

**Lokaler Gentransfer und Zellpositionierung mittels
magnetischer Nanopartikel für die Generierung
optogenetischer und biologischer Herzschrittmacher**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Carsten Kilgus
aus
Dresden

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Erstgutachter: Prof. Dr. B. K. Fleischmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. D. Fürst

Tag der Promotion: 30.09.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2009 bis Oktober 2013 am Institut für Physiologie I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann erstellt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kilgus, C.*, Heidsieck, A.*, Ottersbach, A., Roell, W., Trueck, C., Fleischmann, B.K., Gleich, B., Sasse, P., 2012. Local Gene Targeting and Cell Positioning Using Magnetic Nanoparticles and Magnetic Tips: Comparison of Mathematical Simulations with Experiments. *Pharmaceutical research* 1–12.

* Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Veröffentlichung beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Herz und seine elektrophysiologischen Eigenschaften.....	1
1.1.1	Der Sinusknoten als Zentrum der Erregungsbildung	1
1.1.1.1	Der Sinusknoten und seine Rolle für die Automatie des Herzens	1
1.1.1.2	Elektrophysiologische Grundlagen der Sinusknotenzellen	2
1.1.1.3	Struktur des Sinusknotens	5
1.1.2	Das Arbeitsmyokard und seine elektrophysiologischen Grundlagen.....	5
1.2	Fehlfunktion des Sinusknotens und Therapieansätze.....	6
1.2.1	Fehlfunktion der Sinuserregung /-weiterleitung.....	6
1.2.2	Aktueller Einsatz von elektrischen Herzschrittmachern	7
1.2.3	Generierung biologischer Schrittmacher	8
1.2.4	Optogenetik im kardiovaskulären Bereich: ein optischer Schrittmacher.....	10
1.3	Magnetische Nanopartikel (MNP)	11
1.3.1	Physikalische Eigenschaften und Aufbau magnetischer Nanopartikel	12
1.3.2	Aktuelle biomedizinische Anwendungen von MNPs	13
1.3.3	Geneherapie mittels Magnetofektion.....	14
1.3.4	Zellmarkierung mittels magnetischer Nanopartikel	15
2	ZIELE DER ARBEIT	16
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Verwendete Materialien	18
3.1.1	Geräte.....	18
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	20
3.1.3	Chemikalien und Substanzen.....	21
3.1.3.1	Chemikalien / Substanzen für die Molekularbiologie	21
3.1.3.2	Chemikalien / Substanzen für die Zellkultur	22
3.1.3.3	Chemikalien / Substanzen für die Elektrophysiologie	23
3.1.3.4	Chemikalien / Substanzen für die Histologie.....	23
3.1.4	Lösungen und Puffer	23
3.1.4.1	Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie	23
3.1.4.2	Lösungen und Puffer für die Zellkultur / Histologie	24
3.1.4.3	Lösungen und Puffer für die Elektrophysiologie.....	24
3.1.5	Zellkulturmedien und Zusätze	25
3.1.5.1	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	25
3.1.5.2	Zellkulturzusätze und Lösungen.....	26

3.2	Eukaryotische Zelllinien	27
3.3	Bakterienstämme	27
3.4	Lentivirale Vektoren	27
3.5	Magnetische Nanopartikel	28
3.6	Verwendete Programme	30
3.7	Molekularbiologische Methoden	30
3.7.1	Gelelektrophorese (DNA-Agarose Gelelektrophorese)	30
3.7.2	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	31
3.7.3	Restriktion von Nukleinsäuren.....	31
3.7.4	Klenow-Auffüllung.....	32
3.7.5	Dephosphorylierung von DNA	32
3.7.6	Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.7.7	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen	34
3.7.8	Langzeitlagerung von Bakterienkulturen	34
3.7.9	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	35
3.7.10	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	35
3.7.11	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	35
3.7.12	DNA-Aufreinigung.....	36
3.8	Zellbiologische Methoden	36
3.8.1	Kultivierung von HL-1 Kardiomyozyten	37
3.8.2	Kryokonservierung: Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
3.8.3	Kultivierung von ES-Zell-abgeleiteten und aufgereinigten Kardiomyozyten	38
3.8.4	Generierung einer ChR2 exprimierenden HL-1 Zelllinie	38
3.8.5	Präparation embryonaler (primärer) Kardiomyozyten der Maus	38
3.8.6	Hemmung der Zellproliferation	39
3.8.7	Lokale lentivirale Transduktion von HL-1 Zellen mittels MNPs	39
3.8.8	Magnetisierung von Zellen mit MNPs.....	40
3.8.9	Lokale Positionierung von MNP-markierten Kardiomyozyten	41
3.9	Elektrophysiologische Methoden	42
3.9.1	Fluoreszenzbasierte Kalzium-Messung (<i>Ca²⁺-Imaging</i>).....	42
3.9.2	Messungen des I _r -Stroms mittels Patch-Clamp Technik.....	43
3.9.3	Mikroelektrodenarray (MEA).....	44
3.9.4	Analyse der Schrittmacheraktivität aus Langzeit MEA-Daten.....	45
3.9.5	<i>In vitro</i> Lichtstimulation von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten.....	46
3.10	Immunohistologische Methoden	46
3.10.1	Zellfixierung mit Paraformaldehyd.....	46

3.10.2 Zellkernfärbung mit Höchst	46
3.10.3 Immunohistochemische Färbungen	47
3.10.4 Mikroskopie	48
4 ERGEBNISSE.....	49
4.1 Lokale Transduktion	49
4.1.1 Lokalität der eGFP-Expression bei Verwendung verschiedener Magnetspitzen	50
4.1.2 Effizienzänderung einer lokalen Transduktion bei erhöhter Distanz zur Magnetspitze ...	55
4.1.3 Verwendung verschiedener MNPs zur lokalen Transduktion	56
4.1.4 Einfluss der MNPs auf die elektrische Aktivität von HL-1 Zellen	58
4.2 Einsatz von ChR2 als optischer Schrittmacher	61
4.2.1 Klonierung des Transgentransfervektors pRRL-EF1 α -ChR2-eYFP	61
4.2.2 Etablierung einer stabilen ChR2-eYFP exprimierenden HL-1 Zelllinie	61
4.2.3 Globale Stimulation und räumliche Summation der Feldpotentiale	64
4.2.4 Lokale Transduktion von RRL-EF1 α -ChR2-eYFP Lentiviren.....	66
4.3 Möglichkeiten zur Generierung eines biologischen Ersatzschrittmachers.....	69
4.3.1 Erhöhung des Schrittmacherpotentials (I_f) durch Überexpression des HCN4-Kanals.....	70
4.3.1.1 Klonierung des Transgentransfervektors pRRL-EF1 α -HCN4-eGFP	70
4.3.1.2 Funktionsanalyse der RRL-EF1 α -HCN4-eGFP Lentiviren auf HEK293 und HL-1 Zellen mit Hilfe der Voltage-Clamp-Technik	71
4.3.2 Erhöhung des Schrittmacherpotentials (I_f) durch Überexpression eines modifizierten HCN2-Kanals	72
4.3.2.1 Klonierung des Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP	72
4.3.2.2 Funktionsanalyse der RRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP Lentiviren auf HL-1 Zellen durch fluoreszenzbasierte Kalziummessung	73
4.3.3 Inhibition des Ruhemembranpotentials durch Expression eines dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals	75
4.3.3.1 Klonierung des Transgentransfervektors pRRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP	75
4.3.3.2 Funktionsanalyse der RRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Lentiviren auf HL-1 Zellen durch fluoreszenzbasierte Kalziummessung	76
4.3.4 Konversion in Schrittmacherzellen durch Überexpression des Transkriptionsfaktors Tbx18	77
4.3.4.1 Klonierung des Transgentransfervektors pRRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP	77
4.3.4.2 Funktionsanalyse der RRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP Lentiviren durch fluoreszenzbasierte Kalziummessung von Kardiomyozyten	78
4.4 Generierung von biologischen Schrittmachern durch lokale Transduktion <i>in vitro</i> ..	80
4.4.1 Methode zur Richtungsanalyse der Erregungsausbreitung in MEA-Langzeitmessungen	80

4.4.2	Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung nach lokaler Transduktion von Schrittmachergenen	83
4.5	Markieren von Zellen mittels MNPs (SO-Mag5).....	92
4.6	Lokale Positionierung von MNP-beladenen ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten ...	93
4.6.1	Lokale Positionierung von Kardiomyozyten auf das Elektrodenfeld eines MEAs	93
4.6.2	Generierung eines Ersatzschrittmachers durch Positionierung von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten	95
5	DISKUSSION	97
5.1	Toxizität der MNPs	97
5.2	Lokale Transduktion mittels MNPs und Magneten.....	100
5.3	Lokale Zellpositionierung mittels MNPs und Magneten	102
5.4	Generierung eines lokalen optischen Schrittmachers.....	104
5.5	Biologischer Ersatzschrittmacher durch lokalen Gentransfer.....	105
5.6	Verhältnis zwischen Schrittmacherquelle und Erregungswahrscheinlichkeit (source-sink mismatch).....	108
6	FAZIT / AUSBLICK.....	112
7	ZUSAMMENFASSUNG	114
8	LITERATURVERZEICHNIS	116
9	ANHANG.....	130
9.1	Origin Skript: Berechnung der Erregungsausbreitung (der MEA Langzeitmessungen).....	130
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133
	DANKSAGUNG	135

1 Einleitung

1.1 Das Herz und seine elektrophysiologischen Eigenschaften

Das Herz ist ein muskuläres Pumporgan mit der wichtigen Aufgabe, den Organismus mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Indem es durch rhythmische Kontraktions- (Systole) und Erschlaffungsphasen (Diastole) der Herzkammern das Blut in das Gefäßsystem pumpt, wird eine gerichtete Blutzirkulation im Körper aufrechterhalten. Damit das Herz diese mechanische Arbeit leisten kann, besteht der überwiegende Teil des Herzmuskels (Myokard) aus fibrillenreichen Fasern mit deutlicher Querstreifung, welche sich durch Kontraktion verkürzen können. Dieser Teil wird auch als Arbeitsmyokard bezeichnet. Ein geringerer Teil des Myokards besitzt fibrillenarme Muskelzellen, welche spezielle Funktionen in der Erregungsbildung und -weiterleitung übernehmen (Golenhofen, 2006; Klinker and Silbernagl, 2005).

Um das Blutvolumen effizient aus den Herzkammern zu werfen, muss das Arbeitsmyokard in einem Schlagzyklus vollständig und elektrisch synchron erregt werden. Als primäres Erregungsbildungszentrum dient der Sinusknoten (siehe unten), von wo aus sich die Erregung durch Internodalbündel über beide Vorhöfe ausbreitet und die Vorhofkontraktion auslöst. Über die Vorhöfe gelangt die elektrische Erregung zum Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), der zusammen mit dem His-Bündel den einzigen elektrischen Übergang zum Ventrikel bildet. Der AV-Knoten leitet die Erregung verzögert weiter, damit nach Vorhofkontraktion die Ventrikelkammern vollständig gefüllt werden. Im Ventrikel breitet sich die Erregung über die Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern zum Ventrikelmyokard aus. Nach Erregung des Arbeitsmyokards kontrahiert der gesamte Ventrikel synchron und pumpt das Blut aus den Kammern. Nach der Kontraktionsphase folgt eine Erschlaffungsphase, in der das Herz erneut mit Blut gefüllt wird und wieder erregt werden kann.

1.1.1 Der Sinusknoten als Zentrum der Erregungsbildung

1.1.1.1 Der Sinusknoten und seine Rolle für die Automatie des Herzens

Eine Besonderheit des Herzens ist sein eigenes Erregungsbildungs- und Erregungsweiterleitungssystem, was eine Funktion unabhängig von äußeren nervalen Impulsen (myogenes Herz) sicherstellt. Diese Eigenschaft wird als Automatie (oder Autorhythmie) des Herzens bezeichnet. Von zentraler Bedeutung ist der Sinusknoten,

welcher sich im rechten Vorhof unterhalb der Einmündung der oberen Hohlvene (Vena cava superior) befindet. Der Sinusknoten wurde bereits 1907 von Keith und Flack zum ersten Mal histologisch beschrieben (Keith and Flack, 1907). Jedoch konnten erst 1910 Wybaw (Wybaw, 1910) und Lewis et al. (Lewis, 1910) zeigen, dass der Sinusknoten der Ursprung der elektrischen Erregung im Herzen ist. Damit ist der Sinusknoten der primäre Taktgeber des Herzens und weist beim Menschen im Ruhezustand ungefähr 70 Erregungen pro Minute auf. Dieser normale Herzschlag wird daher als Sinusrhythmus bezeichnet.

Damit das Herz seine Frequenz anpassen kann, ist das Herz durch sympathische und parasympathische Anteile des autonomen Nervensystems innerviert. Die wichtigsten Transmitterstoffe sind Noradrenalin und Adrenalin zur Frequenzsteigerung sowie Acetylcholin zur Frequenzsenkung (Schmidt and Lang, 2010).

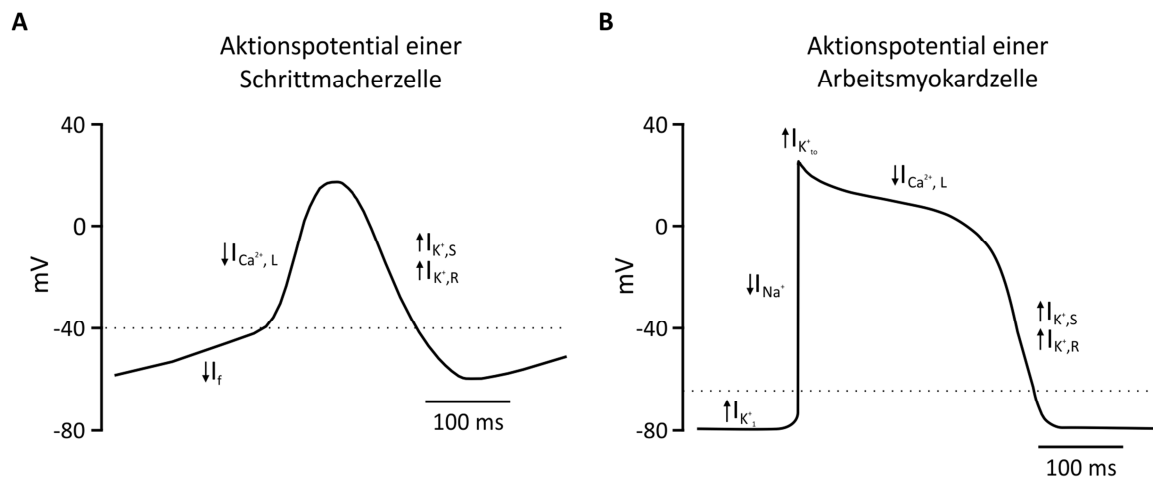


Abbildung 1: Aktionspotentiale der Schrittmacher- und Arbeitsmyokardzelle. Vergleichende Darstellung der Aktionspotentiale mit den dafür verantwortlichen Ionenströmen (\downarrow : Einwärtsstrom, \uparrow : Auswärtsstrom) und Schwellenwerten (gestrichelte Linie). (A) Das Schrittmacherpotential mit einem maximal diastolischen Potential (MDP) von -60 mV ist gekennzeichnet durch ein immer wiederkehrendes Aktionspotential (siehe Kapitel 1.1.1.2). (B) Das Arbeitsmyokard besitzt ein stabiles Ruhemembranpotential von -80 mV und kann von außen erregt werden, so dass ein Aktionspotential ausgelöst wird (siehe Kapitel 1.1.2).

1.1.1.2 Elektrophysiologische Grundlagen der Sinusknotenzellen

Grundlage für die Automatie liegt in den elektrophysiologischen Eigenschaften der Sinusknotenzellen, welche sich deutlich von den Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) des Arbeitsmyokards unterscheiden. Abbildung 1 zeigt die Aktionspotentiale von ventrikulären Kardiomyozyten und Sinusknotenzellen, welche verschiedene Ionenkanäle exprimieren

und somit unterschiedliche physiologische Eigenschaften besitzen. Im Gegensatz zu den Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards besitzen Sinusknotenzellen kein stabiles Ruhemembranpotential. Stattdessen sind diese Zellen in der Lage in regelmäßigen Abständen spontan zu depolarisieren und ein Aktionspotential auszulösen. Eine Repolarisation nach jeder Erregung führt zu einem maximal diastolischen Potential (MDP) von nur -60 mV. Ein wesentlicher Grund dafür ist das Fehlen des I_{K1} -Stroms, welcher bei Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards das Ruhemembranpotential stabil bei ca. -80 mV hält (siehe Kapitel 1.1.2). Weiterhin besitzen die Sinusknotenzellen einen besonderen Typ von spannungsgesteuerten Kationenkanälen (hyperpolarisationsaktivierte und zyklische Nucleotid-bindende Kanäle; *hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated ion channel*, HCN-Kanal), welche durch Hyperpolarisation der Zelle aktiviert werden. Ein Öffnen dieser Ionenkanäle führt zum Einstrom von Kationen (vor allem Na^+ -Ionen) und folglich zu einer langsamen diastolischen Depolarisation der Zelle (I_f). In dieser Phase besitzen die Sinusknotenzellen einen weiteren Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus, der verstärkend zur Depolarisation der Zelle beiträgt (siehe unten: *Membrane Clock* und *Calcium Clock*). Sobald das Membranpotential einen Schwellenwert von ca. -40 mV erreicht, öffnen spannungsabhängige Kalziumkanäle. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ($I_{\text{Ca,L-Typ}}$) führt zum eigentlichen Aktionspotential mit einem langsamen Aufstrich. Im Anschluss folgt die Repolarisation der Zelle, indem durch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle ein Kaliumausstrom (I_K : Auswärtsgleichrichter) generiert wird (Abbildung 1A).

Membrane Clock und Calcium Clock

Die langsame diastolische Depolarisation, welche für die spontane Aktivität der Schrittmacherzellen verantwortlich ist, setzt sich aus zwei Systemen zusammen. Das erste System wird als *Voltage Clock* oder *Membrane Clock* bezeichnet und beschreibt die Eigenschaft, dass sich zeitliche Spannungsänderungen an der Zellmembran aufgrund von spannungsgesteuerten HCN-Kanälen ergeben. Der verursachte Strom wird als Schrittmacherstrom oder I_f -Strom (I_f : *funny current*) bezeichnet. Letzteres beruht auf der außergewöhnlichen („funny“) Besonderheit, dass dieser Strom durch Hyperpolarisation anstatt durch Depolarisation aktiviert wird (Baruscotti et al., 2005; Brown et al., 1979).

