M and Delmar M. Arrhythmogenic cardiomyopathy and Brugada syndrome: diseases of the connexome. *FEBS Lett* 2014; **588**(8): 1322-1330. 10.1016/j.febslet.2014.02.008

Ali AA, Abuwatfa WH, Al-Sayah MH and Hussein GA. Gold-Nanoparticle Hybrid Nanostructures for Multimodal Cancer Therapy. *Nanomaterials (Basel)* 2022; **12**(20)10.3390/nano12203706

Amoni M, Dries E, Ingelaere S, Vermoortele D, Roderick HL, Claus P, Willems R and Sipido KR. Ventricular Arrhythmias in Ischemic Cardiomyopathy-New Avenues for Mechanism-Guided Treatment. *Cells* 2021; **10**(10)10.3390/cells10102629

Anderson JL and Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2017; **376**(21): 2053-2064. 10.1056/NEJMra1606915

Araújo NM, Rubio IGS, Toneto NPA, Morale MG and Tamura RE. The use of adenoviral vectors in gene therapy and vaccine approaches. *Genet Mol Biol* 2022; **45**(3 Suppl 1): e20220079. 10.1590/1678-4685-gmb-2022-0079

Asazuma-Nakamura Y, Dai P, Harada Y, Jiang Y, Hamaoka K and Takamatsu T. Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Exp Cell Res* 2009; **315**(7): 1190-1199. 10.1016/j.yexcr.2008.12.021

Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK and Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**(3): H1883-1891. 10.1152/ajpheart.00514.2007

Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kléber AG, Schuessler RB and Saffitz JE. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 2000; **87**(8): 656-662. 10.1161/01.res.87.8.656

Begandt D, Good ME, Keller AS, DeLalio LJ, Rowley C, Isakson BE and Figueroa XF. Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. *BMC Cell Biol* 2017; **18**(Suppl 1): 2. 10.1186/s12860-016-0119-3

- Bensley JG, De Matteo R, Harding R and Black MJ. Three-dimensional direct measurement of cardiomyocyte volume, nuclearity, and ploidy in thick histological sections. *Sci Rep* 2016; **6**: 23756. 10.1038/srep23756
- Beola L, Grazú V, Fernández-Afonso Y, Fratila RM, de Las Heras M, de la Fuente JM, Gutiérrez L and Asín L. Critical Parameters to Improve Pancreatic Cancer Treatment Using Magnetic Hyperthermia: Field Conditions, Immune Response, and Particle Biodistribution. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021; **13**(11): 12982-12996. 10.1021/acsami.1c02338
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, Sjöstrom SL, Szewczykowska M, Jackowska T, Dos Remedios C, Malm T, Andrä M, Jashari R, Nyengaard JR, Possnert G, Jovinge S, Druid H and Frisén J. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 2015; **161**(7): 1566-1575. 10.1016/j.cell.2015.05.026
- Bessis N, GarciaCozar FJ and Boissier MC. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther* 2004; **11 Suppl 1**: S10-17. 10.1038/sj.gt.3302364
- Bish LT, Morine K, Sleeper MM, Sanmiguel J, Wu D, Gao G, Wilson JM and Sweeney HL. Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum Gene Ther* 2008; **19**(12): 1359-1368. 10.1089/hum.2008.123
- Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, Gres P, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Heusch G and Schulz R. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol* 2009; **104**(2): 141-147. 10.1007/s00395-009-0007-5
- Bouabe H, Fässler R and Heesemann J. Improvement of reporter activity by IRES-mediated polycistronic reporter system. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**(5): e28. 10.1093/nar/gkm1119
- Camelliti P, Green CR, LeGrice I and Kohl P. Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res* 2004; **94**(6): 828-835. 10.1161/01.res.0000122382.19400.14
- Cardiology DGfKESo. Vierte Definition des Myokardinfarktes. 2018;
- Cavazza A, Cocchiarella F, Bartholomae C, Schmidt M, Pincelli C, Larcher F and Mavilio F. Self-inactivating MLV vectors have a reduced genotoxic profile in human epidermal keratinocytes. *Gene Ther* 2013; **20**(9): 949-957. 10.1038/gt.2013.18
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL and Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000; **288**(5466): 669-672. 10.1126/science.288.5466.669
- Cheng K, Shen D, Hensley MT, Middleton R, Sun B, Liu W, De Couto G and Marbán E. Magnetic antibody-linked nanomatchmakers for therapeutic cell targeting. *Nat Commun* 2014; **5**: 4880. 10.1038/ncomms5880

- Cho N, Razipour SE and McCain ML. Featured Article: TGF- β 1 dominates extracellular matrix rigidity for inducing differentiation of human cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Exp Biol Med* (Maywood) 2018; **243**(7): 601-612. 10.1177/1535370218761628
- Cho SW, Kim IK, Bhang SH, Joung B, Kim YJ, Yoo KJ, Yang YS, Choi CY and Kim BS. Combined therapy with human cord blood cell transplantation and basic fibroblast growth factor delivery for treatment of myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2007; **9**(10): 974-985. 10.1016/j.ejheart.2007.06.012
- Coffin JM. Retrovirus restriction revealed. *Nature* 1996; **382**(6594): 762-763. 10.1038/382762a0
- Collins M and Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci* 2015; **282**(1821): 20143003. 10.1098/rspb.2014.3003
- Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F and Lammers T. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2019; **138**: 302-325. 10.1016/j.addr.2019.01.005
- Davis J, Burr AR, Davis GF, Birnbaumer L and Molkenin JD. A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev Cell* 2012; **23**(4): 705-715. 10.1016/j.devcel.2012.08.017
- de Oliveira Camargo R, Abual'anaz B, Rattan SG, Filomeno KL and Dixon IMC. Novel factors that activate and deactivate cardiac fibroblasts: A new perspective for treatment of cardiac fibrosis. *Wound Repair Regen* 2021; **29**(4): 667-677. 10.1111/wrr.12947
- De Vuyst E, Wang N, Decrock E, De Bock M, Vinken M, Van Moorhem M, Lai C, Culot M, Rogiers V, Cecchelli R, Naus CC, Evans WH and Leybaert L. Ca(2+) regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. *Cell Calcium* 2009; **46**(3): 176-187. 10.1016/j.ceca.2009.07.002
- Deshmukh T, Zaman S, Narayan A and Kovoov P. Duration of Inducible Ventricular Tachycardia Early After ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction and Its Impact on Mortality and Ventricular Tachycardia Recurrence. *J Am Heart Assoc* 2020; **9**(13): e015204. 10.1161/jaha.119.015204
- Dittrich GM, Froese N, Wang X, Kroeger H, Wang H, Szaroszyk M, Malek-Mohammadi M, Cordero J, Keles M, Korf-Klingebiel M, Wollert KC, Geffers R, Mayr M, Conway SJ, Dobrev G, Bauersachs J and Heineke J. Fibroblast GATA-4 and GATA-6 promote myocardial adaptation to pressure overload by enhancing cardiac angiogenesis. *Basic Res Cardiol* 2021; **116**(1): 26. 10.1007/s00395-021-00862-y
- Dobaczewski M, Bujak M, Li N, Gonzalez-Quesada C, Mendoza LH, Wang XF and Frangogiannis NG. Smad3 signaling critically regulates fibroblast phenotype and function in healing myocardial infarction. *Circ Res* 2010; **107**(3): 418-428. 10.1161/circresaha.109.216101
- Driesen RB, Verheyen FK, Dijkstra P, Thoné F, Cleutjens JP, Lenders MH, Ramaekers FC and Borgers M. Structural remodelling of cardiomyocytes in the border zone of infarcted rabbit heart. *Mol Cell Biochem* 2007; **302**(1-2): 225-232. 10.1007/s11010-007-9445-2