Das zweite System ist als *Calcium Clock* bekannt und beschreibt einen weiteren Mechanismus, der zur Schrittmachergenerierung beiträgt (Lakatta et al., 2010, 2008). Hierbei ist die Ursache der Depolarisation das intrazelluläre oszillierende Kalzium einer jeden Sinusknotenzelle durch spontane und rhythmische Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Das freiwerdende Kalzium kann an der Zellmembran durch den membranständigen Natrium-Kalzium Austausch (NCX) nach außen

transportiert werden. Für jedes Kalzium-Ion werden im Gegenzug drei extrazelluläre Natrium-Ionen in die Zelle transportiert. Der resultierende Netto-Einwärtsstrom (I_{NCX}) verstärkt auf diese Weise die diastolische Depolarisation der Zelle, so dass das Schwellenpotential früher erreicht und ein Aktionspotential ausgelöst wird (Bogdanov et al., 2006; Ju and Allen, 1999; Zhou and Lipsius, 1993).

Die beiden Systeme bilden ein komplexes Zusammenspiel (Abbildung 2), welches für die Frequenzentstehung und -regulation nötig ist (Lakatta et al., 2008, 2010; Lakatta and Maltsev, 2013). Welches System letztendlich überwiegt, ist noch unklar. Besonders der Anteil der *Calcium Clock* wird kontrovers diskutiert. So konnte Bogdanov et al. an Sinusknotenzellen von Hasen zeigen, dass der durch Ca^{2+} -aktivierte Natrium-Kalzium Austauscher (I_{NCX}) einen wichtigen Teil der Schrittmachergenerierung ausmacht (Bogdanov et al., 2001), wohingegen Honjo et al. eine dominierende Rolle im Sinusknoten eher ausschließen konnte (Honjo, 2003).

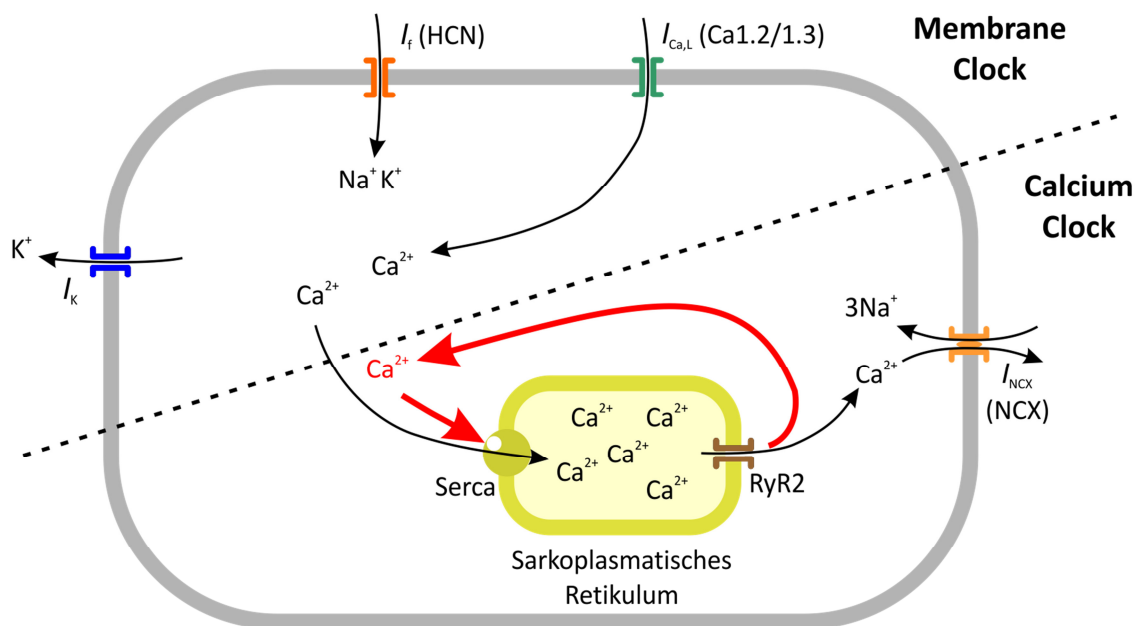


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Sinusknotenzelle und der Kopplung von Membrane Clock und Calcium Clock. Beide Systeme tragen zur langsamen diastolischen Depolarisation bei, welche letztendlich für die Spontanaktivität der Schrittmacherzellen verantwortlich ist. Die *Membrane Clock* beschreibt den I_f -Strom (getragen durch den HCN-Kanal), der für einen immer wiederkehrenden Einwärtsstrom sorgt. Dieser wird durch die *Calcium Clock* verstärkt, indem aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigelassene Kalzium-Ionen an der Membran jeweils gegen drei Natrium-Ionen ausgetauscht werden. (modifiziert nach Monfredi et al., 2010)

1.1.1.3 Struktur des Sinusknotens

Der Sinusknoten bildet das primäre Erregungsbildungszentrum im Herzen. Neben den oben beschriebenen elektrophysiologischen Eigenschaften der Einzelzellen ist der strukturelle Aufbau des Sinusknotens entscheidend für seine Funktion.

Der Sinusknoten bildet eine sehr komplexe und heterogene Struktur mit mehreren Regionen, welche in ihrer Gesamtheit von Arterien, Fett und fibrösem Gewebe umgeben ist. Strukturell und funktionell dient dies als elektrische Barriere zwischen Sinusknoten und umgebenden atrialen Myokard, so dass das Schrittmachergewebe vor einem hyperpolarisierenden Einfluss des Atriums geschützt ist. Über spezielle Weiterleitungsbahnen (*exit pathways*) wird eine gerichtete Erregung aus dem Sinusknoten auf das umliegende atriale Myokard übertragen (Bromberg et al., 1995; M. R. Boyett et al., 2000; Fedorov et al., 2009, 2012).

Auf molekularer Ebene spiegelt sich die Heterogenität in verschiedenen Expressionsmustern der Ionenkanäle wider. Eine Besonderheit liegt in unterschiedlichen Expressionen der *gap junction* Proteine, die für eine elektrische Zellkopplung von Bedeutung sind (siehe Kapitel 1.1.2). So zeichnet sich der Sinusknoten aufgrund fehlender Connexin43 (Cx43) Proteine durch eine schwächere elektrische Kopplung im Vergleich zum Arbeitsmyokard aus (M. R. Boyett et al., 2000; Chandler et al., 2009). *In vitro* Versuche konnten bereits zeigen, dass eine geringere elektrische Kopplung zwischen Schrittmacherzellen und Kardiomyozyten zu höherer Schrittmacheraktivität führen kann (Rohr, 1997; Fahrenbach et al., 2008). In Übereinstimmung konnte in Computersimulationen gezeigt werden, dass eine stabilere Erregungsübertragung in elektrisch gekoppelten Kardiomyozyten gegeben war, wenn das Schrittmacherareal stärker isoliert vom umgebenden Gewebe vorlag (Joyner and van Capelle, 1986; Podziemski and Żebrowski, 2013).

Die Heterogenität des Sinusknotens zeigt sich weiterhin in der Existenz verschiedener Zentren zur Schrittmacherinitiation innerhalb des Sinusknotenkomplexes (Schuessler et al., 1996). So konnte ein Schrittmacherwechsel zwischen zwei unterschiedlichen Zentren innerhalb des Sinusknotens festgestellt werden, je nach sympathischem (Adrenalin) oder parasympathischem (Acetylcholin) Einfluss (Boineau et al., 1984; Schuessler et al., 1996).

1.1.2 Das Arbeitsmyokard und seine elektrophysiologischen Grundlagen

Im Arbeitsmyokard sind die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens verantwortlich, welche durch eine elektrische Erregung aktiviert werden. Diese Zellen befinden sich im Ruhezustand und sind spontan inaktiv. Elektrochemisch zeichnen sich die Kardiomyozyten durch ein Ruhemembranpotential von

ca. -80 mV aus, das durch den I_{K1} -Strom (K_{ir} -Kanal: Einwärtsgleichrichter = *inward rectifier*) stabil gehalten wird. Die Kardiomyozyten können von außen erregt werden und ein typisches Aktionspotential ausbilden (Abbildung 1B). Damit die Kardiomyozyten von den benachbarten Zellen erregt werden können, benötigen sie eine elektrische Kopplung untereinander. Dafür besitzen sie spezielle Zell-Zellverbindungen (*gap junctions*), welche aus einem Membrankanal bestehen und eine hohe elektrische Leitfähigkeit besitzen. Jede Zelle trägt mit einem Halbkanal (Connexon) zum Aufbau des Membrankanals bei. Jedes Connexon wiederum besteht aus je sechs Proteinkomplexen (Connexinen). Sobald es bei benachbarten Zellen zu Spannungsänderungen aufgrund von Ionenveränderungen kommt, werden diese über Zell-Zellverbindungen auf die Zelle übertragen, so dass das Membranpotential ansteigt. Wird durch die Spannungsänderung ein Schwellenwert von ca. -60 mV erreicht, werden spannungsgesteuerte Natriumkanäle geöffnet, welche einen kurzen aber großen Na^+ -Einwärtsstrom (I_{Na}) hervorrufen und eine starke Depolarisation der Zelle verursachen. Gleichzeitig kommt es zu einer Blockade der K_{ir} -Kanäle durch die Bindung von Spermin, um einen entgegen gerichteten K^+ -Auswärtsstrom zu vermeiden. Im Anschluss tritt eine sehr kurze Repolarisation durch $I_{K,to}$ (Auswärtsgleichrichter = *transiently open*) ein, gefolgt von einer längeren Plateauphase. Diese wird durch die spannungsabhängige Aktivierung von Kalziumkanälen ($I_{Ca,L-Typ}$) getragen, welche wichtig für die elektromechanische Kopplung und damit für die vollständige Kontraktion der Myokardzelle ist. Die anschließende Repolarisation auf das Ruhemembranpotential erfolgt durch Öffnen spannungsgesteuerter Kaliumkanäle ($I_{K,R}$ und $I_{K,S}$: Auswärtsgleichrichter). Die Blockade der K_{ir} -Kanäle wird wieder gelöst, so dass das Ruhemembranpotential stabil gehalten werden kann (Klinke and Silbernagl, 2005; Golenhofen, 2006; Schmidt and Lang, 2010).

1.2 Fehlfunktion des Sinusknotens und Therapieansätze

1.2.1 Fehlfunktion der Sinuserregung /-weiterleitung

Patienten mit Herzrhythmusstörungen besitzen einen Herzschlag, welcher deutlich von der physiologischen Frequenz abweicht. Störungen des Reizbildungs- sowie des Reizweiterleitungssystems führen in den meisten Fällen zu Bradykardien (d.h. zu einer erniedrigten Herzfrequenz). Die Ursachen hierfür sind sehr vielfältig und können sowohl angeboren sein oder durch eine Herzmuskelschädigung (z.B. Ischämie, Hypertrophie) hervorgerufen werden.

Prinzipiell wird zwischen normotopen und heterotopen Rhythmusstörungen unterschieden. Normotope Reizbildungsstörungen gehen vom Sinusknoten aus,

wohingegen heterotope Reizbildungsstörungen außerhalb des Sinusknotens entstehen. Eine Fehlfunktion der Erregungsbildung innerhalb des Sinusknotens wird gemeinhin unter dem Begriff *Sick-Sinus-Syndrome* zusammengefasst (Adán and Crown, 2003). Hierbei kommen die Impulse im Sinusknoten nur unzureichend oder nicht zustande. Die Gründe sind zumeist idiopathisch und gehen auf eine degenerative Gewebeveränderung des Sinusknotens zurück (Brignole, 2002; Schmidt and Lang, 2010; Vogler et al., 2012).

Bradykardien können auch durch Reizleitungsstörungen verursacht werden. Hierbei ist zwischen einem sinuatrialen Block und einen atrioventrikulären Block zu unterscheiden. Beim sinuatrialen Block kommt es zu einer Störung der Reizleitung vom Sinusknoten in die Vorhofmuskulatur. Ein atrioventrikulärer Block ist durch eine Weiterleitungsstörung am Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) gekennzeichnet, welcher wichtig für die Überleitung vom Vorhof auf den Ventrikel ist. Ursachen können hierfür verschiedene kardiale Vorerkrankungen sein, wie z.B. eine koronare Herzerkrankung oder Kardiomyopathien.

1.2.2 Aktueller Einsatz von elektrischen Herzschrittmachern

Erfolgreiche Therapieansätze zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen bei Fehlfunktionen der Erregungsbildung sowie -weiterleitung brachte die Verwendung von elektrischen Schrittmachern. In Deutschland finden jährlich etwa 70.000 Neuimplantationen statt, weltweit liegt die Zahl bei ca. einer Million (Trappe and Gummert, 2011).

Weirich et al. implantierte 1957 den ersten externen Herzschrittmacher im Menschen (Nelson, 1993; Weirich et al., 1957). Seither haben elektrische Schrittmacher eine enorme technische Entwicklung durchlaufen, was sich in einer Reduktion der Größe, der deutlich gestiegenen Haltbarkeit der Batterien, verbesserten Stimulationselektroden und der Weiterentwicklung der Software widerspiegelt. Heutzutage sind verschiedenste multifunktionale Herzschrittmacher im Einsatz, die über vielfältige diagnostische Messungen und therapeutische Stimulationsmöglichkeiten verfügen (Nelson, 1993; Rosen et al., 2008; Trappe and Gummert, 2011).

Trotz des immensen technischen Fortschritts verspricht die Implantation eines elektrischen Schrittmachers keine vollständige Heilung und gewisse Probleme können damit nicht behoben werden. Lange Zeit konnten die Schrittmacher die Frequenz nicht angemessen regulieren, so dass die Frequenz nicht an die Belastungssituation der Patienten angepasst wurde. Mit modernen frequenzadaptiven Schrittmachern kann die Stimulationsfrequenz belastungsproportional über einen Sensor gesteuert werden, so dass die Patienten damit sportliche Aktivitäten mit erhöhter Leistungsfähigkeit ausüben können (Kindermann, 2001). Eine Anpassung durch das autonome Nervensystem ist jedoch bisher nicht gegeben. Binggeli et al. konnte hierfür einen ersten experimentellen

Lösungsansatz vorstellen, in dem das intrakardiale Impedanzsignal, welches Informationen über den inotropen Status der Ventrikel enthält, dazu verwendet wird, die Stimulationsfrequenz der Herzschrittmacher zu modulieren (Binggeli et al., 2000). Trotzdem bleibt die Implantation eines elektrischen Herzschrittmachers mit gewissen Risiken verbunden. Langzeitprobleme liegen in der Haltbarkeit der Batterien, was nach einer durchschnittlichen Lebensdauer von 5-10 Jahren einen Austausch durch einen operativen Eingriff erforderlich macht (Kindermann, 2001). Hinzu kommt die stetige Gefahr einer Fehlfunktion des Schrittmachersystem (Häufigkeit 1,1%), was bei geringstem Verdacht überprüft und ggf. sofort korrigiert werden muss (Trappe and Gummert, 2011). Sonstige Komplikationen treten meist frühzeitig nach erfolgter Implantation auf. Hierzu gehören Ventrikelperforationen (Häufigkeit 1%), Dislokationen der Schrittmacherelektroden (Häufigkeit <1%) und Infektionsrisiken der Schrittmachertasche und Elektroden (Häufigkeit zwischen 1-12%) (Kindermann et al., 2001; Trappe and Gummert, 2011). Ein weiterer und spezieller Aspekt kommt der Verwendung von Herzschrittmachern in der Pädiatrie zu. Hierbei ist es besonders problematisch, die Schrittmacher an den noch wachsenden und sich entwickelnden Patienten anzupassen, was eine mehrfache Implantation zur Folge hat (Rosen, 2005; Rosen et al., 2004).

1.2.3 Generierung biologischer Schrittmacher

Bei der Behandlung von bradykarden Herzrhythmusstörungen besteht ein großes Interesse an alternativen Therapiemethoden. In der medizinischen Forschung ist hierbei die Generierung eines biologischen Schrittmachers bedeutend. Darunter versteht man die Herstellung eines körpereigenen Herzschrittmachers, der den Herzrhythmus stabil und unter physiologischen Bedingungen übernehmen kann. Ein weiterer Anspruch an biologische Ersatzschrittmacher wäre zudem die Möglichkeit einer autonomen Regulation der Herzfrequenz. Um sich diesem Ziel zu nähern, werden sowohl gentherapeutische sowie zelltherapeutische Ansätze verfolgt.

Mittels Gentherapie sollen residente Zellen (wie z.B. Kardiomyozyten) in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften modifiziert werden, um eine entsprechende Fähigkeit zur Schrittmacheraktivität zu induzieren. Der Gentransfer kann mit Hilfe von Viren geschehen (Transduktion) oder durch Einbringen von Fremd-DNA (Transfektion) (Verma and Somia, 1997; Rosenecker, 2010).

Die Auswahl an erdenklichen Schrittmachergenen ist zahlreich und muss individuell untersucht werden. Eine Möglichkeit zur Generierung von Schrittmacheraktivität ist eine Überexpression von Genen, die die Einwärtsströme der Zellen steigern. Hierfür eignen sich die Schrittmacherkanäle (HCN-Kanälen), welche bei (Über-) Expression in Herzmuskelzellen für eine diastolische Depolarisation sorgen und dadurch rhythmisch

Aktionspotentiale auslösen können. Aus der Gruppe der HCN-Kanäle sind vier Isoformen bekannt (HCN1 - 4), wobei die Isotypen HCN2 und HCN4 hauptsächlich im Herz vorkommen. Im Sinusknoten ist vorrangig die HCN4-Isoform vertreten, wohingegen HCN2 im Weiterleitungssystem exprimiert wird (Rosen et al., 2011; Scicchitano et al., 2012). Deshalb werden diese beiden Isoformen bevorzugt für eine Generierung von Schrittmacheraktivität im Herzen ausgewählt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits durch Überexpression einer der Isoformen Schrittmacheraktivität in Kardiomyozyten erzeugen. Cai et al. injizierte HCN4-tragende Adenoviren in die Ventrikel von Schweinen und konnte nach drei bis vier Tagen bei vollständigem AV-Block einen ventrikulären Ersatzrhythmus im Bereich der Injektionsstelle feststellen. Außerdem zeigten transduzierte ventrikuläre Einzelzellen einen I_f -Strom (Cai et al., 2007). Gleichermaßen konnten HCN2 Adenoviren genutzt werden, um die HCN2-Isoform im linken Vorhof oder im Ventrikel von Hunden einzubringen. In beiden Fällen konnte nach vagaler Stimulation ein Ersatzrhythmus aus der Region der Injektionsstelle beobachtet werden (Qu et al., 2003; Plotnikov et al., 2004). Darüber hinaus besteht ein Interesse die physiologischen Eigenschaften der HCN-Kanäle weiter zu beeinflussen, so dass die Kanäle durch Mutationen verändert werden, um einen optimierten Schrittmacher zu generieren (Bucchi et al., 2006; Plotnikov et al., 2008).

Eine weitere Möglichkeit zur Generierung von Schrittmacheraktivität besteht in der Herunterregulation (*knock-down*) von Genen, die für das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzelle verantwortlich sind. So konnte Miake et al. einen dominant negativen K_{ir} -Kanal (Kir2.1AAA) entwickeln, der bei Expression zu einer Suppression des nativen I_{K1} -Stroms führte. Virale Injektionen in Ventrikel von Meerschweinchen konnten in 40% aller Versuchstiere einen Ersatzrhythmus ausgehend von der Injektionsstelle erzeugen. Untersuchungen an isolierten ventrikulären Einzelzellen belegten, dass positiv transduzierte Kardiomyozyten eine spontane Schrittmacheraktivität entwickelten aufgrund eines destabilisierten Ruhemembranpotentials (Miake et al., 2003, 2002).

Kürzlich wurde eine neue und innovative Methode zur Schrittmachergenerierung vorgestellt, welche eine „Reprogrammierung“ von Herzmuskelzellen in Schrittmacherzellen verfolgt. Hierfür wurden T-box Transkriptionsfaktoren (Tbx) verwendet, die eigentlich für die Embryonalentwicklung des Sinusknotens eine entscheidende Rolle spielen (Wiese et al., 2009; Greulich et al., 2011). Eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren Tbx3 oder Tbx18 in adulten Herzmuskelzellen führte zu einer Reprogrammierung in Schrittmacher-ähnliche Zellen (Bakker et al., 2012; Kapoor et al., 2012). Eine Analyse der Expressionsmuster von Tbx3 exprimierten adulten murinen Kardiomyozyten verdeutlicht einen Wechsel zu Schrittmacherzellen, erkennbar an der Suppression von Cx43 und I_{K1} . Jedoch konnte keine Schrittmacheraktivität anhand eines

messbaren I_f -Stroms generiert werden (Bakker et al., 2012). Vielversprechender war eine Überexpression von Tbx18, welche zu einer direkten Reprogrammierung von adulten Herzmuskelzellen in spontan aktive Sinusknotenzellen führte. Dabei war eine reduzierte Zellkopplung festzustellen, was an der spezifischen Inhibition des in Kardiomyozyten stark exprimierenden Cx43 liegt. Hingegen blieben die Expression von Cx45 und Cx40 unverändert, was den vorhandenen Connexinen im Sinusknoten und im Weiterleitungssystem entspricht (Kapoor et al., 2011). Injektionen in Ventrikel von Meerschweinchen bestätigten die Umwandlung von adulten Kardiomyozyten in Sinusknoten-ähnliche Zellen. Diese waren spontan aktiv und zeigten sogar morphologische Übereinstimmungen mit Sinusknotenzellen (Kapoor et al., 2012).

Zusammenfassend erfolgte in den erwähnten *in vivo* Studien die Schrittmachergenerierung durch eine lokale Injektion von Adenoviren. Jedoch ist eine genaue Lokalisation dabei sehr unklar, da Injektionen stark von Diffusion beeinflusst sind und von der Transduktionseffizienz abhängen (Rosen et al., 2007).

Einen weiteren Ansatz zur biologischen Schrittmachergenerierung bietet die Zelltherapie, bei der spezialisierte oder modifizierte Zellen ins Gewebe transplantiert werden. Dort sollen sie ins Gewebe integrieren und elektrisch koppeln, so dass Vorort eine Übernahme der Schrittmacheraktivität erfolgt. Hierbei liegen große Hoffnungen auf humanen embryonalen Stammzellen (hESCs), welche *in vitro* zu Schrittmacherzellen differenziert und dann gezielt ins Herz eingebracht werden können. Kehat et al. zeigte bereits, dass die Injektion von hESCs abgeleiteten Kardiomyozyten in den Ventrikel des Schweins nach AV-Block sogar eine stabile Schrittmacherfunktion über einen längeren Zeitraum erzeugen konnte (Kehat et al., 2004). Aus Stammzellen abgeleitete Schrittmacherzellen haben den Vorteil, dass sie alle Voraussetzungen einer Schrittmacherzelle ohne genetische Veränderung mitbringen. Ferner konnten auch humane mesenchymale Stammzellen (hMSCs), welche genetisch durch Expression von HCN2 modifiziert wurden, in den linken Ventrikel von Hunden injiziert werden und unter Inhibition des Sinusrhythmus als Schrittmacher agieren (Plotnikov et al., 2007).

1.2.4 Optogenetik im kardiovaskulären Bereich: ein optischer Schrittmacher

Eine erst relativ neue Möglichkeit zur Generierung von künstlicher Schrittmacheraktivität bietet die Optogenetik, welche sich in den letzten Jahren als vergleichsweise neues Fachgebiet entwickelt hat. Optogenetik erlaubt die genetische Modifikation von Zellen und infolgedessen eine Manipulation mittels Licht. Dies geschieht über licht-sensitive Proteine in der Zelle, wie z.B. das 2003 zum ersten Mal beschriebene Channelrhodopsin2 (ChR2) (Nagel et al., 2003). ChR2 ist ein licht-aktivierter Kationenkanal aus der grünen Alge

Chlamydomonas reinhardtii, der unter Beleuchtung mit blauem Licht (~470 nm) geöffnet wird. Dadurch kommt es zu einem Kationen-Einwärtsstrom und zu einer Depolarisation der Zelle. In Kardiomyozyten kann diese Depolarisation zum Auslösen eines Aktionspotentials führen. Diese Möglichkeit Kardiomyozyten durch Expression von ChR2 und mit Hilfe von Licht erregen zu können, bietet eine interessante Alternative zur elektrischen Stimulation von Herzmuskelzellen (Yakushenko et al., 2013). Weiterhin zeigten *in vitro* Studien, dass Kokulturen aus ChR2 exprimierenden HEK-Zellen und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte ein koppelndes Synzytium bildeten, welches sich optisch stimulieren ließ (Jia et al., 2011). *In vivo* konnten zudem transgene Tiere erzeugt werden, welche ChR2 ubiquitär exprimieren. Sowohl bei ChR2-exprimierenden Zebrafischen als auch ChR2-exprimierenden Mäusen konnte die Herzaktivität *in vivo* durch optische Stimulation kontrolliert werden (Arrenberg et al., 2010; Bruegmann et al., 2010). Diese Versuche belegten eine Einsatzmöglichkeit von ChR2 als optischen Schrittmacher. Inwiefern es als Alternative eines Schrittmacherersatzes dienen kann, ist unklar. So müssen Langzeituntersuchungen eine stabile Funktionalität als Ersatzschrittmacher beweisen und es muss eine technische Umsetzung zur optischen Stimulation im Herzen existieren (Sasse, 2011).

1.3 Magnetische Nanopartikel (MNP)

Die Nanotechnologie ist ein interdisziplinärer Wissenschaftszweig aus den Bereichen der Physik, Chemie und Biologie. Dieser befasst sich mit Effekten und Phänomenen, die aufgrund funktioneller Strukturgrößen von 0,1 bis 100 nm entstehen. Die Bedeutung und das Forschungsinteresse an der Nanotechnologie haben in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Besonders deutlich wird dies durch den ständigen Anstieg an Investitions- und Förderungsgeldern. So wurden in den letzten 20 Jahren die Fördermittel des BMBF mehr als verzehnfacht und betragen im Jahr 2010 ca. 200 Mio. Euro. Auch die privaten Investitionen in die Nanotechnologie sind entscheidend gestiegen und hatten in Europa von 2004 bis 2006 ein Volumen von 2,3 Mrd. Euro, was ca. 33% der europäischen Gesamtinvestitionen betrug ("BMBF 2011: „Nanotechnologie Aktionsplan 2015“, Bonn, Berlin 2011," n.d.). Diese Zahlen zeigen das Potential, das in den Forschungsbereichen von Nano- und Nanobiotechnologie steckt.

In der biomedizinischen Forschung sind vor allem die Nanopartikel von großer Bedeutung, da sie für die Medizin in einem weiten Bereich Anwendung finden können. Innerhalb der Gruppe der Nanopartikel versprechen besonders die magnetischen Nanopartikel (MNPs) mit ihren physikalischen Eigenschaften hoffnungsvolle Einsatzmöglichkeiten in Forschung und Klinik.

1.3.1 Physikalische Eigenschaften und Aufbau magnetischer Nanopartikel

MNPs sind in der biomedizinischen Forschung von großem Interesse, da sie aufgrund ihrer Größe von unter 100 nm spezielle magnetische Eigenschaften besitzen, welche sich im Vergleich zu ihren Bulkmaterialien (Materialien mit großen Dimensionen) unterscheiden. Generell lassen sich magnetische Bulkmaterialien (wie z.B. das Eisen) durch Anlegen eines externen magnetischen Feldes magnetisieren. Dabei kommt es zur Ausrichtung der magnetischen Domänen (den sogenannten Weißschen Bezirken) des Eisens parallel zu den Feldlinien, was wiederum zu einer Verstärkung des magnetischen Feldes beiträgt. Aufgrund der starken Wechselwirkung zwischen den magnetischen Domänen kann die starke Magnetisierung nach Entfernung des äußeren magnetischen Feldes erhalten bleiben. Erst oberhalb einer materialabhängigen Temperatur (Curie-Temperatur) nimmt die thermische Destabilisation zu, so dass die Magnetisierung des Eisens ohne äußeres Magnetfeld nicht aufrechterhalten werden kann (Tipler and Mosca, 2009; Tipler, 1994). In dieser Situation verhalten sich die Materialien paramagnetisch, d.h. sie sind nur dann magnetisiert, wenn sie ein externes magnetisches Feld umgibt. Die MNPs besitzen aufgrund ihrer charakteristischen Größe von 1 bis 100 nm besondere magnetische Eigenschaften (Whitesides, 2003). Da die Partikelgröße unterhalb der magnetischen Domänen liegt, ist die thermische Energie bei Raumtemperatur größer als die Wechselwirkungsenergie der magnetischen Momente innerhalb eines Partikels. So verlieren magnetische Nanopartikel unabhängig von der Temperatur ihre Magnetisierung, sobald ein äußeres Magnetfeld entfernt wird. Diese Eigenschaft, die sich allein aufgrund der Partikelgröße ergibt, wird als Superparamagnetismus bezeichnet (Colombo et al., 2012).

Damit die MNPs in der biomedizinischen Forschung und Klinik eingesetzt werden können, müssen sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen. In der Vergangenheit haben die MNPs mit einem Eisenoxidkern hierbei die geringste Toxizität gezeigt. Der eisenbasierte Kern besteht entweder aus Magnetit (Fe_3O_4) oder Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), wobei Magnetit eine bessere magnetische Eigenschaft und Stabilität aufweist (Colombo et al., 2012; Hülser, 2003; McBain et al., 2008). Zur Herstellung von magnetischen Partikeln im Nanobereich existieren verschiedene Techniken. Häufig wird die Kopräzipitation in wässrigen Lösungen angewendet (Mykhaylyk et al., 2010), die zur Synthese der in dieser Arbeit verwendeten Partikel eingesetzt wurde.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Synthese von MNPs ist die Oberflächenbeschichtung, welche neben einer Vergrößerung der Partikel zusätzlich einen negativen Einfluss auf die magnetischen Eigenschaften haben kann (Colombo et al., 2012; McBain et al., 2008). Jedoch kann die Partikelbeschichtung stabilisierende Effekte hervorrufen und Agglomerationen verhindern, die teilweise in Lösungen mit hohen Protein- und

Salzkonzentrationen auftreten können (Chanteau et al., 2009; Colombo et al., 2012). Zum Einsatz kommen dabei natürliche (z.B.: Dextran) und synthetische Polymere (z.B.: Polyethyleneglycol (PEG)), Siliziumoxid oder auch organische Linker (Colombo et al., 2012). Eine Oberflächenbeschichtung von MNPs ist außerdem für eine Funktionalisierung von besonderer Bedeutung, um die MNPs mit spezifischen Funktionen auszustatten. Dabei wird versucht MNPs zusätzlich an Antikörper, Proteine oder weitere Moleküle zu koppeln, womit die MNPs sehr spezifische Aufgaben erfüllen können (Puertas et al., 2011; Wei et al., 2012). Die vielseitigen Möglichkeiten einer Funktionalisierung macht sie für ein breites Einsatzgebiet interessant. So werden MNPs mittlerweile zur Detektion von Proteinen oder Pathogenen eingesetzt (Nam et al., 2003; Paul et al., 1981).

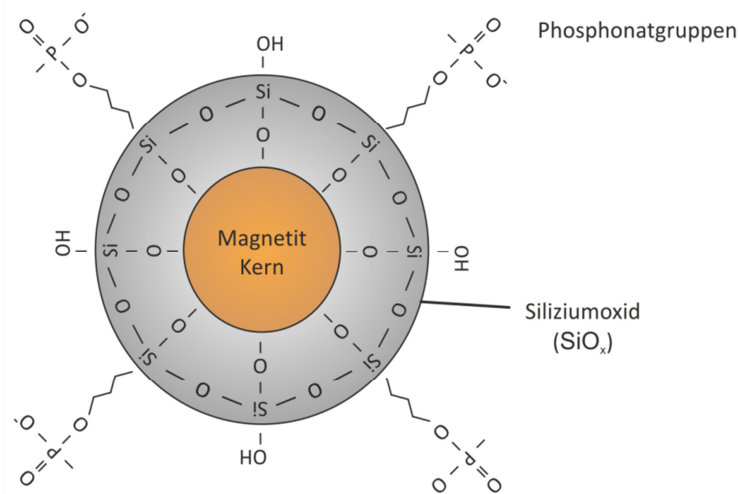


Abbildung 3: Schematische Darstellung des magnetischen Nanopartikels SO-Mag5. Das Zentrum bildet ein 7 nm großer Magnetitkern, welcher mit Siliziumoxid beschichtet ist und durch Phosphonatgruppen modifiziert wurde (modifiziert nach Mykhaylyk et al., 2012).

1.3.2 Aktuelle biomedizinische Anwendungen von MNPs

Das medizinische Interesse an MNPs führte zu einer intensiveren Forschung und Entwicklung in diesem Bereich, so dass die Anzahl an MNPs sowie Möglichkeiten funktionaler Modifikationen stetig steigen. Ein kleiner Teil an MNPs wird bereits in der medizinischen Diagnostik und Therapie verwendet. So können MNPs klinisch zur Behandlung von Tumoren mittels magnetischer Hyperthermie eingesetzt werden. Dabei werden MNPs lokal in Tumore verabreicht und durch Anlegen eines wechselnden magnetischen Feldes erhitzt, so dass diese MNPs lokal am Einsatzgebiet die Tumorzellen zerstören (Jordan et al., 2009; Maier-Hauff et al., 2010). In der Diagnostik können MNPs

als Kontrastmittel für bildgebende Verfahren genutzt werden, wie bei der Magnetresonanztomographie (MRT) (Bsp.: Resovist® von Bayer-Schering) (Bellin, 2006; Perea et al., 2007; Wang, 2011). Ein zukünftiges Anwendungsgebiet von MNPs liegt in der Pharmakotherapie, wobei die MNPs als Transportsystem dienen. Dabei werden Wirkstoffe an MNPs gebunden, welche systemisch verabreicht und durch Anlegen eines magnetischen Feldes lokal am Zielgewebe angereichert werden. In einigen Studien wurde mit MNPs ein erfolgreicher Wirkstofftransport *in vivo* gezeigt. Chemotherapeutika, die an Ferrofluide gebunden waren, wurden erfolgreich im Zielgewebe konzentriert (Alexiou et al., 2003; Lübbe et al., 2001). Eine klinische Studie zeigte die erfolgreiche Beschränkung des Tumorwachstum durch Lokalisation des Chemotherapeutikums Doxorubicin mittels MNPs im Leberzellkarzinom (Wilson et al., 2004). Der Vorteil einer Therapieform mittels MNPs liegt in einer lokalisierten Behandlung des erkrankten Gewebes bei gleichzeitiger Reduktion der systemisch zu verabreichenden Dosis eines Wirkstoffes.

1.3.3 Gentherapie mittels Magnetofektion

Die Gentherapie beschreibt das Einbringen von Fremdgenen in Zielzellen, um diese genetisch zu modifizieren. Dabei wird Fremd-DNA direkt (Transfektion) oder über Viren (Transduktion) in die Zellen eingebracht (Rosenecker, 2010). Allgemeine Probleme der Gentherapie sind die fehlende Möglichkeit einer Lokalisierung sowie eine geringe Effizienz der DNA-Aufnahme durch die Zielzellen, so dass nur ein kleiner Anteil der Zellen das Gen exprimiert. 2002 stellte Scherer et al. die Methode der Magnetofektion vor, welche die Effizienz des Gentransfers *in vitro* deutlich erhöhen konnte (Scherer et al., 2002). Hierbei werden nicht-virale wie auch virale Vektoren über elektrostatische Wechselwirkungen an MNPs gekoppelt. Durch Anlegen eines magnetischen Feldes können MNP-gebundene Vektoren deutlich stärker und wesentlich schneller sedimentieren, wodurch der Kontakt mit den Zellen, die zelluläre Aufnahme und letztendlich die Transfektions- bzw. Transduktionsrate gesteigert werden (Plank et al., 2003; Scherer et al., 2002). Das magnetische Feld braucht dabei nur einige wenige Minuten angelegt zu werden, um eine höhere Genexpression im Vergleich zu Kontrollversuchen ohne MNPs zu erreichen (Hofmann et al., 2009; Plank et al., 2003; Trueck et al., 2012). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass für einen gesteigerten Gentransfer durch MNP-vermittelten Transport sowohl DNA (Al-Deen et al., 2011) als auch siRNA (Mykhaylyk et al., 2008) und verschiedene Virustypen (Lenti-, Adenoviren) (Hofmann et al., 2009; Sapet et al., 2012) verwendet werden können.