- Duerr GD, Elhafi N, Bostani T, Ellinger J, Swieny L, Kolobara E, Welz A and Dewald O. Comparison of myocardial remodeling between cryoinfarction and reperfused infarction in mice. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 961298. 10.1155/2011/961298
- Eaton LW and Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: its relationship to infarct morphology in a canine model. *Circ Res* 1981; **49**(1): 80-88. 10.1161/01.res.49.1.80
- Echt DS, Liebson PR, Mitchell LB, Peters RW, Obias-Manno D, Barker AH, Arensberg D, Baker A, Friedman L, Greene HL and et al. Mortality and morbidity in patients receiving encainide, flecainide, or placebo. The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. *N Engl J Med* 1991; **324**(12): 781-788. 10.1056/nejm199103213241201
- Eckardt TDMBGHPKKKCSL. Kommentar zu den ESC-Leitlinien2015 „Ventrikuläre Arrhythmien und Prävention des plötzlichen Herztodes“. *Der Kardiologe* 2017; DOI 10.1007/s12181-016-0115-z
- Eisner D. Calcium in the heart: from physiology to disease. *Exp Physiol* 2014; **99**(10): 1273-1282. 10.1113/expphysiol.2013.077305
- Esseltine JL and Laird DW. Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends Cell Biol* 2016; **26**(12): 944-955. 10.1016/j.tcb.2016.06.003
- Ewart JL, Cohen MF, Meyer RA, Huang GY, Wessels A, Gourdie RG, Chin AJ, Park SM, Lazatin BO, Villabon S and Lo CW. Heart and neural tube defects in transgenic mice overexpressing the Cx43 gap junction gene. *Development* 1997; **124**(7): 1281-1292.
- Fang RH, Gao W and Zhang L. Targeting drugs to tumours using cell membrane-coated nanoparticles. *Nat Rev Clin Oncol* 2022; 10.1038/s41571-022-00699-x
- Fedorov VV, Glukhov AV, Ambrosi CM, KostECKI G, Chang R, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Nichols CG and Efimov IR. Effects of KATP channel openers diazoxide and pinacidil in coronary-perfused atria and ventricles from failing and non-failing human hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2011; **51**(2): 215-225. 10.1016/j.yjmcc.2011.04.016
- Fiedorowicz K, Wargocka-Matuszewska W, AmbroŹkiewicz KA, Rugowska A, Cheda Ł, Fiedorowicz M, Zimna A, Drabik M, Borkowski S, Świątkiewicz M, Bogorodzki P, Grieb P, Hamankiewicz P, Kolanowski TJ, Rozwadowska N, Kozłowska U, Klimczak A, Kolasiński J, Rogulski Z and Kurpisz M. Molecular Imaging of Human Skeletal Myoblasts (huSKM) in Mouse Post-Infarction Myocardium. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(19)10.3390/ijms221910885
- Filice D, Dhahri W, Solan JL, Lampe PD, Steele E, Milani N, Van Biber B, Zhu WZ, Valdman TS, Romagnuolo R, Otero-Cruz JD, Hauch KD, Kay MW, Sarvazyan N and Laflamme MA. Optical mapping of human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte graft electrical activity in injured hearts. *Stem Cell Res Ther* 2020; **11**(1): 417. 10.1186/s13287-020-01919-w
- Fishbein MC, Maclean D and Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978; **73**(6): 843-849. 10.1378/chest.73.6.843
- Francisco J, Zhang Y, Nakada Y, Jeong JI, Huang CY, Ivessa A, Oka S, Babu GJ and Del Re DP. AAV-mediated YAP expression in cardiac fibroblasts promotes inflammation and increases fibrosis. *Sci Rep* 2021; **11**(1): 10553. 10.1038/s41598-021-89989-5

- Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008; **58**(2): 88-111. 10.1016/j.phrs.2008.06.007
- Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat Rev Cardiol* 2014; **11**(5): 255-265. 10.1038/nrcardio.2014.28
- Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 2021; **117**(6): 1450-1488. 10.1093/cvr/cvaa324
- Fratila RM, Mitchell SG, del Pino P, Grazu V and de la Fuente JM. Strategies for the biofunctionalization of gold and iron oxide nanoparticles. *Langmuir* 2014; **30**(50): 15057-15071. 10.1021/la5015658
- Fry CH, Gray RP, Dhillon PS, Jabr RI, Dupont E, Patel PM and Peters NS. Architectural correlates of myocardial conduction: changes to the topography of cellular coupling, intracellular conductance, and action potential propagation with hypertrophy in Guinea-pig ventricular myocardium. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014; **7**(6): 1198-1204. 10.1161/circep.114.001471
- Fu X, Khalil H, Kanisicak O, Boyer JG, Vagnozzi RJ, Maliken BD, Sargent MA, Prasad V, Valiente-Alandi I, Blaxall BC and Molkentin JD. Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J Clin Invest* 2018; **128**(5): 2127-2143. 10.1172/jci98215
- Funken M, Bruegmann T and Sasse P. Selective optogenetic stimulation of fibroblasts enables quantification of hetero-cellular coupling to cardiomyocytes in a three-dimensional model of heart tissue. *Europace* 2020; **22**(10): 1590-1599. 10.1093/europace/euaa128
- Furtado MB, Costa MW, Pranoto EA, Salimova E, Pinto AR, Lam NT, Park A, Snider P, Chandran A, Harvey RP, Boyd R, Conway SJ, Pearson J, Kaye DM and Rosenthal NA. Cardiogenic genes expressed in cardiac fibroblasts contribute to heart development and repair. *Circ Res* 2014; **114**(9): 1422-1434. 10.1161/circresaha.114.302530
- Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Petretta MP, Ferro A, Larobina M, Panico M, Brunetti A and Cuocolo A. PET/CT imaging in mouse models of myocardial ischemia. *J Biomed Biotechnol* 2012; **2012**: 541872. 10.1155/2012/541872
- Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP and Rohr S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* 2003; **93**(5): 421-428. 10.1161/01.Res.0000089258.40661.0c
- Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N and Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res* 2010; **106**(5): 981-991. 10.1161/circresaha.109.204891
- Glukhov AV, Flagg TP, Fedorov VV, Efimov IR and Nichols CG. Differential K(ATP) channel pharmacology in intact mouse heart. *J Mol Cell Cardiol* 2010; **48**(1): 152-160. 10.1016/j.yjmcc.2009.08.026
- Gomes AV, Potter JD and Szczesna-Cordary D. The role of troponins in muscle contraction. *IUBMB Life* 2002; **54**(6): 323-333. 10.1080/15216540216037

Greener ID, Sasano T, Wan X, Igarashi T, Strom M, Rosenbaum DS and Donahue JK. Connexin43 gene transfer reduces ventricular tachycardia susceptibility after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; **60**(12): 1103-1110. 10.1016/j.jacc.2012.04.042

Hacein-Bey-Abina S, Pai SY, Gaspar HB, Armant M, Berry CC, Blanche S, Bleesing J, Blondeau J, de Boer H, Buckland KF, Caccavelli L, Cros G, De Oliveira S, Fernández KS, Guo D, Harris CE, Hopkins G, Lehmann LE, Lim A, London WB, van der Loo JC, Malani N, Male F, Malik P, Marinovic MA, McNicol AM, Moshous D, Neven B, Oleastro M, Picard C, Ritz J, Rivat C, Schambach A, Shaw KL, Sherman EA, Silberstein LE, Six E, Touzot F, Tsytsykova A, Xu-Bayford J, Baum C, Bushman FD, Fischer A, Kohn DB, Filipovich AH, Notarangelo LD, Cavazzana M, Williams DA and Thrasher AJ. A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2014; **371**(15): 1407-1417. 10.1056/NEJMoa1404588

Hahn A. [Physiological significance of iron]. *Pharm Unserer Zeit* 2009; **38**(3): 232-239. 10.1002/pauz.200800313

Hastie E and Samulski RJ. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success--a personal perspective. *Hum Gene Ther* 2015; **26**(5): 257-265. 10.1089/hum.2015.025

He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA and Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003; **93**(1): 32-39. 10.1161/01.Res.0000080317.92718.99

Henkel DG and Henkel DB (2006). *Painted treasures, or, The original 288 tree gnomes*. Trenton, Mich., Quillpen.

Heun Y, Hildebrand S, Heidsieck A, Gleich B, Anton M, Pircher J, Ribeiro A, Mykhaylyk O, Eberbeck D, Wenzel D, Pfeifer A, Woernle M, Krötz F, Pohl U and Mannell H. Targeting of Magnetic Nanoparticle-coated Microbubbles to the Vascular Wall Empowers Site-specific Lentiviral Gene Delivery in vivo. *Theranostics* 2017; **7**(2): 295-307. 10.7150/thno.16192

Hochman JS and Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982; **65**(7): 1446-1450. 10.1161/01.cir.65.7.1446

Hofmann A, Wenzel D, Becher UM, Freitag DF, Klein AM, Eberbeck D, Schulte M, Zimmermann K, Bergemann C, Gleich B, Roell W, Weyh T, Trahms L, Nickenig G, Fleischmann BK and Pfeifer A. Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(1): 44-49. 10.1073/pnas.0803746106

Hortells L, Johansen AKZ and Yutzey KE. Cardiac Fibroblasts and the Extracellular Matrix in Regenerative and Nonregenerative Hearts. *J Cardiovasc Dev Dis* 2019; **6**(3)10.3390/jcdd6030029

Hou L, Hu B and Jalife J. Genetically engineered excitable cardiac myofibroblasts coupled to cardiomyocytes rescue normal propagation and reduce arrhythmia complexity in heterocellular monolayers. *PLoS One* 2013; **8**(2): e55400. 10.1371/journal.pone.0055400

Hu C, Busuttill RW and Lipshutz GS. RH10 provides superior transgene expression in mice when compared with natural AAV serotypes for neonatal gene therapy. *J Gene Med* 2010; **12**(9): 766-778. 10.1002/jgm.1496

Institut RK. Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. 2006;

Issa B, Obaidat IM, Albiss BA and Haik Y. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int J Mol Sci* 2013; **14**(11): 21266-21305. 10.3390/ijms141121266

Ivey MJ and Tallquist MD. Defining the Cardiac Fibroblast. *Circ J* 2016; **80**(11): 2269-2276. 10.1253/circj.CJ-16-1003

Jansen JA, Noorman M, Musa H, Stein M, de Jong S, van der Nagel R, Hund TJ, Mohler PJ, Vos MA, van Veen TA, de Bakker JM, Delmar M and van Rijen HV. Reduced heterogeneous expression of Cx43 results in decreased Nav1.5 expression and reduced sodium current that accounts for arrhythmia vulnerability in conditional Cx43 knockout mice. *Heart Rhythm* 2012; **9**(4): 600-607. 10.1016/j.hrthm.2011.11.025