Neben der Effizienzsteigerung und einer Verkürzung der Applikationszeit kann die Methode der Magnetofektion für einen lokalisierten Gentransfer genutzt werden. Weber et al. konnte durch Applikation eines kleinen lokalen Magnetfeldes ausgewählte Areale von

5 mm Durchmesser innerhalb eines Zellrasens transduzieren (Weber et al., 2009). In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Methode der lokalen Transduktion *in vitro* etabliert, mit welcher lokal innerhalb eines Zellrasens eine Fläche von nur 1-2 mm² transduziert werden kann (Kilgus et al., 2012).

Theoretisch eröffnet der Einsatz von MNPs und magnetischer Felder die Möglichkeit einer lokalisierten Gentherapie. Hofmann et al. konnte eine lokale Transduktion einer Mauseorta *ex vivo* beschreiben und somit einen ersten Beweis liefern. Weitere *in vivo* Versuche zeigten, dass die Anwendung von externen Magneten zu einer veränderten Verteilung der MNPs und damit zu einem lokalisierten Gentransfer führte (Hofmann et al., 2009). Eine Voraussetzung ist die Transportmöglichkeit der MNPs mit der Blutzirkulation, wobei der Transport der MNPs von vielen Faktoren abhängig ist, wie z.B. Größe und Gestalt der MNPs, Viskosität und Temperatur des Mediums, Interaktionen zwischen MNPs sowie mit dem umgebenden Medium. Außerdem sollten die MNPs länger in der Blutzirkulation verbleiben können, ohne vom Immunsystem entfernt zu werden. Mittels Magnetresonanztomographie wurde festgestellt, dass die MNPs sehr schnell durch Phagozytose von Makrophagen aufgenommen wurden und damit nur eine Halbwertszeit im Blut von sechs Minuten hatten (Weissleder et al., 1989). Durch Oberflächenbeschichtungen wurden hierbei deutliche Verbesserungen der Halbwertszeiten erreicht, insbesondere durch den Einsatz von Polyethylenglycol (PEG) (Fee, 2007; Lipka et al., 2010). Außerdem muss für eine lokale Positionierung *in vivo* das magnetische Feld stark genug sein, um die MNPs aus der Blutzirkulation anzureichern und an der gewünschten Position halten zu können (Colombo et al., 2012).

1.3.4 Zellmarkierung mittels magnetischer Nanopartikel

Eine weitere Anwendung von MNPs liegt in der magnetischen Markierung von Zellen. Dabei werden die MNPs unabhängig von einem magnetischen Feld über Endozytose von den Zellen aufgenommen (Huth et al., 2004; Lu et al., 2007). Entsprechend der aufgenommenen Eisenmenge besitzen diese Zellen ein magnetisches Moment, das genutzt werden kann, um sie durch ein gezielt angelegtes Magnetfeld *in vitro* oder *in vivo* zu positionieren. Für die regenerative Medizin ermöglicht diese Methode einen gezielten Zellersatz. So konnten magnetisch markierte Kardiomyozyten, welche intramyokardial injiziert wurden, deutlich besser akkumulieren und folglich besser ins Gewebe integrieren, wenn für einige Minuten nach Injektion ein magnetisches Feld angelegt wurde (Cheng et al., 2012, 2010). Trueck et al. konnte mit lentiviral transduzierten und gleichzeitig mit MNPs markierten Zellen in einer *ex vivo* Perfusion einer Mauseorta durch Anlegen eines Magnetfeldes die Zellen lokal an eine Seite der Gefäßwand positionieren (Trueck et al., 2012).

2 Ziele der Arbeit

Der Einsatz von MNPs in der Medizin verspricht hohes Potential, insbesondere für lokalisierte Therapiemöglichkeiten. So war es das Ziel dieser Arbeit einen biologischen Ersatzschrittmacher *in vitro* zu generieren, wobei der Fokus auf eine lokal generierte Schrittmacheraktivität innerhalb eines Kardiomyozytenverbunds lag. Dabei wurden sowohl gentherapeutische als auch zelltherapeutische Strategien verfolgt, in denen die Vorteile der MNPs für eine Lokalisation genutzt werden sollten (Abbildung 5).

Bei der gentherapeutischen Strategie sollte ein kleiner regionaler Bereich mit residenten Zellen innerhalb eines Synzytiums transduziert werden. Dafür wurde die *in vitro* Methode der Magnetofektion weiterentwickelt. Durch Applikation speziell berechneter magnetischer Felder wurde bei systemischer Gabe von magnetischen Komplexen, bestehend aus MNPs und lentiviralen Vektoren, eine lokale Transduktion eines kleinen Bereichs ($\varnothing \sim 1$ mm) innerhalb eines Zellrasens ermöglicht. Zum Beweis einer funktionellen Schrittmachergenerierung durch lokale Transduktion eines Schrittmachergens sollte ChR2, ein licht-sensitiver Kationenkanal, verwendet werden. Dieser erlaubt durch Lichtstimulation eine Erregungsbildung in Kardiomyozyten. Für die Generierung von biologischen Schrittmachern sollten anschließend unterschiedliche Schrittmachergene identifiziert werden, deren Schrittmacheraktivität in Einzelzellen nachzuweisen war. Mit Hilfe der MEA-Technologie sollten mögliche Schrittmachergene für eine lokale Schrittmachergenerierung im Zellverbund *in vitro* untersucht werden. Da diese Versuche über mehrere Tage liefen, musste für eine genaue Analyse der Schrittmacheraktivitäten im 2-dimensionalen Zellverbund eine Methode etabliert werden, die eine Auswertung jeder einzelnen Erregung bezüglich der Ausbreitungsrichtung und Frequenz erlaubt.

Die zelltherapeutische Strategie verfolgte eine lokalisierte Zellpositionierung zur Generierung einer lokalen Schrittmacheraktivität *in vitro*. Eine Magnetisierung von Zellen erfolgte durch endozytotische Aufnahme von MNPs. Als Beweis für eine lokalisierte Schrittmachergenerierung dienten MNP-beladene und ChR2-exprimierende Kardiomyozyten, die mittels Applikation eines magnetischen Feldes auf einen HL-1 Zellrasen angereichert werden sollten. Die positionierten Zellen sollten durch Beleuchtung optisch stimuliert werden und somit funktionell als Schrittmacher operieren können.

Die in dieser Arbeit verfolgten Ziele veranschaulichen, in welcher Weise MNPs zu einer lokalisierten Therapie beitragen und wie sie in Zukunft in der Medizin eingesetzt werden könnten. Das hohe Interesse an medizinischer Nanotechnologie wird auch daran deutlich, dass diese Arbeit im Rahmen der DFG-Forscherguppe 917 „Nanoparticle-based

targeting of gene- and cell-based therapies“ durchgeführt wurde. Ein Teil dieser Arbeit konnte bereits veröffentlicht werden (Kilgus et al., 2012).

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Bakterienschüttler Excella E24	New Brunswick Scientific (Enfield, USA)
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
CO ₂ -Inkubator BINDER Serie CB	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
Durchflusszytometer CyFlow space	Partec GmbH (Münster, Deutschland)
Gefrierschränke (-20°C, -80°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen, Deutschland)
Gelelektrophoresekammer	BioRAD (München, Deutschland)
Glasperlensterilisator Steri250	Simon Keller (Burgdorf, Schweiz)
Horizontalschüttler 3006	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedde, Deutschland)
Inkubatoren BINDER Serie BD	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
LucaS EMCCD Kamera	Andor Technology (Belfast, Großbritannien)
Kühlschränke (4°C)	Liebherr (Biberach an d. Riss, Deutschland)
Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik AG (Detzel, Deutschland)
LED (LEDC5 470nm) für Makroskop Olympus MVX10	Thorlabs (Newton, USA)
LED (LEDMOD LAB 470nm/300mW) für Mikroskop Axiovert 200 M	Omicron-Laserage Laserprodukte GmbH (Rodgau-Dudenhofen, Deutschland)
LED Lichtquelle für Stereolupe Leica LED3000SLI	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Magnet (Neodym Stabmagnet Ø 30,0 x 50,0 mm N50)	magnets4you GmbH (Lohr a. Main, Deutschland)
Magnetrührer MR 3001 / MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, Deutschland)
Magnetspitzen, Magnetständer	eigene Herstellung

Makroskop Olympus MVX10 (mit MVPLAPO1x und MVPLAPO2xC Objektiven)	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
MEA1060-Inv Amplifier	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)
Mikroelektrodenarray 60ThinMEA200/30iR-ITO-pr	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 200 M	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop Observer Z1 mit Apotome	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop S8AP0	Leica (Solms, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik (Friedrichsdorf, Deutschland)
pH-Meter 765	Knick (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Gilson, Inc. (Middleton, Deutschland)
Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Polychrome V Monochromator	TILL Photonics GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
PowerLab 8/30 Datenerfassungssystem	ADInstruments GmbH (Spechbach, Deutschland)
Reinluftwerkbank HERAguard HPH4	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Spektrophotometer NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GMBH (Erlangen, Deutschland)
Stereolupe M3 und M8	Wild Heerbrugg (Heerbrugg, Schweiz)
Sterilbank HERAsafe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stickstofftank LS 6000	<i>tec-lab</i> GmbH (Taunusstein, Deutschland)
TC02 2-channel temperature controller	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)
Thermocycler TProfessional	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer MHR 23 / MHR 13	DITABIS (Pforzheim, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415D / 5415R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vakuumpumpe mit Filter	Vacuubrand (Wertheim, Deutschland)
Vortexer	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Wasserbad Typ WB 10	P-D Industriegesellschaft mbH (Dresden, Deutschland)

Weicheisen für Magnetspitzen (Armco Telar 57)	AK Steel GmbH (Köln, Deutschland)
Zentrifuge 5702 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Avanti® J-E	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge Multifuge 4KR	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich (Stuttgart, Deutschland)
Zellinkubator HERAcell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zellinkubator BINDER Serie CB	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Deckgläser 12x12 mm	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Deckgläser 25x25 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen, Deutschland)
Einfrierröhrchen CryoTube Vial 1,8 ml	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Entsorgungsbeutel	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Einwegspritzen (steril) 20 ml	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Insulinspritze Omnican 40 (1 ml)	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Objektträger Super Frost 76x26 mm	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Parafilm	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Pasteurpipetten, Glas, 150 mm	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Plastikware für die Molekularbiologie, Zellkultur und Histologie	Falcon (Gräfeling-Lochnam, Deutschland); Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland); Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, Deutschland); Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland); Qiagen (Hilden, Deutschland); Axygen (Union City, USA)
Probenbehälter aus Plastik	Vitlab (Großostheim, Deutschland)
Sterilfilter: 0,2 µm	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Zellsiebe (100 µm)	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)

3.1.3 Chemikalien und Substanzen

3.1.3.1 Chemikalien / Substanzen für die Molekularbiologie

Chemikalien und Substanzen	Hersteller
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ampicillin	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Calciumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
DEPC Wasser (DEPC-H ₂ O)	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (6x)	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham, USA)
DNA-Leiter O'GeneRuler 1 kb	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham, USA)
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ethanol (EtOH) 100%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromidlösung 1%	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glucose (≥99%)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Glycerollösung (100%)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hefeextrakt	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Hepes	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Isopropanol (2-Propanol)	VWR (Darmstadt, Deutschland)
QIAGEN® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAGEN® Plasmid Midi / Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
QIAGEN® Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumacetat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Restriktionsenzyme	Fermentas/Thermo Scientific (Waltham, USA); Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Tris-HCl	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

3.1.3.2 Chemikalien / Substanzen für die Zellkultur

Chemikalien und Substanzen	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Claycomb Medium	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Norepinephrine	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS)	PromoCell (Heidelberg, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS) (getestet für HL-1 Zellkultur: Charge F2442-500ml)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fibronektin Lösung (1mg/ml)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Gelatinepulver	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Kollagenase B	Roche (Mannheim, Deutschland)
L-Glutamin (100x)	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Mitomycin C	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Nicht essentielle Aminosäuren, MEM	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
<i>Phosphate buffered saline Dulbecco (D-PBS)</i>	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Puromycin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Soybean Trypsin Inhibitor	Gibco/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

3.1.3.3 Chemikalien / Substanzen für die Elektrophysiologie

Chemikalien und Substanzen	Hersteller
4-Aminopyridin	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Bariumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fura-2 AM	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hepes	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kalziumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3.1.3.4 Chemikalien / Substanzen für die Histologie

Chemikalien und Substanzen	Hersteller
<i>Bovine serum albumine</i> (BSA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Eselserum	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien)
FLUKA-Eindeckmedium	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Hoechst 33342	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Triton X-100	Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3.1.4 Lösungen und Puffer

3.1.4.1 Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

Puffer	Zusammensetzung
Luria-Bertani-(LB-) Medium (1x)	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) Natriumchlorid pH 7,0 einstellen, autoklavieren
Luria-Bertani-(LB-) Agar	2% Agar (w/v) in 1x LB-Medium

100 mg/ml Ampicillin-Stammlösung	1 g Ampicillin in 10 ml ddH ₂ O Endkonzentration 100 µg/ml
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	242 g Tris Pulver 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit ddH ₂ O auf 1 L auffüllen
Puffer 1	15 mM Tris, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer 2	200 mM Natriumhydroxid 1% SDS (w/v)
Puffer 3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

3.1.4.2 Lösungen und Puffer für die Zellkultur / Histologie

Puffer	Zusammensetzung
DPBS	2,67 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 137,93 mM NaCl 8,06 mM Na ₂ HPO ₄
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

3.1.4.3 Lösungen und Puffer für die Elektrophysiologie

Puffer	Zusammensetzung
Externe Perfusionslösung	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 1,8 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 10 mM Glukose, pH 7,4

Externe Perfusionslösung für Messungen des I_f	140 mM NaCl 5,4 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 1,8 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 10 mM Glukose 1,4 mM BaCl ₂ 2 mM 4-Aminopyrridin pH 7,4
Interne Lösung für Messungen des I_f	12 mM NaCl 10 mM HEPES 2 mM MgATP 10 mM EGTA 0,1 mM NaGTP 130 mM K-Aspartat pH 7,2

3.1.5 Zellkulturmedien und Zusätze

3.1.5.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Bezeichnung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
15% DMEM	Kultivierung von HEK293 Zellen	15% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol
10% Claycomb	Kultivierung von HL-1 Zellen	10% (v/v) FKS (getestet für HL-1) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM Norepinephrine 2mM L-Glutamine
20% IMDM	Kultivierung von - ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten - embryonalen Kardiomyozyten	20% (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 0,1 mM NEAA 0,1 mM β-Mercaptoethanol

3.1.5.2 Zellkulturzusätze und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1% Gelatine-Lösung	1 g Gelatine in 100 ml PBS autoklavieren
0,1% Gelatine-Lösung	1% Gelatine 1:10 mit PBS verdünnen
0,02% Gelatine/Fibronectin-Lösung	0,1 g Gelatine in 500 ml PBS autoklavieren Zugabe 1/200 Fibronectin
Fibronectin-Lösung	10 µg/ml Fibronectin in DPBS
Einfriermedium für HL-1 Zellen	10% DMSO (v/v) in FKS (getestet für HL-1)
Soybean Inhibitor	25 mg Soybean Trypsin Inhibitor in 100 ml PBS lösen und sterilfiltrieren
Waschmedium für HL-1 Zellen	5% (v/v) FKS (getestet für HL-1) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Epinephrine Lösung (10 mM)	30 mM Ascorbinsäure 10 mM Norepinephrine sterilfiltrieren
Puromycin Stammlösung (5 mg/ml)	100 mg in 20 ml DMEM lösen und sterilfiltrieren Endkonzentration 10 µg/ml
Kollagenase-Lösung	1 mg/ml Kollagenase B (Fa. Roche) 10 mM CaCl ₂
Kalzium-Lösung	120 mM NaCl 5,4 mM KCl 5 mM MgSO ₄ *7H ₂ O 5 mM Natrium-Pyruvat 20 mM Taurin 10 mM Hepes 20 mM Glukose pH 6,9, in destilliertem Wasser sterilfiltrieren und bei 5°C gelagert.
Mitomycin C Lösung	Stocklösung: 0,4 mg/ml Mitomycin C in destilliertem Wasser sterilfiltrieren (Endkonzentration: 10 µg/ml)

3.2 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Hersteller
HL-1	Herzmuskelzelllinie abgeleitet aus adulten atrialen Herzmuskelzellen der Maus	Zur Verfügung gestellt von W. C. Claycomb (New Orleans, USA) (Claycomb et al., 1998)
HEK293-FT-Zellen	<i>human embryonic kidney</i> (HEK) Zellen mit einer Neomycinresistenz unter dem SV40 large T-antigene Promotor	ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, USA

3.3 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
Mach1™-T1R E.coli (ATCC #9637, S.A. Waksman)	Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)

3.4 Lentivirale Vektoren

In dieser Arbeit wurden für Transduktionsexperimente selbst inaktivierende (SIN), VSV.G pseudotypisierte Lentiviren der dritten Generation verwendet, welche auf dem lentiviralen rrl-Vektor basieren. Bei diesem lentiviralen Konstrukt liegt der Transgentransfervektor getrennt von den Vektoren mit den Verpackungskonstrukten (pMDL/pRPE, RSV-rev, pMD.G) vor. Alle lentiviralen Konstrukte wurden von der Arbeitsgruppe Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) nach bekanntem Protokoll (Pfeifer and Hofmann, 2009) produziert und zur Verfügung gestellt. Verwendete Verpackungskonstrukte und Transgentransfervektoren sind folgend aufgeführt.

Verpackungskonstrukte

- pMDLg/pRPE
Expression der HIV-Gene *gag* und *pol* unter Kontrolle des Promoters des Cytomegalie-Virus (CMV).
- RSV-rev
Expression des *regulator of expression of virion proteins* (*rev*) unter Kontrolle des Promoters des Rous-Sarkom-Virus (RSV).
- pMD.G
Expression des Hüllproteins (*env*) VSV.G unter Kontrolle des CMV-Promoters.

Transgentransfervektoren

Mit Ausnahme des Transgentransfervektors pRRL-CMV-GFP, welche von der Arbeitsgruppe Pfeifer freundlicherweise zu Verfügung gestellt wurde, sind die folgenden Transgentransfervektoren selbstständig in der hier vorliegenden Arbeit kloniert worden.

- pRRL-EF1 α -Chr2-EYFP (siehe 4.2.1)
- pRRL-EF1 α -HCN4-GFP (siehe 4.3.1.1)
- pRRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-GFP (siehe 4.3.2.1)
- pRRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-GFP (siehe 4.3.3.1)
- pRRL-CMV-Tbx18-IRES-GFP (siehe 4.3.4.1)

Nach Herstellung der Lentiviren wurde der physikalische (Viruspartikel/ml) und der biologische Titer (infektiöse Partikel/ml) durch die Arbeitsgruppe Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) bestimmt, damit eine genaue Anzahl an Viren eingesetzt werden konnte.

Tabelle 1: Übersicht der hergestellten Lentiviren (durch die Arbeitsgruppe Pfeifer), die in dieser Arbeit verwendet wurden

Produzierte Lentiviren	Physikalischer Titer [VP/ml]	Biologischer Titer [IP/ml]	Verhältnis VP:IP
RRL-CMV-eGFP	zwischen 1,00E+11 1,00E+10	zwischen 6,84E+09 1,80E+09	zwischen 5 und 30
RRL-EF1 α -Chr2-eYFP	6,93E+10 3,02E+10	4,84E+09 4,88E+09	14,3 6,2
RRL-EF1 α -HCN4-eGFP	5,04E+10	1,00E+09	50,4
RRL-EF1 α -mHCN2(E324A)- IRES-eGFP	7,07E+10 4,58E+10	7,09E+08 5,71E+08	99,7 80,2
RRL-EF1 α -Kir21AAA-IRES- eGFP	1,12E+11 8,53E+09	1,64E+09 4,88E+08	68,3 17,5
RRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP	9,11E+10	5,98E+08	152,3

3.5 Magnetische Nanopartikel

Alle in dieser Arbeit verwendeten magnetischen Nanopartikel wurden innerhalb des DFG Projekts 917 durch Dr. Olga Mykhaylyk in der Arbeitsgruppe Plank (Institut für

Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) entwickelt und charakterisiert (Mykhaylyk et al., 2012, 2010, 2007; Tresilwised et al., 2012, 2010). Generell handelt es sich um Nanopartikel vom *core-shell-type*, deren Kern aus Magnetit (Eisen(II,III)oxid) besteht. Vorversuche von C. Trueck der Arbeitsgruppe Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) zeigten, dass sich die Nanopartikel PEI-Mag2 und SO-Mag5 besonders für die Transduktion von Kardiomyozyten eignen (Dissertation von C. Trueck). Im Vergleich besitzt SO-Mag5 zu PEI-Mag2 ein größeres magnetisches Moment, was für eine lokalisierte Anwendung von Vorteil ist (Trueck et al., 2012). Ferner wurde SO-Mag5 bereits sehr aussichtsreich innerhalb dieser Arbeitsgruppe (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) verwendet (z.B. bei Arbeiten von S. Vosen zur radialsymmetrischen Transduktion von Gefäßwänden). Für alle Versuche in der hier vorliegenden Arbeit wurde SO-Mag5 und teilweise PEI-Mag2 verwendet. In Tabelle 2 werden die wichtigsten physikalischen Eigenschaften beider MNPs zusammengefasst.

Tabelle 2: Eigenschaften der magnetischen Nanopartikel

	SO-Mag5	PEI-Mag2
Kerndurchmesser [nm]	7 ($d_{\text{TEM}}: 6,7 \pm 1,5$)*	9 ($d_{\text{TEM}}: 10,2 \pm 2,2$)*
Hüllschicht	Siliziumoxid mit Phosphonatgruppen an der Oberfläche	Fluoriertes Tensid (ZONYL FSA) mit Polyethylenimin (25 kDa, verzweigt)
Elektrokinetisches Potential [mV]	- 38 ± 2 (in Wasser) - $9,2 \pm 0,4$ (in HBSS ^{+/+})	+ $55,4 \pm 1,6$ (in Wasser) + $13,4 \pm 1$ (in HBSS ^{+/+})
Hydrodynamischer Durchmesser der Partikel in wässriger Lösung [nm]	40 ± 14	63 ± 36
Sättigungsmagnetisierung M_s [$\text{A m}^2/\text{kg}$ (Fe)]	94	62
Magnetisches Moment der Partikel m_{eff} [A m^2]	$3,3 \times 10^{-19}$	$8,7 \times 10^{-20}$
Publikationen	(Mykhaylyk et al., 2012)	(Mykhaylyk et al., 2010, 2007; Tresilwised et al., 2010)

(*durchschnittlicher Kerndurchmesser ermittelt per Transmissionselektronenmikroskopie)

3.6 Verwendete Programme

Bezeichnung	Hersteller / Firma
Axio Vision Release 4.8	Zeiss (Jena, Deutschland)
LabChart 7 Software	AD-Instruments (Newton, USA)
CorelDRAW Graphics Suite X5	Corel Corporation (München, Deutschland)
Microsoft Office 2003/2010	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
ImageJ	Wayne Rasband, National Institute of Mental Health (Bethesda, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
OriginPro 8G	OriginLab Corporation (Northampton, USA)
MC Rack	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)

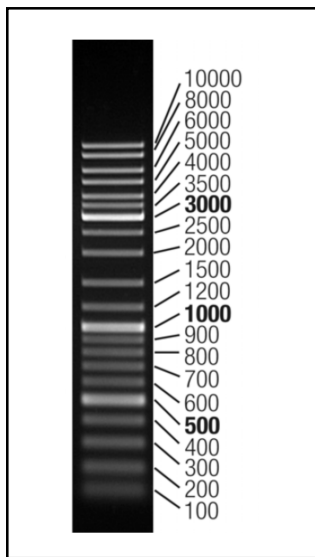
3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Gelelektrophorese (DNA-Agarose Gelelektrophorese)

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren nach molekularer Größe diente die Gelelektrophorese. Hierbei macht man sich die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Nukleinsäuren zunutze, welche aufgrund dessen im elektrischen Feld von der negativen zur positiven Elektrode wandern. Eine Auftrennung erfolgt dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Das bedeutet, dass kleinere Fragmente wesentlich schneller durch das Gel wandern als größere. Einflussfaktoren für die Wandergeschwindigkeit sind die vorliegende Konformation der DNA, die Matrixdichte (Prozentigkeit des Agarosegels) und die elektrische Feldstärke.

Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele gegossen, da die aufzutrennenden DNA-Fragmente meistens im Kilobasenbereich lagen. Für ein Gel wurde die entsprechende Menge Agarose in 1xTris-Acetat-Puffer-Puffer (TAE) gelöst (1 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer) und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Dabei sollte sich die Agarose vollständig lösen und keine Schlieren mehr ziehen. Nach Abkühlung des Gemisches auf ca. 50-60°C wurde Ethidiumbromid hinzugefügt (0,5 µl/ 10 ml Gel), bevor es möglichst luftblasenfrei in eine passende Gelkammer mit Probenkamm gegossen wurde und polymerisieren konnte. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der sein Absorptionsspektrum bei Einlagerung in die DNA verändert und dadurch nach Anregung mit ultravioletten Licht sichtbar wird (Waring, 1965). Nach Polymerisation konnte das Gel

verwendet werden. Dazu wurde Gelkammer mit Gel in einer Elektrophoresekammer platziert und vollständig mit 1xTAE-Puffer bedeckt. Nach Entfernen des Gelkamms konnten die einzelnen Gelkammern



mit DNA-Proben (20-500 ng/Tasche) beladen werden. Diese wurden zuvor mit 1/6 Volumen 6x Ladepuffer gemischt, welcher erstens beim Pipettieren des DNA-Gemischs hilft und zweitens während der Elektrophorese eine Lauffront bildet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 5-8 V pro cm Elektrodenabstand und dauerte durchschnittlich 60 Minuten.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurde für jedes Gel ein 1 kb Marker (O'GeneRuler, Fermentas) aufgetragen, welcher bekannte Fragmente eines bestimmten

Abbildung 4: DNA-Leiter Molekulargewichts enthält (Abbildung 4).

3.7.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für einige Klonierungen benötigte man nach einer DNA-Restriktion bestimmte Fragmente aus dem Gemisch. Dazu wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Bestrahlung war möglichst kurz zu halten, um DNA Schäden zu vermeiden. Für eine anschließende Gelextraktion wurde das QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagene) verwendet, wobei das beiliegende Protokoll eingehalten wurde. Die Elution der DNA erfolgte in 30 µl Reinstwasser.

3.7.3 Restriktion von Nukleinsäuren

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die bestimmte Bereiche der DNA (so genannte Restriktionsschnittstellen) erkennen und schneiden können, indem sie die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden mittels Hydrolyse spalten. Solche Reaktionen wurden dazu verwendet, Plasmide zu linearisieren oder in verschiedenen große Fragmente zu zerlegen (Nathans and Smith, 1975). Für Restriktionen von Plasmiden wurden ausschließlich Enzyme des TypII verwendet. Diese schneiden palindromische Erkennungssequenzen von einer Länge von vier bis sechs Basenpaaren mit glatten (*blunt-end*) oder überhängenden (*sticky-end*) Schnittenden.

Die Restriktionsansätze wurden nach Angaben des Herstellers MBI Fermentas zusammengestellt. Es wurden zwischen 0,5 bis 5 µg DNA-Probe pro Restriktion eingesetzt, mit entsprechenden Enzym (3 U/1000 ng DNA) und 2 µl 10x-Puffer gemischt,

bevor es mit Reinstwasser auf 20 µl aufgefüllt wurde. Die meisten Restriktionen wurden bei 37°C für zwei bis fünf Stunden durchgeführt. Ein Reaktionsstopp erfolgte durch eine 20 minütige Denaturierung bei 70°C.

Oftmals konnten Doppelrestriktionen angesetzt werden, bei welchen die Probe gleichzeitig mit zwei Enzymen geschnitten wurde. Dadurch konnte jeweils ein Aufreinigungsschritt vermieden werden. Zusätzliche Informationen und Hinweise dazu wurden auf der Homepage von Fermentas entnommen¹.

3.7.4 Klenow-Auffüllung

Bei Klonierungen versucht man den Vektor und die einzubringende DNA mit kompatiblen Restriktionsenzymen zu behandeln. In manchen Fällen ist dies jedoch nicht möglich, so dass die Möglichkeit besteht einzelsträngige Nukleotidüberhänge in glatte Schnittenden umzuwandeln. Dies kann mit dem Klenow-Fragment geschehen, einem Proteinfragment der DNA-Polymerase I mit 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und einer 5'-3'-DNA-Polymerase-Aktivität. Dadurch ist es in der Lage einzelsträngige Schnittenden mit Nukleosidtriphosphaten aufzufüllen. Folgend ist ein Reaktionsansatz dargestellt, welcher für 15 min bei 37°C inkubiert. Eine Inaktivierung erfolgte bei 75°C für 10 min.

Bestandteil	Volumen (für 30 µl)
Reaktionsansatz (max. 5µg DNA)	20 µl
10x Klenow-Puffer	3 µl
dNTPs (2,5 mM pro Nukleosid)	1 µl
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (10 U/µl)	1 µl
Reinstwasser	5 µl

3.7.5 Dephosphorylierung von DNA

Bei Klonierungsversuchen besteht die Gefahr, dass der linearisierte Vektor glatte Enden oder Nukleotidüberhänge mit gleicher Überlappungssequenz besitzt. Bei einer Ligation kann dies zu einer unerwünschten Religation des Vektors führen, was die Ausbeute für neue rekombinierte Plasmide deutlich minimiert. Um solche Religationen zu vermeiden, werden die 5'-Phosphatgruppen des Vektor-DNA mit der Shrimp Alkaline Phosphatase

¹ <http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html>

(SAP) mittels Hydrolyse abgespalten. Die Klonierungen werden dadurch deutlich effizienter.

Die SAP ist in allen Restriktionspuffern aktiv, so dass im Anschluss eines Restriktionsverdau direkt 1 µl SAP zum Ansatz pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Eine Hitzeinaktivierung erfolgte bei 65°C für 15 min.

3.7.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen von DNA-Fragmenten in einen linearisierten Expressionsvektor wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym verknüpft zwei DNA-Fragmente über eine Phosphodiesterbindung zwischen der 3'Hydroxylgruppe und dem 5'Phosphatende. Dabei können sowohl glatte Enden (*blunt-ends*) als auch überhängende Enden (*sticky ends*) der Fragmente verbunden werden. Als Co-Faktor liegt der Ligase genügend Adenosin-triphosphat (ATP) bei.

In einem Ligationsansatz wurden ungefähr 100 ng der Vektor-DNA eingesetzt. Für eine hohe Effizienz sollte außerdem das Größenverhältnis der DNA-Fragmente beachtet und das Insert:Vektor Verhältnis (bezogen auf die Moleküle) von 3:1 eingehalten werden. Die Berechnung der entsprechenden Menge an Insert geschah nach folgender Gleichung:

$$\text{Menge}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = \text{Menge}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \times \frac{\text{Fragmentlänge}_{\text{Insert}} [\text{kb}]}{\text{Fragmentlänge}_{\text{Vektor}} [\text{kb}]} \times 3$$

Im nachfolgenden Schema ist ein Ligationsansatz dargestellt. Der Zusatz von Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000) wurde nur bei *blunt-end* Ligationen hinzugegeben, da dies die Viskosität des Ansatzes erhöht, so dass sich die DNA-Fragmente einfacher finden und verknüpfen können.

Bestandteil	Volumen (für 20 µl)
10x Ligase Puffer	2 µl
DNA-Fragment (Insert)	x µl
Vektor-DNA	y µl
PEG4000 (nur bei Blunt-End Ligation)	2 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
Reinstwasser	ad 20 µl

Alle Ligationen sowie Ligationskontrollen ohne Insert-Fragment inkubierten über Nacht bei 16°C, um am darauffolgenden Tag in Bakterien transformiert zu werden (3.7.7). Die Ligationskontrollen waren stets sinnvoll, um feststellen zu können, welchen Anteil der gewachsenen Kolonien auf den Agarplatten wahrscheinlich auf Religation des Vektors beruhen.

3.7.7 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Zellen

Für eine Transformation, also das Einbringen fremder DNA in ein Bakterium, wurden kompetente *E.coli* Zellen vom Stamm Mach1™-T1^R verwendet. Dafür wurde ein Aliquot mit 50 µl kompetenter Zellen (5 M CaCl₂) auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 5 µl Ligationsansatz bzw. maximal 50 ng Plasmid versetzt. Einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Dies bewirkte ein Öffnen der Zellmembranen und somit die Aufnahme des Plasmid. Der Ansatz wurde für weitere zwei Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl SOB-Medium versetzt und der Ansatz bei 37°C für 45 min unter Schütteln (400 rpm) inkubiert. Während dieser Zeit konnten die transformierten Bakterien die auf den Plasmiden befindlichen Antibiotikaresistenzen (Kanamycin oder Ampicillin) ausbilden. Im Anschluss wurden 100 bis 200 µl des Ansatzes auf vorgewärmte LB-Agar Platten ausplattiert. Eine Selektion erfolgte mit Hilfe der LB-Agar Platten, die ein Antibiotikum enthielten (100 µg/ml), so dass nur erfolgreich transformierte Bakterien überlebten, die eine auf dem Plasmid enthaltene Resistenz ausbilden konnten. Die LB-Agar Platten inkubierten über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank.

Zur Vermehrung einzelner Kolonien wurden Suspensionskulturen in LB-Medium (~5 ml) mit entsprechenden Antibiotikum angelegt, welche bei 37°C für 8 bis 16 Stunden geschüttelt wurden (220 rpm).

3.7.8 Langzeitlagerung von Bakterienkulturen

Zur Konservierung und Langzeitlagerung von (transformierten) Bakterienkulturen wurden 850 µl einer Bakteriensuspension mit 150 µl Glycerollösung (100%) gemischt und in Einfrierröhrchen bei -80°C eingefroren.

Zur erneuten Anzucht genügte bereits eine geringe Menge der gefrorenen Bakterienkultur. Mit einer sterilen Impföse wurde die Bakterienkultur ein wenig angeschabt und auf einer LB-Agar Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden Einzelkolonien wieder in eine Suspensionslösung aufgenommen.

3.7.9 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für eine einfache Plasmidisolierung wurden die Bakterien einer 2 ml Übernachtskultur bei 9000 x g abzentrifugiert und das Zellpellet in 250 µl Puffer 1 gelöst. Dieser war RnaseH beigemischt, um RNA Verunreinigungen zu entfernen. Die weitere Zugabe von Puffer 2 führte zur Lyse der Bakterien. Die freiwerdenden Proteine denaturierten und assoziierten mit der genomischen DNA. Nach einer kurzen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von Puffer 3, welcher den Ansatz neutralisierte, so dass ausschließlich DNA-Plasmide renaturieren konnten. Durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt für 10 min (11000 x g) wurden die Zellreste und Proteine mit assoziierter DNA pelletiert. Der Überstand inklusiver der enthaltenen Plasmid-DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und zwei Volumenanteilen absoluten Ethanol konnten die Plasmide gefällt werden. Es folgte ein längerer Zentrifugationsschritt (13000 x g, 20 min, 4°C), bevor der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 70%igen Ethanol gewaschen wurde. Nach erneuter Zentrifugation (13000 x g, 5 min, 4°C) wurde das Plasmid-Pellet für ca. 10 min an der Luft getrocknet und schließlich in 30 µl Reinstwasser resuspendiert.

3.7.10 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Für eine präparative Isolierung von Plasmid-DNA aus Suspensionslösungen standen je nach gewünschter DNA-Ausbeute verschiedene Kits der Firma QIAGEN („QIAGEN® Plasmid Maxi Kit“, „QIAGEN® Plasmid Midi Kit“, „QIAGEN® Plasmid Mini Kit“) zur Verfügung, welche strikt nach Protokoll des Herstellers verwendet wurden. Alle funktionieren nach demselben Prinzip, indem die Zellen zuerst mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und die Plasmide mittels Säulenchromatographie aufgereinigt werden.

3.7.11 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt die einfachste und schnellste Methode dar, um einen gewünschten DNA-Abschnitt exponentiell und millionenfach zu amplifizieren (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Prinzipiell beruht die Methode auf der *in vitro*-Synthese von doppelsträngiger DNA, bei der DNA-Polymerasen freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) komplementär zum Matrizenstrang über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpfen. Da keine *de novo* Synthese des komplementären Stranges möglich ist, müssen die Basensequenzen der beiden Enden des zu amplifizierenden Bereichs bekannt sein, um entsprechende Oligonukleotide (Primer) als Startermoleküle herzustellen. Diese binden sequenzspezifisch und liefern somit ein freies

3'OH-Ende für den Anbau der dNTPs. Zusätzlich können diese Primer noch mit Schnittstellen versehen werden, so dass die Amplifikate im späteren Verlauf mit Restriktionsenzymen geschnitten werden und für weitere Klonierungen genutzt werden können. Für die Auffüllung mit dNTPs wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase I aus thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) verwendet, die nach mehreren Denaturierungsschritten von 94°C immer noch aktiv bleibt und somit während einer ganzen PCR-Reaktion arbeiten kann.