Kajioka S, Takahashi-Yanaga F, Shahab N, Onimaru M, Matsuda M, Takahashi R, Asano H, Morita H, Morimoto S, Yonemitsu Y, Hayashi M, Seki N, Sasaguri T, Hirata M, Nakayama S and Naito S. Endogenous cardiac troponin T modulates Ca(2+)-mediated smooth muscle contraction. *Sci Rep* 2012; **2**: 979. 10.1038/srep00979

Kanisicak O, Khalil H, Ivey MJ, Karch J, Maliken BD, Correll RN, Brody MJ, SC JL, Aronow BJ, Tallquist MD and Molckentin JD. Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat Commun* 2016; **7**: 12260. 10.1038/ncomms12260

Kardiologie.org. (2020). "Neue Herzinfarkt-Definition in der Alltagsroutine – darum hilft sie." from <https://www.kardiologie.org/leitlinien/akutes-koronarsyndrom/neue-herzinfarkt-definition-in-der-alltagsroutine---darum-hilft-/17746044>.

Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming DJ, Langholm LL, Nielsen MJ, Manon-Jensen T, Siebuhr A, Gudmann NS, Rønnow S, Sand JM, Daniels SJ, Mortensen JH and Schuppan D. The good and the bad collagens of fibrosis - Their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; **121**: 43-56. 10.1016/j.addr.2017.07.014

Katen LJ, Januszkeski MM, Anderson WF, Hasenkrug KJ and Evans LH. Infectious entry by amphotropic as well as ecotropic murine leukemia viruses occurs through an endocytic pathway. *J Virol* 2001; **75**(11): 5018-5026. 10.1128/jvi.75.11.5018-5026.2001

Katz RA and Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; **63**: 133-173. 10.1146/annurev.bi.63.070194.001025

Ke J, Zhu C, Zhang Y and Zhang W. Anti-Arrhythmic Effects of Linalool via Cx43 Expression in a Rat Model of Myocardial Infarction. *Front Pharmacol* 2020; **11**: 926. 10.3389/fphar.2020.00926

Kim SH, Kim S and Robbins PD. Retroviral vectors. *Adv Virus Res* 2000; **55**: 545-563. 10.1016/s0065-3527(00)55017-9

Kohl P. Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circ Res* 2003; **93**(5): 381-383. 10.1161/01.Res.0000091364.90121.0c

- Kohl P and Gourdie RG. Fibroblast-myocyte electrotonic coupling: does it occur in native cardiac tissue? *J Mol Cell Cardiol* 2014; **70**(100): 37-46. 10.1016/j.yjmcc.2013.12.024
- Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, Jensen TM, Toft E and Berning J. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; **80**(4): 449-453. 10.1016/s0002-9149(97)00393-7
- Kung GL, Vaseghi M, Gahm JK, Shevtsov J, Garfinkel A, Shivkumar K and Ennis DB. Microstructural Infarct Border Zone Remodeling in the Post-infarct Swine Heart Measured by Diffusion Tensor MRI. *Front Physiol* 2018; **9**: 826. 10.3389/fphys.2018.00826
- Kuzma-Kuzniarska M, Yapp C and Hulley PA. Using Fluorescence Recovery After Photobleaching to Study Gap Junctional Communication In Vitro. *Methods Mol Biol* 2016; **1437**: 171-179. 10.1007/978-1-4939-3664-9_12
- Landry NM, Rattan SG and Dixon IMC. An Improved Method of Maintaining Primary Murine Cardiac Fibroblasts in Two-Dimensional Cell Culture. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 12889. 10.1038/s41598-019-49285-9
- Lattanzi W, Parrilla C, Fetoni A, Logroscino G, Straface G, Pecorini G, Stigliano E, Tampieri A, Bedini R, Pecci R, Michetti F, Gambotto A, Robbins PD and Pola E. Ex vivo-transduced autologous skin fibroblasts expressing human Lim mineralization protein-3 efficiently form new bone in animal models. *Gene Ther* 2008; **15**(19): 1330-1343. 10.1038/gt.2008.116
- Lee P, Quintanilla JG, Alfonso-Almazán JM, Galán-Arriola C, Yan P, Sánchez-González J, Pérez-Castellano N, Pérez-Villacastín J, Ibañez B, Loew LM and Filgueiras-Rama D. In vivo ratiometric optical mapping enables high-resolution cardiac electrophysiology in pig models. *Cardiovasc Res* 2019; **115**(11): 1659-1671. 10.1093/cvr/cvz039
- Lim M, Wang W, Liang L, Han ZB, Li Z, Geng J, Zhao M, Jia H, Feng J, Wei Z, Song B, Zhang J, Li J, Liu T, Wang F, Li T, Li J, Fang Y, Gao J and Han Z. Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther* 2018; **9**(1): 129. 10.1186/s13287-018-0888-z
- Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Jr., Du XJ, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SP, Kloner RA, Lefer DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Schwartz Longacre L, Ripplinger CM, Van Eyk JE and Heusch G. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; **314**(4): H812-h838. 10.1152/ajpheart.00335.2017
- Lindsey ML, Kassiri Z, Virag JAI, de Castro Brás LE and Scherrer-Crosbie M. Guidelines for measuring cardiac physiology in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; **314**(4): H733-h752. 10.1152/ajpheart.00339.2017
- Lubkemeier I, Requardt RP, Lin X, Sasse P, Andrie R, Schrickel JW, Chkourko H, Bukauskas FF, Kim JS, Frank M, Malan D, Zhang J, Wirth A, Dobrowolski R, Mohler PJ, Offermanns S, Fleischmann BK, Delmar M and Willecke K. Deletion of the last five C-terminal amino acid residues of connexin43 leads to lethal ventricular arrhythmias in mice without affecting coupling via gap junction channels. *Basic Res Cardiol* 2013; **108**(3): 348. 10.1007/s00395-013-0348-y