Eine Standard-PCR Reaktion besteht aus ca. 35 sich wiederholenden Amplifikationsschritten, so dass theoretisch nach einer PCR-Reaktion 2^{35} Amplifikate entstehen können. Ein Amplifikationszyklus startet mit einem Denaturierungsschritt von 94°C, wodurch alle Nukleotidstränge voneinander getrennt werden. Die Einzelstränge sind für die Primer zugänglich, die komplementär anlagern. Dieses so genannte Annealing erfolgt bei Temperaturen zwischen 50 bis 65°C. Erst dann kann die Polymerase ausgehend vom 3'OH-Ende des Primers den komplementären Strang synthetisieren. Dieser letzte Elongationsschritt erfolgt aufgrund des Temperaturoptimums der Taq-Polymerase bei 72°C und dauert meist 45 bis 90 Sekunden, entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes (ca. 1.000 Basen pro Minute).

3.7.12 DNA-Aufreinigung

Einige molekularbiologische Arbeitsschritte (wie z.B. PCR, Restriktion) erfordern eine Aufreinigung der DNA von Enzym- und Primerresten, überschüssigen dNTPs sowie Salzen der Pufferlösungen, damit die Reste die weiteren Arbeiten nicht stören. Dafür dienen entsprechende Kits (QIAGEN DNA Purification Kit), welche die DNA mittels Säulenchromatographie aufreinigen. Dabei wurde das beiliegende Protokoll strikt eingehalten.

3.8 Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen bei 5% CO₂, 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit in dafür geeignete Inkubatoren gehalten. Vor Verwendung wurden alle Medien und Zusätze im Wasserbad auf 37°C erwärmt und Arbeiten wurden ausschließlich in dafür vorgesehenen Sterilbänken vorgenommen.

3.8.1 Kultivierung von HL-1 Kardiomyozyten

Die HL-1 Zellen sind eine Kardiomyozyten-Zelllinie, welche von adulten atrialen Herzmuskelzellen der Maus abgeleitet sind und von W. C. Claycomb (New Orleans, USA) zur Verfügung gestellt wurden (Claycomb et al., 1998). Diese Kardiomyozyten besitzen die Fähigkeit zu Kontraktion und zeigen auch nach mehreren Passagen vergleichbare kardiale morphologische, biochemische und elektrophysiologische Eigenschaften. Die HL-1 Zelllinie wurde in 0,02% Gelatine/Fibronektin beschichteten 25 cm²-Zellkulturflaschen gehalten. Bei Erreichen einer Konfluenz von über 90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, 3 ml Trypsin hinzugegeben, welches nach ca. 30 Sekunden wieder verworfen wurde. Mit frischen 1,5 ml Trypsin wurden die Zellen für 4-6 min im Inkubator abgelöst. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Soybean-Trypsin Inhibitor Lösung wurde die Reaktion abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die 25 cm²-Zellkulturflasche wurde einmal mit ca. 4 ml Waschmedium nachgespült, um restliche Zellen aufzunehmen und ebenfalls ins Zentrifugenröhrchen zu geben. Die gesamte Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur (RT) für 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 1 ml Claycomb Medium (siehe 3.1.5.1) resuspendiert. Reine Erhaltungskulturen wurden 1:2 oder 1:3 gesplittet und weiterkultiviert. Ansonsten wurde mit einer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und die Zellen entsprechend auf MEAs, Ø 25 mm oder Ø 12 mm Plättchen, 6well- oder 24well-Zellkulturplatten ausgesät. Diese waren entweder mit Fibronektin-Lösung oder 0,02% Gelatine/Fibronektin-Lösung beschichtet.

3.8.2 Kryokonservierung: Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen (siehe Kapitel 3.8.1) gelöst, zentrifugiert und gezählt. Entsprechende Zellmengen wurden in Einfriermedium resuspendiert (2×10^6 Zellen/0,5ml), bevor sie in Kryoröhrchen mit je 0,5 ml Inhalt aliquotiert und in passenden Einfrierbehältern bei -80°C eingefroren wurden. Am darauf folgenden Tag erfolgte für eine Langzeitlagerung die Überführung in Stickstofftanks.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen für 2 min im Wasserbad erwärmt, bevor die Zellen in 6 ml vorgewärmtes Medium aufgenommen und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und auf 25 cm²-Flaschen ausgesät.

3.8.3 Kultivierung von ES-Zell-abgeleiteten und aufgereinigten Kardiomyozyten

Murine ES-Zell abgeleitete und mit Puromycin aufgereinigte Kardiomyozyten wurden nach bekanntem Protokoll hergestellt (Kolossoff et al., 2006). Nach erfolgreicher Dissoziation wurden sie freundlicherweise von Stefanie Friedrichs (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Bei Bedarf konnten auch kryokonservierte Kardiomyozyten aufgetaut werden (siehe Kapitel 3.8.2). Zur besseren Aufreinigung wurden diese weitere zwei bis drei Tage mit Puromycin gehalten.

3.8.4 Generierung einer ChR2 exprimierenden HL-1 Zelllinie

Zur Generierung einer transgenen HL-1 Zelllinie mit ChR2-Expression wurden native HL-1 Zellen über Nacht mit ChR2-eYFP-Lentiviren (MOI: 25) transduziert. Um eine möglichst hohe Zellpopulation mit positiv transduzierten Zellen (> 90%) zu erhalten, mussten die Zellen zweimal durch Expansion und anschließender Zellsortierung aufgereinigt werden. Dazu diente die Methode der Durchflusszytometrie. Nach erfolgreicher Expansion wurden die Zellen nach Standardprotokoll mit Trypsin gelöst (siehe Kapitel 3.8.1) und eine Einzelzellsuspension in PBS hergestellt. Im Durchflusszytometer CyFlow space (Partec GmbH, Münster, Deutschland) wurde aus der lebenden Zellpopulation, die eYFP-positiven Zellen aussortiert, wobei als Negativkontrolle native HL-1 Zellen dienten. Die aussortierten eYFP-positiven Zellen wurden gesammelt. Nach Zentrifugation (5 min, 1000 rpm) wurde das Zellpellet in HL-1 Medium resuspendiert und für eine weitere Kultivierung in Zellkulturflaschen ausgesät. Eine genaue Datenanalyse der Zellsortierung erfolgte mit der Software Flow Jo 7.5.

3.8.5 Präparation embryonaler (primärer) Kardiomyozyten der Maus

Zur Gewinnung embryonaler Kardiomyozyten wurden Mäuse des Stammes CD1 im embryonalen Stadium von E13 bis E15 verwendet. Dafür wurden schwangere Muttertiere vorschriftsmäßig mittels zervikaler Dislokation getötet und desinfiziert. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und der Uterus an den beiden Uterushörnern herausgetrennt. Eingelegt in eiskalten PBS wurden die Embryonen von Plazenta und Amnion (Fruchtblase) befreit und anschließend dekapitiert. So konnten die embryonalen Herzen frei präpariert und mit einer Federschere zerkleinert werden. Die Herzstücke wurden in 0,75 ml Kollagenase B Lösung eingelegt, in der sie für 30 min bei 37°C inkubiert und bei 400 rpm geschüttelt wurden. Zwischendurch waren die Röhrchen zu invertieren, um Gewebeverbände aufzulockern. Danach wurden die Zellen kurz abzentrifugiert (3 min, 1000 rpm) und die Kollagenase

vorsichtig entfernt. Die Zellen wurden nach Resuspension in 20% IMDM über ein 100 µm Zellsieb gegeben, welches gründlich mit Medium nachgespült wurde. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, 1000 rpm), bevor die Zellen mittels Zählkammer ausgezählt und auf Fibronectin beschichteten Glasplättchen (Ø 12 mm) ausgesät wurden. Da die isolierten Kardiomyozyten bis zu vier Tagen in Kultur gehalten werden mussten, war es notwendig ein Überwachsen aufgrund sich teilender Fibroblasten zu verhindern, welche sich unter den präparierten Zellen befanden. Dafür wurden die Zellen zwei Tage nach Isolation mit Mitomycin C behandelt (siehe Kapitel 3.8.6).

3.8.6 Hemmung der Zellproliferation

Für einige Versuche musste eine weitere Zellproliferation gestoppt werden, da Einzelzellen vereinzelt bleiben sollten oder aber ein vollständig gekoppeltes Zellsynzytium aus Kardiomyozyten nicht überwachsen durfte.

Um das Zellwachstum zu hemmen, wurde das Zytostatika Mitomycin C verwendet. Dieses interkaliert zwischen den DNA-Strängen, die folglich kovalent miteinander verknüpfen. Dadurch ist eine Replikation und Zellteilung nicht mehr möglich. Mitomycin C wurde in Reinstwasser in einer Konzentration von 0,4 mg/ml gelöst, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Bei Bedarf wurden es 1:40 mit PBS oder Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben (Endkonzentration: 10 µg/ml). Es folgte eine Inkubation von zwei bis drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, bevor sie mit frischem Medium weiter kultiviert wurden.

Mitomycin C ist ein starkes Zytostatikum, wodurch eine Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften erfolgte.

3.8.7 Lokale lentivirale Transduktion von HL-1 Zellen mittels MNPs

Für lokale Transduktionsexperimente wurden HL-1 Zellen in entsprechender Zellzahl auf MEAs (200.000 Zellen) oder Ø 25 mm Glasplättchen (350.000 Zellen) ausgesät. Sobald ein konfluenter Zellrasen aus HL-1 Zellen ausgebildet war (ca. 80% auf Ø 25 mm Glasplättchen und 100% auf MEAs), konnte eine lokale Transduktion vorgenommen werden. Dafür wurden zuerst MNP/LV-Komplexe gebildet, indem MNPs und Lentiviren in einem Verhältnis von 200 fg Fe/VP gemischt und bei RT für 20 min in HBSS^{+/+} inkubiert wurden (Abbildung 5A). Bei diesen Verhältnis waren fast 100% der Viren an MNPs gebunden (Trueck et al., 2012). Anschließend wurden die MNP/LV-Komplexe in einem Volumen von 500 µl HBSS^{+/+} zu den HL-1 Zellen gegeben. Darin waren je nach MNP entweder 1,2 bis 2 µg Eisen (entspricht: 6x10⁶ bis 10⁷ Viruspartikel) bei SO-Mag5 oder 0,5 bis 0,6 µg Eisen (entspricht: 2,5x10⁶ bis 3x10⁶ Viruspartikel) bei PEI-Mag2 enthalten. Für

eine lokale Transduktion wurde die Magnetspitze direkt unterhalb der MEAs oder Glasplättchen platziert. Der ganze Aufbau wurde für 30 min bei RT auf einen Horizontalschüttler bei ca. 120 rpm geschüttelt, um eine bessere Verteilung der MNP/LV-Komplexe zu garantieren (Abbildung 5C, D). Nach dieser Inkubationszeit wurden die Lösung mit den MNP/LV-Komplexen abgenommen und die Zellen wurden einmal mit HBSS^{+/+} gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Medium im Inkubator gehalten. Kontrollversuche wurden ohne Applikation eines magnetischen Feldes durchgeführt.

Reduktion der einzusetzenden Eisenmenge:

In einigen MEA-Langzeitversuchen mit SO-Mag5 wurde das Verhältnis auf 50 fg Fe/VP verringert, um die einzusetzende Gesamtmenge an Eisen zu reduzieren. Hierbei waren immerhin noch rund 50% der Viren gebunden (Trueck et al., 2012). Pro Versuch kamen 0,22 µg Eisen (entspricht: $4,4 \times 10^6$ Viruspartikel) zum Einsatz. Eine Gesamtübersicht ist in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: Übersicht der unterschiedlich eingesetzten Eisenmengen

MNP	Eingesetzte Eisenmenge/Versuch [µg Fe/Versuch]	Komplexbildung [fg Fe/VP]	Viruspartikel (physikalische)
SO-Mag5	1,2 bis 2	200	6×10^6 bis 10^7
SO-Mag5	0,22	50	$4,4 \times 10^6$
PEI-Mag2	0,5 bis 0,6	200	$2,5 \times 10^6$ bis 3×10^6

Analyse einer lokalisierten Transduktion:

Die Analyse zur radialsymmetrischen eGFP-Verteilung nach einem lokalen Transduktionsexperiment erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ und den Erweiterungsmodul „Radial Profile Plot Analysis“ (siehe Kapitel 4.1.1).

3.8.8 Magnetisierung von Zellen mit MNPs

Zur Magnetisierung von Zellen wurden diese über Nacht mit SO-Mag5 beladen. Hierfür wurden SO-Mag5 Partikel einfach zum Zellmedium in einem standardmäßigen Verhältnis von 200 pg Eisen/Zelle gegeben und die Zellen am Folgetag mit PBS gewaschen.

Um eine Magnetisierung der Zellen zu testen, wurden die Kardiomyozyten mit verschiedenen Eisenmengen von 25 bis 400 pg Eisen/Zelle beladen. Zur Auszählung

magnetisierter Zellen wurde ein spezielles Magnettrack verwendet (siehe Abbildung 37A), mit welchen die Zellen mit ausreichender Magnetisierung innerhalb von 15 min an der Magnetseite lokalisiert wurden und nicht beladene Zellen sich am Boden absetzten. Beide Fraktionen wurden voneinander getrennt und ausgezählt, um den Anteil an magnetisierten Zellen zu ermitteln.

3.8.9 Lokale Positionierung von MNP-markierten Kardiomyozyten

Zur lokalen Positionierung wurden ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten verwendet, welche zuvor mit SO-Mag5 (200 pg Fe/Zelle) beladen wurden (Abbildung 5B). Nach Entfernung des Medium wurden die beladenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und für drei bis fünf Minuten mit Trypsin bei 37°C abgelöst. Anschließend wurde die Reaktion mit 20% IMDM gestoppt und die Zellsuspension bei RT für 5 min mit 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS oder 20% IMDM resuspendiert und die Zellanzahl bestimmt. Für eine lokale Anreicherung genügten 5.000 bis 10.000 Zellen, die in 500 bis 800 µl PBS verdünnt auf ein MEA gegeben wurden. Zur lokalen Positionierung der Zellen wurde die 1 mm Magnetspitze direkt unterhalb des Elektrodenfeldes des MEAs platziert und der ganze Aufbau für 15 min bei ~120 rpm geschüttelt (Horizontalschüttler), um eine freie Verteilung der Zellen in der Lösung zu garantieren (Abbildung 5C, D). Nach einem anschließenden vorsichtigen Waschschrift mit PBS wurden die positionierten Zellen mit Medium bedeckt und weitere ein bis zwei Tage im Inkubator gehalten, bevor Messungen der Feldpotentiale erfolgten.

Zur Schrittmachergenerierung durch lokalisierte Zellpositionierung dienten ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten, welche das Membranprotein ChR2 exprimierten. Diese wurden durch Frank Holst (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) nach bekanntem Protokoll hergestellt (Bruegmann et al., 2010). Nach Differenzierung in Kardiomyozyten wurden die Zellen ebenso mit SO-Mag5 (200 pg Fe/Zelle) beladen. Hingegen erfolgte eine lokale Positionierung auf MEAs mit funktionalem HL-1 Zellrasen, wobei das Protokoll unverändert blieb (Abbildung 5C, D). Jedoch wurde die lokale Anreicherung in der Umgebung des Elektrodenfeldes vorgenommen und beide Zellarten wurden anschließend in HL-1 Medium gehalten.

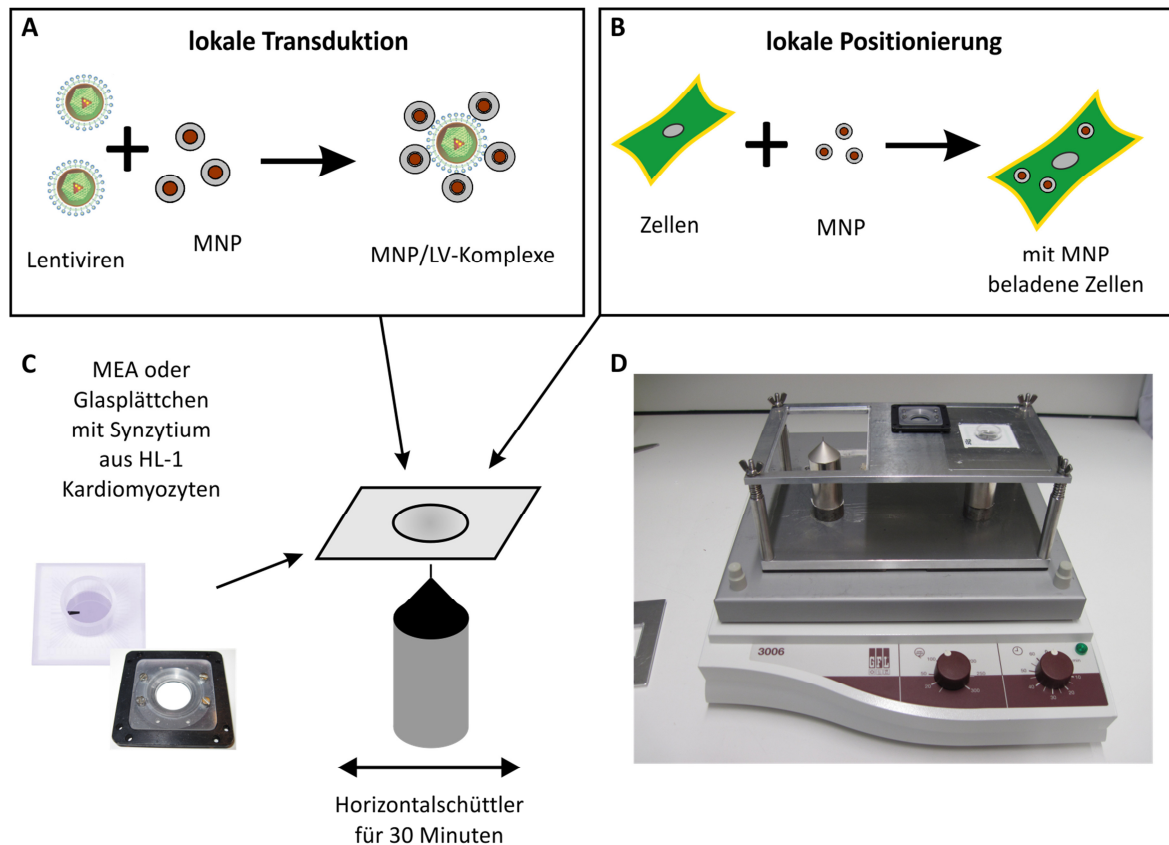


Abbildung 5: Übersicht und Darstellung der Methodik einer lokalen Transduktion bzw. Zellpositionierung *in vitro*. (A, B) Im ersten Schritt wurden Lentiviren über elektrostatische Kräfte an MNPs gekoppelt (A) bzw. Zellen durch Endozytose mit MNPs beladen (B). (C) Anschließend wurden MNP/LV-Komplexe oder beladene Zellen durch Anlegen eines gerichteten Magnetfeldes auf einem 2D-Kardiomyozytenverbund auf einem kleinen Areal von $< 2 \text{ mm}^2$ positioniert. (D) Aufnahme der gesamten Versuchsanordnung mit Horizontalschüttler und Magneten.

3.9 Elektrophysiologische Methoden

3.9.1 Fluoreszenzbasierte Kalzium-Messung (Ca^{2+} -Imaging)

Zur Bestimmung der intrazellulären Kalzium-Konzentration wurde die Methode der fluoreszenzbasierten Kalzium-Messung (Ca^{2+} -Imaging) verwendet (Tsien et al., 1985). Hierbei wurde Fura-2 als Indikator eingesetzt, was freies Kalzium anhand einer Fluoreszenzänderung anzeigen kann. Die Messung erfolgt bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen, wobei Ca^{2+} gesättigtes Fura-2 bei 340 nm und freies Fura-2 bei 380 nm angeregt wird.

Zur Messung der intrazellulären Kalzium-Konzentration wurden HL-1 Zellen oder embryonale Kardiomyozyten mit Fura-2-acetoxymethylester ($2\ \mu\text{M}$) für 10 min bei RT beladen, zweimal mit externer Perfusionslösung gewaschen und für weitere 15 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. In dieser Zeit konnte das Fura-2-acetoxymethylester in die Zellen diffundieren und durch zelluläre Esterasen das Acetoxymethylester abspalten, wodurch Fura-2 reaktiviert wurde und nicht mehr aus der Zelle austreten konnte. Die Experimente erfolgten an einem inversen Mikroskop (Axiovert 200, Zeiss) mit einem 20x Objektiv (Fluar, Zeiss). Während einer Messung wurden die Zellen bei konstant bei 37°C gehalten und mit externer Perfusionslösung gespült. Mit Hilfe eines computergesteuerten Monochromators wurden die Zellen abwechselnd mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 340 und 380 nm angeregt (20 ms, 5-10 Hz). Das emittierte Licht wurde über einen 470 nm Langpassfilter und einer digitalen CCD-Kamera aufgezeichnet. In einer Offline-Analyse wurde das 340/380-Verhältnis ermittelt, wodurch die freigesetzte Kalziummenge für jeden gemessenen Zeitpunkt bestimmt wurde. Anhand von auftretenden Kalzium-Transienten konnte man auf eine spontane Aktivität der Kardiomyozyten schließen. Zur Auswertung der Spontanfrequenz wurde in einem Zeitraum von 30 Sekunden die Kalzium-Transienten von Einzelzellen ausgezählt.

3.9.2 Messungen des I_f -Stroms mittels Patch-Clamp Technik

Für Messungen des I_f -Stroms in Einzelzellen wurde die Patch-Clamp Technik verwendet, die sowohl an nativen als auch transduzierten HL-1 und HEK293 Zellen vorgenommen wurde. Dazu wurden die Zellen nach Standardprotokoll trypsiniert und als Einzelzellen auf Laminin beschichtete Glasplättchen replattiert. Nach ca. sechs Stunden Inkubation (37°C , 5% CO_2) wurden die Patch-Clamp Versuche von Dr. Daniela Malan (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) durchgeführt. Dafür wurden die Glasplättchen mit den Zellen in passende Kammern eingespannt und kontinuierlich bei 37°C mit externer Perfusionslösung gespült. Sobald sich eine Zelle im *whole-cell* Modus befand, wurde zu einer modifizierten externen Perfusionslösung für Messungen des I_f -Stroms gewechselt. Diese Lösung enthielt zusätzlich BaCl_2 und 4-Aminopyridin. Für die Messung des I_f -Stroms wurde der Spannungsklemmen-Modus (*voltage clamp mode*) gewählt, wobei in 10 mV Spannungsschritten für eine Dauer von 2,5 Sekunden beginnend bei -40 mV bis -140 mV angelegt wurden, gefolgt von einem Spannungssprung zu +20 mV für eine Sekunde (Abbildung 6).

Zur Auswertung der Stromdichte wurde die Amplitude des I_f -Stroms gemessen und zur Membrankapazität der Zelle normalisiert. Die Amplitude konnte anhand der Differenz der Stromstärke zu Beginn und Ende der Spannungsschritte berechnet werden.

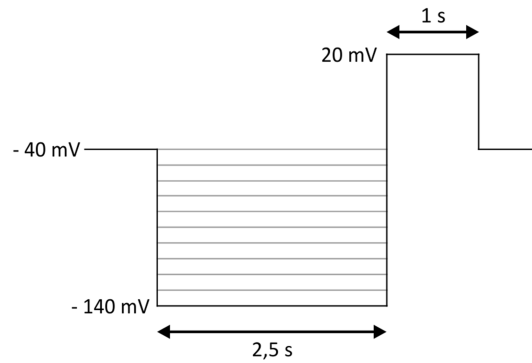


Abbildung 6: Patch-Clamp Protokoll für Messung des I_f -Stroms. Schematische Darstellung des verwendeten Protokolls für die Analyse des I_f -Stroms.

3.9.3 Mikroelektrodenarray (MEA)

Das Mikroelektrodenarray (MEA) ist eine innovative Technik, die *in vitro* Messungen von Feldpotentialen in Zellkulturen und Geweben ermöglicht. Der Standardtyp des *In-vitro*-MEAs hat ein zentrales Raster aus 8x8 Elektroden, welche jeweils einen Elektrodenabstand von 200 μm besitzen. Damit wird ungefähr eine Fläche von 2 mm^2 abgedeckt, auf der die Feldpotentiale über 60 Elektroden gemessen werden können (Abbildung 7A). Damit bietet diese Technik für ein Synzytium aus Kardiomyozyten eine schnelle und einfache Möglichkeit, um Kopplung zwischen Kardiomyozyten zu beobachten. Durch eine zeitliche Analyse der gemessenen Feldpotentiale lässt sich die Verzögerung der Erregungsweiterleitung und dadurch die Ausbreitungsrichtung der Erregung bestimmen und darstellen. Dies erlaubt Rückschlüsse zur Bestimmung eines Schrittmacherursprungs im 2-dimensionalen Zellrasen und somit eine Analyse der Schrittmacheraktivität (Abbildung 7B). Zur Erzeugung eines funktionellen Synzytiums aus Kardiomyozyten wurden 200.000 HL-1 Zellen auf MEA ausgesät, welche nach ein bis zwei Tagen weiterer Proliferation einen konfluenten und gekoppelten Zellrasen ausbildeten. Dieser konnte für Messungen und Experimente (z.B. lokale Transduktion, siehe Kapitel 3.8.7) verwendet werden.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich ThinMEAs (60ThinMEA200/30iR-ITO-gr) verwendet, welche eine Glasdicke von nur 180 μm besitzen und deshalb optimal zur lokalen Transduktion verwendet werden konnten (siehe Kapitel 3.8.7). Die Messung erfolgte mit einem Microelectrode-Amplifier System (Multichannel Systems). Alle Daten wurden mittels MC-Rack Software und einer Abtastrate (Samplingrate) von 2 kHz aufgenommen.

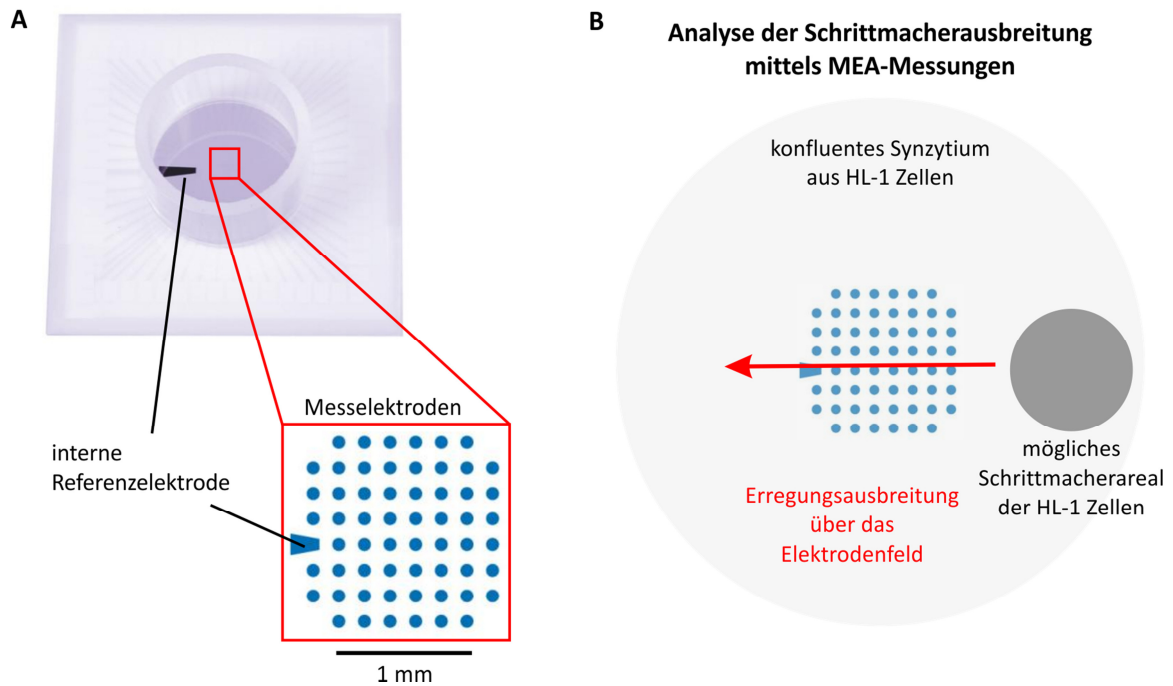


Abbildung 7: Layout eines Mikroelektrodenarrays (MEA) und Nutzung zur Schrittmacheranalyse. (A) Mikroelektrodenarray (MEA) vom Typ 60ThinMEA200/30iR-ITO-gr. (B) Die Untersuchung der Schrittmacheraktivität erfolgte mittels Mikroelektrodenarray (MEA) und interner Analyse der Latenzzeit, um die entsprechende Ausbreitungsrichtung und somit ein mögliches Schrittmacherareal festzustellen.

3.9.4 Analyse der Schrittmacheraktivität aus Langzeit MEA-Daten

Für eine Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung mussten die Feldpotentiale eines MEAs kontinuierlich für mindestens sechs bis sieben Tage aufgezeichnet werden. Allerdings bietet die MC-Rack Software keine vernünftige Auswertung und Darstellung der Schrittmacheraktivitäten über einen längeren Zeitraum. Deshalb musste eine alternative Lösung gefunden werden, die eine Analyse jeder einzelnen Erregung und eine zusammenfassende Auswertung der Schrittmacheraktivität bezüglich der Erregungsausbreitung, Erregungsänderung und Stabilität erlaubt. Dazu wurden mit dem Programm MC-Rack die t_{\min} -Zeiten aller Elektroden in Bezug zu einer ausgewählten Referenzelektrode berechnet und exportiert. Die dabei anfallende Datenmenge wurde in OriginPro8G importiert und mit Hilfe eines eigens geschriebenen Programmskripts weiter verarbeitet, um die Ausbreitungsrichtung jeder einzelnen Erregung zu berechnen. Die Methode zur Berechnung ist im Kapitel 4.4.1 im Detail beschrieben und das verwendete Skript befindet sich im Anhang.

3.9.5 *In vitro* Lichtstimulation von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten

Lichtstimulationsversuche von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten wurden sowohl am Mikroskop als auch am Makroskop durchgeführt, wobei gleichzeitig Feldpotentialmessungen mittels MEAs aufgezeichnet und anschließend zur weiteren Analyse verwendet wurden.

Eine mikroskopische Lichtstimulation erfolgte am Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss), welchem zur Beleuchtung ein temperatur-kontrolliertes LED Modul (Omicron, LEDMOD LAB 470 nm, Omicron Laserage) angeschlossen war. Dieses konnte zur Stimulation über ein Pulsgenerator (Model 2100, A-M Systems) gesteuert werden.

Eine makroskopische Lichtstimulation erfolgte am Olympus MVX10 (Olympus). Zur Beleuchtung diente eine LED-Lampe (LEDC5 470 nm, Thorlabs), welche über ein PowerLab Datenerfassungssystem (AD-Instruments) und der LabChart7 Software gesteuert wurde.

Die Lichtintensität konnte mit Hilfe eines Powermeters (PM100 Powermeter und S130A Sensor, Thorlabs) zur Energiemessung am Mikroskop bzw. Makroskop gemessen und auf die jeweilige Beleuchtungsfläche umgerechnet werden.

3.10 Immunohistologische Methoden

3.10.1 Zellfixierung mit Paraformaldehyd

Auf Deckgläsern (\varnothing 12 mm oder \varnothing 25 mm) kultivierte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor sie mit 4% Paraformaldehyd-Lösung überdeckt wurden und für 20 min bei RT inkubierten. Im Anschluss erfolgten zwei weitere Waschschrte mit PBS. Bis zur Färbung wurden die fixierten Zellen in PBS bei 4°C aufbewahrt.

3.10.2 Zellkernfärbung mit Höchst

Für die Zellkernfärbung wurden die fixierten Zellen für 10 min mit einer 0,2% Triton-X Lösung permeabilisiert und anschließend 2-3x mit PBS gewaschen. Danach folgte eine Inkubation mit dem Hoechst-Farbstoff (1:1000) bei RT für weitere 20 min. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS und VE-Wasser wurden die Deckgläser mit dem Eindeckmedium Fluka möglichst luftblasenfrei auf Objektträger aufgebracht. Zur Trocknung wurden sie die nächsten 24 bis 48 Stunden trocken und dunkel gelagert.

Die Zellkernfärbung mit dem Hoechst-Farbstoff (1:1000) konnte auch bei nicht fixierten HL-1 Zellen durchgeführt werden, welche auf MEA ausplattiert waren und infolgedessen nicht fixiert werden konnten. Die Inkubation betrug ebenfalls 20 min bei RT mit anschließenden Waschschritten mit PBS. Diese Zellen wurden direkt für die Mikroskopie (Übersichtsaufnahmen) verwendet.

3.10.3 Immunohistochemische Färbungen

Fixierten Zellen wurden mit einer 0,2% Triton-X Lösung für 10 min permeabilisiert und mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen mit 5% Eselserum bei RT für 20 min inkubiert. Nach einem kurzen Waschschriff mit PBS folgte die Inkubation des primären Antikörpers für zwei Stunden bei RT. Daran folgten weitere Waschschriffe mit PBS, bevor der sekundäre Antikörper, welcher mit einem bestimmten Fluorophor konjugiert ist, aufgebracht wurde. Dieser war spezifisch gegen den Erstantikörper gerichtet und musste für eine Stunde bei RT einwirken. Dies konnte parallel mit einer Zellkernfärbung geschehen, indem der Zweitantikörper in der Hoechst-Lösung verdünnt wurde. Zum Schluss wurden die Proben mehrmals mit PBS und VE-Wasser gewaschen, bevor sie schließlich mit Fluka-Lösung auf einem Objektträger eingedeckt wurden (siehe Kapitel 3.10.2).

Tabelle 4: Übersicht der primären Antikörper

Primärer Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Alpha-Aktinin EA-53	Maus IgG	1:400	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tbx18, sc-17869	Ziege poly IgG	1:400	Santa Cruz Biotechnology
HCN2	Kaninchen poly IgG	1:100	Alomone (Jerusalem, Israel)
HCN4	Kaninchen poly IgG	1:100	Alomone (Jerusalem, Israel)

Tabelle 5: Übersicht der sekundären Antikörper

Sekundärer Antikörper	Fluorochrom	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Maus IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, (Suffolk, Großbritannien)
Maus IgG	Cy5	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, (Suffolk, Großbritannien)
Kaninchen IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, (Suffolk, Großbritannien)
Ziege IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, (Suffolk, Großbritannien)

3.10.4 Mikroskopie

Mikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen, d.h. sowohl Einzelbilder als auch Übersichtsbilder, wurden an einem Digital Imaging ApoTome System gemacht, bestehend aus dem Mikroskop Axio Observer Z1, dem Gittereinschub ApoTome, dem MosaiX Modul, der Kamera AxioCam MRc5 und der Bearbeitungssoftware Axiovision 4.8 (Carl Zeiss AG).

4 Ergebnisse

4.1 Lokale Transduktion

Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit lag in der methodischen Etablierung einer lokal begrenzten Transduktion ($1-2 \text{ mm}^2$), um einen regionalen Schrittmacher zu erzeugen. Dazu sollte die Methode der Magnetofektion genutzt werden, um Mithilfe eines räumlich fokussiert angelegten magnetischen Feldes innerhalb einer Kardiomyozyten-Zellschicht einen kleinen Bereich der Zellen ($1-2 \text{ mm}^2$) zu transduzieren. Da kleine industriell hergestellte Magnete ($\varnothing < 1 \text{ mm}$) für diesen Zweck nicht stark genug sind, wurde von unseren Kooperationspartnern (Arbeitsgruppe Gleich, Zentralinstitut für Medizintechnik (IMETUM), Technische Universität München) die Entwicklung von Magnetspitzen übernommen, die ein starkes Magnetfeld auf einer kleinen Fläche erzeugen. Mittels Computersimulationen und iterativer Optimierungsprozesse konnte die Form der Spitzen so verfeinert werden, dass das resultierende magnetische Gradientenfeld in Stärke und Richtung bestmöglich ausgerichtet war, um eine optimale lokale Anreicherung der magnetischen Nanopartikel zu ermöglichen (Kilgus et al., 2012). Durch hauseigene Mechaniker am Institut für Physiologie I der Universität Bonn erfolgte die Herstellung dieser Magnetspitzen, welche aus Weicheisen bestehen und auf zylindrische NdFeB Permanentmagnete gesetzt wurden. Benannt nach dem Spitzendurchmesser wurden drei verschiedene Spitzen entwickelt: eine $200 \mu\text{m}$ Spitze mit konischer Form (Abbildung 9A, B) und zwei 1 mm Spitzen, die sich im Design durch eine konische und gerade Form voneinander unterschieden (Abbildung 10A, B, H, I).