- Lukashev AN and Zamyatnin AA, Jr. Viral Vectors for Gene Therapy: Current State and Clinical Perspectives. *Biochemistry (Mosc)* 2016; **81**(7): 700-708. 10.1134/s0006297916070063
- Ma Y, Iyer RP, Jung M, Czubryt MP and Lindsey ML. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci* 2017; **38**(5): 448-458. 10.1016/j.tips.2017.03.001
- MacKenna D, Summerour SR and Villarreal FJ. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res* 2000; **46**(2): 257-263. 10.1016/s0008-6363(00)00030-4
- Maguire CT, Wakimoto H, Patel VV, Hammer PE, Gauvreau K and Berul CI. Implications of ventricular arrhythmia vulnerability during murine electrophysiology studies. *Physiol Genomics* 2003; **15**(1): 84-91. 10.1152/physiolgenomics.00034.2003
- Mah C, Pacak CA, Cresawn KO, Deruisseau LR, Germain S, Lewis MA, Cloutier DA, Fuller DD and Byrne BJ. Physiological correction of Pompe disease by systemic delivery of adeno-associated virus serotype 1 vectors. *Mol Ther* 2007; **15**(3): 501-507. 10.1038/sj.mt.6300100
- Maier P, von Kalle C and Laufs S. Retroviral vectors for gene therapy. *Future Microbiol* 2010; **5**(10): 1507-1523. 10.2217/fmb.10.100
- Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA and Kay MA. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; **12**(3): 342-347. 10.1038/nm1358
- Martin C, Schulz R, Rose J and Heusch G. Inorganic phosphate content and free energy change of ATP hydrolysis in regional short-term hibernating myocardium. *Cardiovasc Res* 1998; **39**(2): 318-326. 10.1016/s0008-6363(98)00086-8
- Mathiasen AB, Hansen L, Friis T, Thomsen C, Bhakoo K and Kastrup J. Optimal labeling dose, labeling time, and magnetic resonance imaging detection limits of ultrasmall superparamagnetic iron-oxide nanoparticle labeled mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Int* 2013; **2013**: 353105. 10.1155/2013/353105
- Mendonca Costa C, Plank G, Rinaldi CA, Niederer SA and Bishop MJ. Modeling the Electrophysiological Properties of the Infarct Border Zone. *Front Physiol* 2018; **9**: 356. 10.3389/fphys.2018.00356
- Molkentin JD, Bugg D, Ghearing N, Dorn LE, Kim P, Sargent MA, Gunaje J, Otsu K and Davis J. Fibroblast-Specific Genetic Manipulation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase In Vivo Reveals Its Central Regulatory Role in Fibrosis. *Circulation* 2017; **136**(6): 549-561. 10.1161/circulationaha.116.026238
- Morikawa Y, Zhang WH, Hockley DJ, Nermut MV and Jones IM. Detection of a trimeric human immunodeficiency virus type 1 Gag intermediate is dependent on sequences in the matrix protein, p17. *J Virol* 1998; **72**(9): 7659-7663. 10.1128/jvi.72.9.7659-7663.1998

- Moros M, Pelaz B, López-Larrubia P, García-Martin ML, Grazú V and de la Fuente JM. Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* 2010; **2**(9): 1746-1755. 10.1039/c0nr00104j
- Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, Higgins SL, Brown MW and Andrews ML. Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med* 2002; **346**(12): 877-883. 10.1056/NEJMoa013474
- Mureli S, Gans CP, Bare DJ, Geenen DL, Kumar NM and Banach K. Mesenchymal stem cells improve cardiac conduction by upregulation of connexin 43 through paracrine signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; **304**(4): H600-609. 10.1152/ajpheart.00533.2012
- Muruve DA. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther* 2004; **15**(12): 1157-1166. 10.1089/hum.2004.15.1157
- Nagaraju CK, Dries E, Gilbert G, Abdesselem M, Wang N, Amoni M, Driesen RB and Sipido KR. Myofibroblast modulation of cardiac myocyte structure and function. *Sci Rep* 2019; **9**(1): 8879. 10.1038/s41598-019-45078-2
- Nahrendorf M, Hu K, Fraccarollo D, Hiller KH, Haase A, Bauer WR and Ertl G. Time course of right ventricular remodeling in rats with experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; **284**(1): H241-248. 10.1152/ajpheart.00537.2002
- Niemann P, Schiffer M, Malan D, Grünberg S, Roell W, Geisen C and Fleischmann BK. Generation and Characterization of an Inducible Cx43 Overexpression System in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cells* 2022; **11**(4)10.3390/cells11040694
- Nisbet AM, Camelliti P, Walker NL, Burton FL, Cobbe SM, Kohl P and Smith GL. Prolongation of atrio-ventricular node conduction in a rabbit model of ischaemic cardiomyopathy: Role of fibrosis and connexin remodelling. *J Mol Cell Cardiol* 2016; **94**: 54-64. 10.1016/j.yjmcc.2016.03.011
- Ottersbach A, Mykhalyyk O, Heidsieck A, Eberbeck D, Rieck S, Zimmermann K, Breitbach M, Engelbrecht B, Brüggemann T, Hesse M, Welz A, Sasse P, Wenzel D, Plank C, Gleich B, Hölzel M, Bloch W, Pfeifer A, Fleischmann BK and Roell W. Improved heart repair upon myocardial infarction: Combination of magnetic nanoparticles and tailored magnets strongly increases engraftment of myocytes. *Biomaterials* 2018; **155**: 176-190. 10.1016/j.biomaterials.2017.11.012
- Pan X, Chen Z, Huang R, Yao Y and Ma G. Transforming growth factor β 1 induces the expression of collagen type I by DNA methylation in cardiac fibroblasts. *PLoS One* 2013; **8**(4): e60335. 10.1371/journal.pone.0060335
- Parashurama N, Ahn BC, Ziv K, Ito K, Paulmurugan R, Willmann JK, Chung J, Ikeno F, Swanson JC, Merk DR, Lyons JK, Yerushalmi D, Teramoto T, Kosuge H, Dao CN, Ray P, Patel M, Chang YF, Mahmoudi M, Cohen JE, Goldstone AB, Habte F, Bhaumik S, Yaghoubi S, Robbins RC, Dash R, Yang PC, Brinton TJ, Yock PG, McConnell MV and Gambhir SS. Multimodality Molecular Imaging of Cardiac Cell Transplantation: Part II. In Vivo Imaging of Bone Marrow Stromal Cells in Swine with PET/CT and MR Imaging. *Radiology* 2016; **280**(3): 826-836. 10.1148/radiol.2016151150

Pop T, Erbel R, Treese N, von Olshausen K and Meyer J (1987). Manifestation und Therapie von Reperfusionsarrhythmien bei der Thrombolyse des akuten Myokardinfarktes, Heidelberg, Steinkopff.

Prabhu SD and Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 2016; **119**(1): 91-112. 10.1161/circresaha.116.303577

Priori SG, Blomström-Lundqvist C, Mazzanti A, Blom N, Borggrefe M, Camm J, Elliott PM, Fitzsimons D, Hatala R, Hindricks G, Kirchhof P, Kjeldsen K, Kuck KH, Hernandez-Madrid A, Nikolaou N, Norekvål TM, Spaulding C and Van Veldhuisen DJ. 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). *Eur Heart J* 2015; **36**(41): 2793-2867. 10.1093/eurheartj/ehv316

Quinn TA, Camelliti P, Rog-Zielinska EA, Siedlecka U, Poggioli T, O'Toole ET, Knopfel T and Kohl P. Electrotonic coupling of excitable and nonexcitable cells in the heart revealed by optogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; **113**(51): 14852-14857. 10.1073/pnas.1611184114

Ramanujam D, Sassi Y, Lagerbauer B and Engelhardt S. Viral Vector-Based Targeting of miR-21 in Cardiac Nonmyocyte Cells Reduces Pathologic Remodeling of the Heart. *Mol Ther* 2016; **24**(11): 1939-1948. 10.1038/mt.2016.166

Razi Soofiyan S, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T and Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull* 2013; **3**(2): 249-255. 10.5681/apb.2013.041

Rejali D, Lee VA, Abrashkin KA, Humayun N, Swiderski DL and Raphael Y. Cochlear implants and ex vivo BDNF gene therapy protect spiral ganglion neurons. *Hear Res* 2007; **228**(1-2): 180-187. 10.1016/j.heares.2007.02.010

Ribeiro-Rodrigues TM, Martins-Marques T, Morel S, Kwak BR and Girão H. Role of connexin 43 in different forms of intercellular communication - gap junctions, extracellular vesicles and tunnelling nanotubes. *J Cell Sci* 2017; **130**(21): 3619-3630. 10.1242/jcs.200667

Roell W, Klein AM, Breitbach M, Becker TS, Parikh A, Lee J, Zimmermann K, Reining S, Gabris B, Ottersbach A, Doran R, Engelbrecht B, Schiffer M, Kimura K, Freitag P, Carls E, Geisen C, Duerr GD, Sasse P, Welz A, Pfeifer A, Salama G, Kotlikoff M and Fleischmann BK. Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 7145. 10.1038/s41598-018-25147-8

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, Doran R, Becher UM, Hwang SM, Bostani T, von Maltzahn J, Hofmann A, Reining S, Eiberger B, Gabris B, Pfeifer A, Welz A, Willecke K, Salama G, Schrickel JW, Kotlikoff MI and Fleischmann BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007; **450**(7171): 819-824. 10.1038/nature06321

Rose JA, Hoggan MD and Shatkin AJ. Nucleic acid from an adeno-associated virus: chemical and physical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; **56**(1): 86-92. 10.1073/pnas.56.1.86

Rubart M, Tao W, Lu XL, Conway SJ, Reuter SP, Lin SF and Soonpaa MH. Electrical coupling between ventricular myocytes and myofibroblasts in the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 2018; **114**(3): 389-400. 10.1093/cvr/cvx163

Santiago JJ, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, Bedosky KM, Freed DH, Kardami E and Dixon IM. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev Dyn* 2010; **239**(6): 1573-1584. 10.1002/dvdy.22280

Sasse P, Malan D, Fleischmann M, Roell W, Gustafsson E, Bostani T, Fan Y, Kolbe T, Breitbach M, Addicks K, Welz A, Brem G, Hescheler J, Aszodi A, Costell M, Bloch W and Fleischmann BK. Perlecan is critical for heart stability. *Cardiovasc Res* 2008; **80**(3): 435-444. 10.1093/cvr/cvn225

Schmidt L, Thews (2004). *Physiologie des Menschen*.

Schultz F, Swiatlowska P, Alvarez-Laviada A, Sanchez-Alonso JL, Song Q, de Vries AAF, Pijnappels DA, Ongstad E, Braga VMM, Entcheva E, Gourdie RG, Miragoli M and Gorelik J. Cardiomyocyte-myofibroblast contact dynamism is modulated by connexin-43. *Faseb j* 2019; **33**(9): 10453-10468. 10.1096/fj.201802740RR

Sesselberg HW, Moss AJ, McNitt S, Zareba W, Daubert JP, Andrews ML, Hall WJ, McClintic B, Huang DT and Group M-IR. Ventricular arrhythmia storms in postinfarction patients with implantable defibrillators for primary prevention indications: a MADIT-II substudy. *Heart Rhythm* 2007; **4**(11): 1395-1402. 10.1016/j.hrthm.2007.07.013

Shaner NC, Steinbach PA and Tsien RY. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005; **2**(12): 905-909. 10.1038/nmeth819

Shiba Y, Filice D, Fernandes S, Minami E, Dupras SK, Biber BV, Trinh P, Hirota Y, Gold JD, Viswanathan M and Laflamme MA. Electrical Integration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in a Guinea Pig Chronic Infarct Model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2014; **19**(4): 368-381. 10.1177/1074248413520344

Solan JL and Lampe PD. Src Regulation of Cx43 Phosphorylation and Gap Junction Turnover. *Biomolecules* 2020; **10**(12)10.3390/biom10121596

Song HF, He S, Li SH, Wu J, Yin W, Shao Z, Du GQ, Wu J, Li J, Weisel RD, Verma S, Xie J and Li RK. Knock-out of MicroRNA 145 impairs cardiac fibroblast function and wound healing post-myocardial infarction. *J Cell Mol Med* 2020; **24**(16): 9409-9419. 10.1111/jcmm.15597

Speckmann H, Köhling (2013). *Physiologie*.

Stepien G, Moros M, Pérez-Hernández M, Monge M, Gutiérrez L, Fratila RM, Las Heras M, Menao Guillén S, Puente Lanzarote JJ, Solans C, Pardo J and de la Fuente JM. Effect of Surface Chemistry and Associated Protein Corona on the Long-Term Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles In Vivo. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018; **10**(5): 4548-4560. 10.1021/acsami.7b18648

- Stigliano RV, Shubitidze F, Petryk AA, Tate JA and Hoopes PJ. Magnetic nanoparticle hyperthermia: Predictive model for temperature distribution. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng* 2013; **8584**: 858410. 10.1117/12.2007673
- Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Brand NJ, Barton PJ, Varela-Carver A, Fukushima S, Copen SR, Partridge TA and Yacoub MH. Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation* 2004; **110**(11 Suppl 1): li219-224. 10.1161/01.Cir.0000138388.55416.06
- Tallquist MD and Molkentin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol* 2017; **14**(8): 484-491. 10.1038/nrcardio.2017.57
- Tang Z, Yang L, Xue R, Zhang J, Wang Y, Chen PC and Sung KL. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in anterior cruciate ligament and medial collateral ligament fibroblasts after a mechanical injury: involvement of the p65 subunit of NF-kappaB. *Wound Repair Regen* 2009; **17**(5): 709-716. 10.1111/j.1524-475X.2009.00529.x
- Tarbit E, Singh I, Peart JN and Rose'Meyer RB. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev* 2019; **24**(1): 1-15. 10.1007/s10741-018-9720-1
- Thale J, Gülker H, Haverkamp W, Hindricks G and Bender F (1987). *Pharmakologische Beeinflussung von Reperfusionsarrhythmien*, Heidelberg, Steinkopff.
- Todaro GJ and Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 1963; **17**(2): 299-313. 10.1083/jcb.17.2.299
- Tribulova N, Szeiffova Bacova B, Benova T and Viczenczova C. Can we protect from malignant arrhythmias by modulation of cardiac cell-to-cell coupling? *J Electrocardiol* 2015; **48**(3): 434-440. 10.1016/j.jelectrocard.2015.02.006
- Trueck C, Zimmermann K, Mykhaylyk O, Anton M, Vosen S, Wenzel D, Fleischmann BK and Pfeifer A. Optimization of magnetic nanoparticle-assisted lentiviral gene transfer. *Pharm Res* 2012; **29**(5): 1255-1269. 10.1007/s11095-011-0660-x
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 509-544. 10.1146/annurev.biochem.67.1.509
- Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, Khalil H, Johansen AKZ, Schwanekamp JA, York AJ, Huang V, Nahrendorf M, Sadayappan S and Molkentin JD. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature* 2020; **577**(7790): 405-409. 10.1038/s41586-019-1802-2
- van Laake LW, van Donselaar EG, Monshouwer-Kloots J, Schreurs C, Passier R, Humbel BM, Doevendans PA, Sonnenberg A, Verkleij AJ and Mummery CL. Extracellular matrix formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**(2): 277-290. 10.1007/s00018-009-0179-z
- van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T and de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* 2004; **109**(8): 1048-1055. 10.1161/01.cir.0000117402.70689.75

- Vogt VM and Simon MN. Mass determination of rous sarcoma virus virions by scanning transmission electron microscopy. *J Virol* 1999; **73**(8): 7050-7055. 10.1128/jvi.73.8.7050-7055.1999
- Vosen S, Rieck S, Heidsieck A, Mykhaylyk O, Zimmermann K, Plank C, Gleich B, Pfeifer A, Fleischmann BK and Wenzel D. Improvement of vascular function by magnetic nanoparticle-assisted circumferential gene transfer into the native endothelium. *J Control Release* 2016; **241**: 164-173. 10.1016/j.jconrel.2016.09.024
- W Schaper JS. *Der experimentelle Infarkt*. Springer 1979;
- Wan E, Yeap XY, Dehn S, Terry R, Novak M, Zhang S, Iwata S, Han X, Homma S, Drosatos K, Lomasney J, Engman DM, Miller SD, Vaughan DE, Morrow JP, Kishore R and Thorp EB. Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ Res* 2013; **113**(8): 1004-1012. 10.1161/circresaha.113.301198
- Wang B, Ma X, Zhao L, Zhou X, Ma Y, Sun H, Yang Y and Chen B. Injection of basic fibroblast growth factor together with adipose-derived stem cell transplantation: improved cardiac remodeling and function in myocardial infarction. *Clin Exp Med* 2016; **16**(4): 539-550. 10.1007/s10238-015-0383-0
- Watanabe S and Temin HM. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 5' long terminal repeat and the start of the gag gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; **79**(19): 5986-5990. 10.1073/pnas.79.19.5986
- Watkins PB. Liver Injury Due to Drugs and Viruses: Mechanistic Similarities and Implications for AAV Gene Therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2022; **112**(4): 751-753. 10.1002/cpt.2500
- Wenzel D, Rieck S, Vosen S, Mykhaylyk O, Trueck C, Eberbeck D, Trahms L, Zimmermann K, Pfeifer A and Fleischmann BK. Identification of magnetic nanoparticles for combined positioning and lentiviral transduction of endothelial cells. *Pharm Res* 2012; **29**(5): 1242-1254. 10.1007/s11095-011-0657-5
- Wessels A and Sedmera D. Developmental anatomy of the heart: a tale of mice and man. *Physiol Genomics* 2003; **15**(3): 165-176. 10.1152/physiolgenomics.00033.2003
- Wold WS and Toth K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 2013; **13**(6): 421-433. 10.2174/1566523213666131125095046
- Wu R, Ma F, Tosevska A, Farrell C, Pellegrini M and Deb A. Cardiac fibroblast proliferation rates and collagen expression mature early and are unaltered with advancing age. *JCI Insight* 2020; **5**(24)10.1172/jci.insight.140628
- Yankelson L, Feld Y, Bressler-Stramer T, Itzhaki I, Huber I, Gepstein A, Aronson D, Marom S and Gepstein L. Cell therapy for modification of the myocardial electrophysiological substrate. *Circulation* 2008; **117**(6): 720-731. 10.1161/circulationaha.106.671776
- Yu SF, von Rüden T, Kantoff PW, Garber C, Seiberg M, Rüther U, Anderson WF, Wagner EF and Gilboa E. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; **83**(10): 3194-3198. 10.1073/pnas.83.10.3194

Zhang H, Zhan Q, Huang B, Wang Y and Wang X. AAV-mediated gene therapy: Advancing cardiovascular disease treatment. *Front Cardiovasc Med* 2022; **9**: 952755. [10.3389/fcvm.2022.952755](https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.952755)

Zhang Y, Kanter EM and Yamada KA. Remodeling of cardiac fibroblasts following myocardial infarction results in increased gap junction intercellular communication. *Cardiovasc Pathol* 2010; **19**(6): e233-240. [10.1016/j.carpath.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.carpath.2009.12.002)

10 Anhang

10.1 Publikationsliste

Schiffer M, Wagner K, Carls E, de la Fuente JM, Hildebrandt S, Duerr GD, Pfeifer A, Eberbeck D, Geisen C, Fleischmann BK, Röhl W. *Grafting of Cx43 expressing fibroblasts protects from post-infarct arrhythmia*. Manuskript in Vorbereitung.

Niemann P, **Schiffer M**, Malan D, Grünberg S, Röhl W, Geisen C, Fleischmann BK. *Generation and characterisation of an inducible Cx43 overexpression system in pluripotent mouse cells*. *Cells* 2022. **11**(4).

Roell W, Klein AM, Breitbach M, Becker TS, Parikh A, Lee J, Zimmermann K, Reining S, Gabris B, Ottersbach A, Doran R, Engelbrecht B, **Schiffer M**, Kimura K, Freitag P, Carls E, Geisen C, Duerr GD, Sasse P, Welz A, Pfeifer A, Salama G, Kotlikoff M, Fleischmann BK. *Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling*. *Scientific Reports* 2018. **8**(1): p. 7145.

10.2 Vorträge und Posterbeiträge auf Konferenzen

Magnet-assisted transplantation of nanoparticle-loaded Connexin43 overexpressing cardiac fibroblasts prevents ventricular tachycardia following myocardial infarction, Vortrag im Rahmen der Europhysiologischen Tagung in Kopenhagen (Dänemark) 09/22.

Long-term reduction of post-infarct ventricular tachycardia by transplantation of Connexin43 overexpressing cardiac fibroblasts, Vortrag im Rahmen der 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie als Onlineveranstaltung 02/21.

Grafting of Connexin43 (Cx43) overexpressing fibroblasts protects from post-infarct arrhythmia, Vortrag im Rahmen der 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Wiesbaden 03/20.

P14: Modulation of Cx43 expression and targeting of the myocardial scar: Impact on cell fate, scar formation, and electrical vulnerability post-myocardial infarction, Poster im Rahmen der finalen Begutachtung der DFG des Sonderforschungsbereiches 1425 in Freiburg 02/20.

Transplantation of Cx43 expressing fibroblasts: An option for post-infarct arrhythmia prevention? Vortrag im Rahmen der 98. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Ulm 10/19.

Transplantation of Cx43 expressing fibroblasts: An option for post-infarct arrhythmia prevention? Vortrag im Rahmen der 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Wiesbaden 02/19.

Magnetic Nanoparticles: Assisted local lentiviral transduction of fibroblasts in vitro, Poster im Rahmen der „2nd International Conference and Exhibition on Nanomedicine and Drug Delivery“ in Tokyo (Japan) 05/18.

10.3 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Prof. W. Röhl und Herrn Prof. B. K. Fleischmann, für die umfassende Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit meine Dissertation an der Herzchirurgischen Klinik, sowie am Institut für Physiologie I anzufertigen. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. W. Bloch und Herrn Prof. A. Pfeifer, dass sie sich bereit erklärt haben, meinem Dissertationskomitee beizutreten.

Ich bedanke mich außerdem bei allen meinen Kooperationspartnern: Herrn Prof. A. Pfeifer und Herrn Dr. Staffan Hildebrandt für die Bereitstellung der lentiviralen Vektoren. Herrn Prof. S. Engelhardt und Herrn Dr. D. Ramanujam für das Design und die Bereitstellung der MMLV Vektoren. In Bezug auf die neuen MMLV Vektoren, bedanke ich mich ebenfalls bei Frau Dr. C. Geisen und Frau P. Niemann, für die Klonierung des Viruskonstruktes. Bei Herrn Prof. JM de la Fuente und Frau Dr. R. Fratila, bedanke ich mich für die Herstellung der Tamra-MNP, sowie bei Frau Dr. O. Mykhaylyk für Herstellung der SoMag5-MNP. Ich bin sehr dankbar, dass die Toxizitätsstudien vorab von K. Wagner durchgeführt wurden, auf dessen Arbeit ich meine aufbauen konnte. Ein besonderer Dank gilt Esther Carls, für die wahnsinnig tolle Unterstützung bei den *in vivo* Versuchen. Esther und ich waren ein eingespieltes Team bei den Transplantationen und Katheter-Untersuchungen, sodass jeder Handgriff saß. Bei der RNA Seq Analyse bin ich dankbar für die Hilfe von PD Dr. M. Hesse und Frau P. Freitag.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kolleg*innen und ehemaligen Kollege*innen der Herzchirurgie und des Instituts für Physiologie I, für die Unterstützung und die tolle Zeit bedanken. Mir hat jede Mittagspause sehr viel Spaß gemacht und ich habe sehr viel gelacht.

Der größte Dank gilt meiner Familie für die Unterstützung während dieser Zeit. Ihr habt mich immer abgelenkt und mich durch z.B. unsere Spieleabende oder Urlaube, auf andere Gedanken gebracht. Danke auch für die Begleitung auf die Konferenz nach Tokyo 2018, Mama. Das wohl größte Vorbild war mein Vater. Durch seine Promotion bin ich erst auf den Gedanken gekommen, nach meiner Berufsausbildung ein Studium bzw. eine Promotion anzuschließen. Ich denke an dich, Papa.