Darüber hinaus verwendete die Arbeitsgruppe Gleich die Geometriedaten der Spitzen sowie die spezifischen Partikeleigenschaften für Simulationen, um die Bewegungsbahnen der MNP/LV-Komplexe zu berechnen. Simulationen, in denen 10.000 Bewegungsbahnen und deren Berührungskordinaten auf Zellebene kalkuliert wurden, dienten für eine Vorhersage der stochastischen Verteilung der Partikel. Die sich daraus ergebene räumliche Verteilung der MNP/LV-Komplexe konnte mit den experimentellen Daten verglichen werden und ergab eine gute Übereinstimmung (siehe Kapitel 4.1.1) (Kilgus et al., 2012).

4.1.1 Lokalität der eGFP-Expression bei Verwendung verschiedener Magnetspitzen

Die unterschiedlichen Magnetspitzen wurden in lokalen Transduktionsexperimenten auf Effizienz und Lokalität untersucht. Dazu dienten auf Glasplättchen (\varnothing 25 mm, Dicke 200 μm) ausgesäte und konfluent gewachsene HL-1 Kardiomyozyten, die lokal transduziert wurden. Zur Bewertung der lokalen Expression wurden RRL-CMV-eGFP Lentiviren verwendet, die das grün fluoreszierende Protein (eGFP) unter einem ubiquitären Cytomegalie-Virus-Promoter (CMV) exprimieren. Die Lentiviren wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Auswahl eines geeigneten MNP fiel auf SO-Mag5, da dieser das höchste magnetische Moment besaß und eine hohe Transduktionseffizienz aufwies (Trueck et al., 2012). Für eine lokale Transduktion wurden Komplexe aus MNPs und Lentiviren (MNP/LV-Komplexe) generiert, indem beide in einem Verhältnis von 200 fg Eisen pro Viruspartikel miteinander inkubiert wurden. Dieses Verhältnis von MNPs zu Virus bietet eine fast vollständige Bindung aller Viruspartikel an MNPs (Trueck et al., 2012). Insgesamt wurden für einen Versuch ca. 1,2 μg Eisen pro Versuch eingesetzt. Während der Inkubation von 30 Minuten wurde der gesamte Aufbau mit einem Horizontalschüttler bei ca. 120 rpm geschüttelt (Abbildung 5C, D), um eine bessere Verteilung und Durchmischung der MNP/LV-Komplexe in der Lösung zu erreichen. Zur Kontrolle fanden Transduktionsversuche ohne Applikation eines magnetischen Feldes statt, womit sichergestellt werden sollte, dass das Schütteln keinen Lokalisationseffekt hatte. Das Übersichtsbild eines solchen Kontrollversuchs in Abbildung 8A zeigt ein schwaches und homogen verteiltes Transduktionsergebnis drei Tage nach dem Transduktionsexperiment. Für eine qualitative und quantitative Bewertung des Lokalisationseffekts wurde für jedes Experiment die eGFP-Expression in Form eines Histogramms quantifiziert. Dazu wurde die Fläche in 21 konzentrischen Schalen (Abbildung 8C) von jeweils 250 μm Breite eingeteilt, die eGFP-Intensität in jeder Schale gemessen und auf die entsprechende Fläche normalisiert. Daraus wurde die relative eGFP-Fluoreszenz jeder Schale in Bezug auf die gesamte eGFP-Fluoreszenz berechnet. In den Kontrollversuchen zeigte sich eine relativ gleiche Fluoreszenzverteilung von ca. 5% in allen 21 Schalen, was zusammen 100% ergab. Das bestätigte die Beobachtung einer gleichverteilten eGFP-Expression über den gesamten Zellrasen (Abbildung 8B) und die Vermutung, dass das Schütteln keine Lokalisation hervorruft.

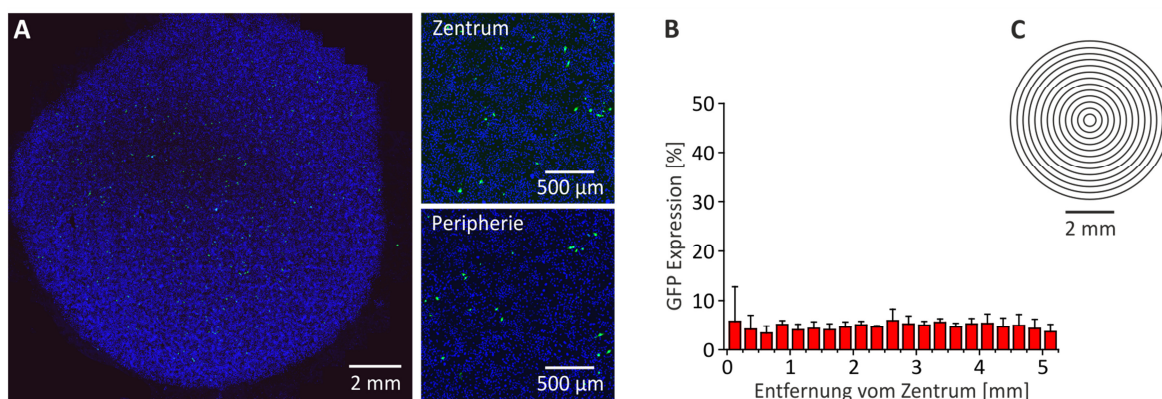


Abbildung 8: Kontrolltransduktion ohne Magneten ergeben einen homogenen, aber schwachen Gentransfer. (A) Übersichtsaufnahme der eGFP-Expression (grün) nach Transduktion von HL-1 Zellen mit MNP/LV-Komplexen mit Vergrößerungen von Zentrum und Peripherie (Kernfärbung mit Hoechst in blau). (B) Statistische Analyse zur Verteilung der eGFP-Expression in einzelne Schalen (n=6). (C) Darstellung der einzelnen Schalen mit einer Breite von 250 µm zur statistischen Analyse der eGFP-Expressionsverteilung vom Zentrum zur Peripherie. (modifiziert nach Kilgus et al., 2012)

Für lokalisierte Transduktionen einer HL-1 Zellschicht wurden die Permanentmagnete mit konstruierten Magnetspitzen direkt unterhalb im Zentrum der Glasplättchen platziert. Neben dem Design der Magnetspitzen (Abbildung 9A, B; Abbildung 10A, B, H, I) konnte die Arbeitsgruppe Gleich für alle Spitzentypen das auftretende magnetische Feld berechnen. Dies übt eine gerichtete magnetische Kraft auf die MNP/LV-Komplexe in Richtung Magnetspitze aus, wobei die magnetische Flussdichte in der Entfernung abnimmt (Abbildung 9C, Abbildung 10C, J). Die Vorhersagen über Lokalisation sowie theoretische Verteilung der MNP/LV-Komplexe zeigten bei allen Spitzen eine starke zentrale Anreicherung der MNP/LV-Komplexe in einem Radius von ungefähr 0,5 bis 1 mm (Abbildung 9D; Abbildung 10D, K). Übersichtsaufnahmen der lokal transduzierten HL-1 Zellen belegten diesen Lokalisationseffekt. Dabei war im Zentrum eine starke lokale eGFP-Expression zu erkennen, welche in der Peripherie deutlich abfiel (Abbildung 9E; Abbildung 10E, L). Zur besseren qualitativen und quantitativen Auswertung wurden Histogramme erstellt (siehe oben). Diese helfen beim direkten Vergleich von Simulations- und experimentellen Versuchen, welche eine deutliche Übereinstimmung zeigten. Die Simulation mit der 200 µm Spitze sagte eine Anreicherung von ca. 40% der MNP/LV-Komplexe in einem Radius von 0,5 mm vorher (Abbildung 9F). Experimentell fanden sich in dem Bereich ca. 55% der analysierten eGFP-Intensität (Abbildung 9G), welche somit 15% höher war.

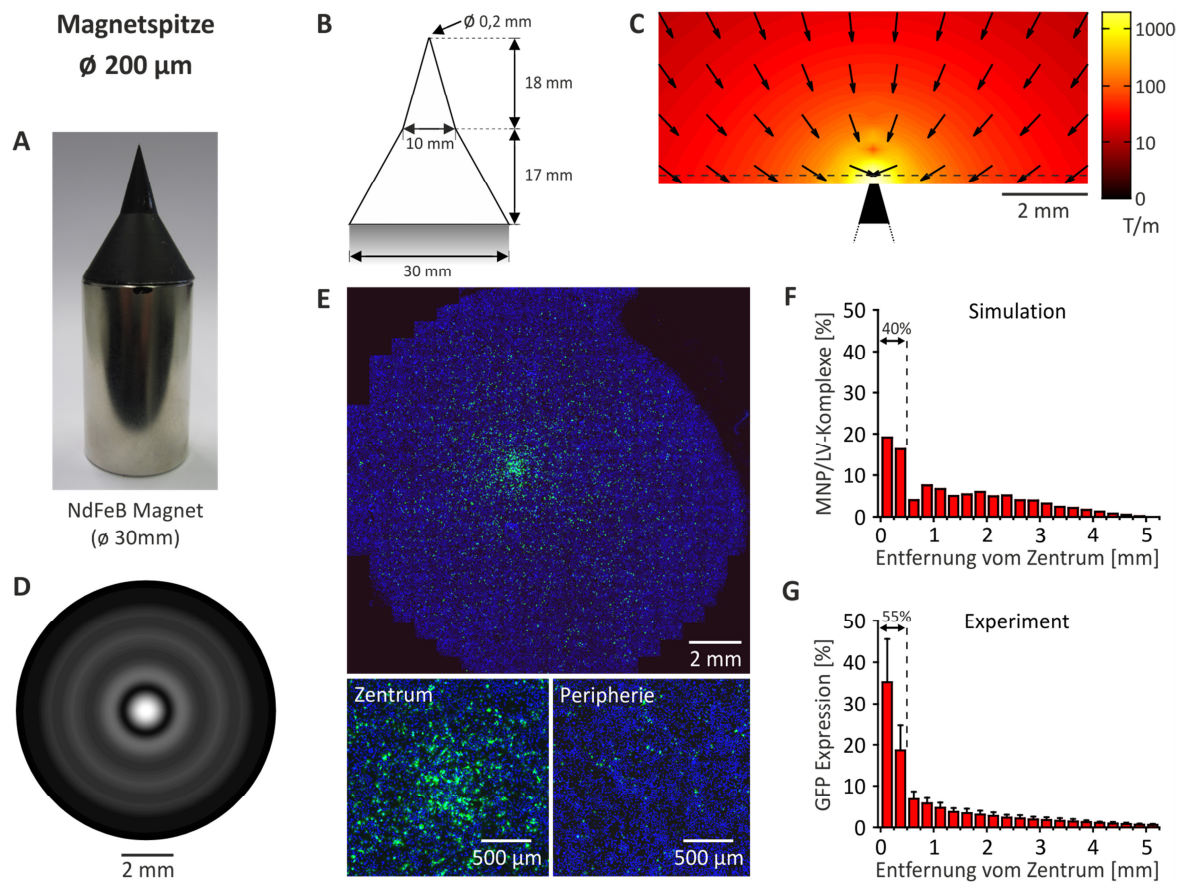


Abbildung 9: Lokale Transduktion mit einer 200 μ m Magnetspitze. (A) Fotoaufnahme des Permanentmagneten mit konstruierter 200 μ m Magnetspitze. (B) Schematische Darstellung mit Abmessungen der Magnetspitze. (C) Darstellung der magnetischen Flussdichtegradienten in absoluten Werten (in Farbe) und Richtung (Pfeile) im Querschnitt zur Symmetrieachse (gestrichelte Linie: Lage der Zellschicht). (D) Verteilung der MNP/LV-Komplexe aus Simulationsberechnungen (weiß: Partikel; schwarz keine Partikel). (E) Übersichtsaufnahme der eGFP-Expression (grün) eines Beispielexperiments (Kernfärbung mit Hoechst in blau) mit Vergrößerung aus dem Zentrum und Peripherie. (F) Verteilung der relativen Partikeldichte in einzelnen Schalen. (G) Verteilung der relativen eGFP-Expressionsdichte in einzelnen Schalen (n=6). (C, D, F zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Gleich; modifiziert nach Kilgus et al., 2012)

Abbildung 10 zeigt einen Vergleich der beiden Magnetspitzen mit einem Durchmesser von 1 mm, die sich durch eine konische und eine gerade Form unterscheiden (Abbildung 10A, B, H, I). Die Simulationen zur Verteilung der MNP/LV-Komplexe prognostizierten bei beiden Formen, dass ca. 50% der MNP/LV-Komplexe in einem Radius von 750 μm angereichert werden (Abbildung 10D, F, K, M). Die dazu gehörigen Fluoreszenzverteilungen aus den experimentellen Versuchen wiesen im gleichen Radius ca. 60% der eGFP-Expression bei der konischen 1 mm Spitze und ca. 70% bei der geraden geformten 1 mm Spitze auf (Abbildung 10G, N). Simulation und Experiment stimmten sehr gut überein, wobei die experimentellen Werte wie schon bei der 200 μm Spitze um ca. 10% bis 20% höher waren als die Simulationenwerte. Ein direkter Vergleich der experimentellen Daten untereinander verdeutlicht zudem einen um 10% stärkeren Lokalisationseffekt im Radiusbereich von 750 μm bei Verwendung der geraden 1 mm Spitze. Dies ging mit einem wesentlich stärkeren Abfall der eGFP-Expression in der Peripherie einher, insbesondere im Bereich von 750 μm bis 2 mm (siehe grüne Pfeile, Abbildung 10G, N). Bei Betrachtung der beiden innersten Schalen (250 μm und 500 μm) zeigte die konische 1 mm Spitze außerdem eine zentrale ringförmige Anreicherung (Abbildung 10D, F, G). Sowohl in der Simulation als auch im Experiment waren hierbei nur 10 bis 12% der MNP/LV-Komplexe bzw. der eGFP-Expression in der innersten Schale zu finden (siehe blaue Pfeile in Abbildung 10F, G). Hingegen lieferte die gerade 1 mm Spitze eine flächigere zentrale MNP/LV-Anreicherung und eGFP-Expression mit Werten von über 20% in den beiden ersten Schalen (siehe blaue Pfeile in Abbildung 10M, N). Die gerade 1 mm Spitze hatte damit bedeutende Vorteile bei Lokalisations- und entsprechender Transduktionseffizienz.

Die dargestellten Magnetspitzen ließen sich *in vitro* für lokale Transduktionen kleiner Flächen von ungefähr 1-2 mm^2 gut einsetzen. Hierbei beeinflusste das Design der Spitzen Qualität und Quantität, so dass die gerade Form das beste Ergebnis in Hinblick auf Lokalisationseffizienz mit möglichst geringer peripherer Streuung lieferte.

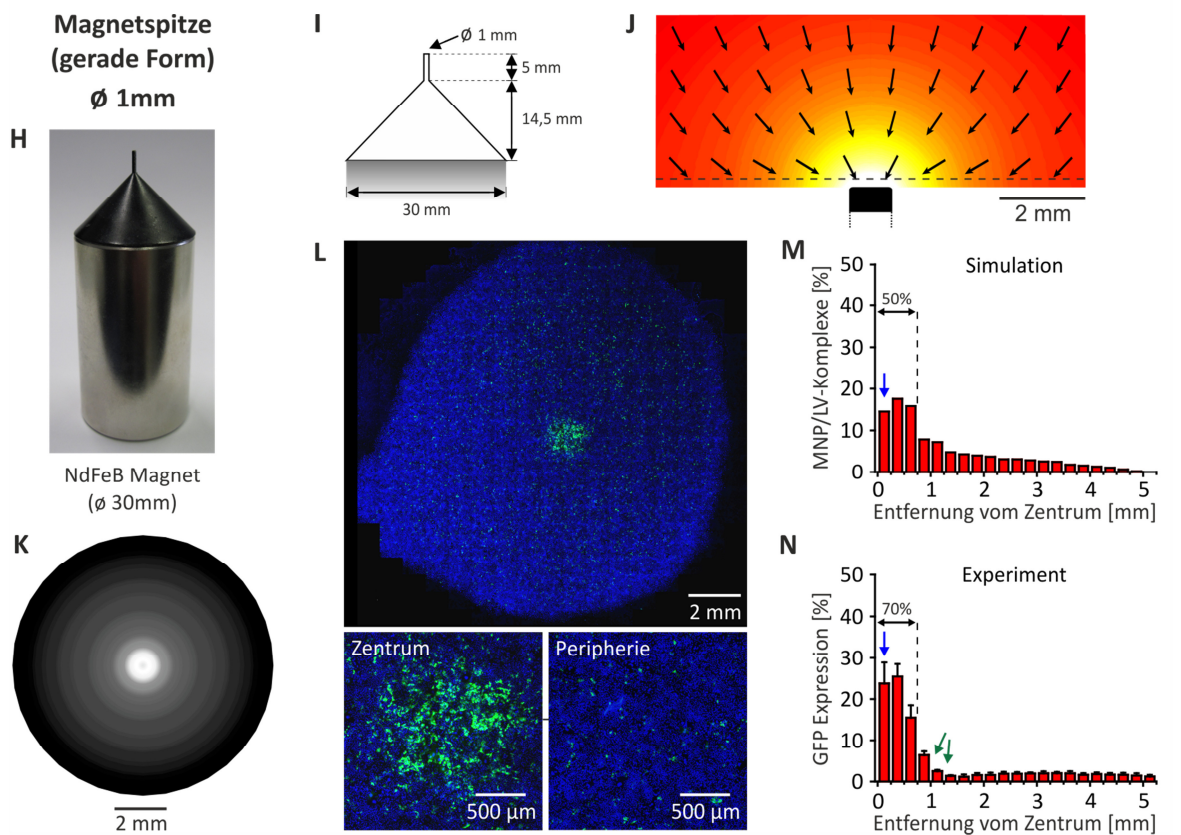
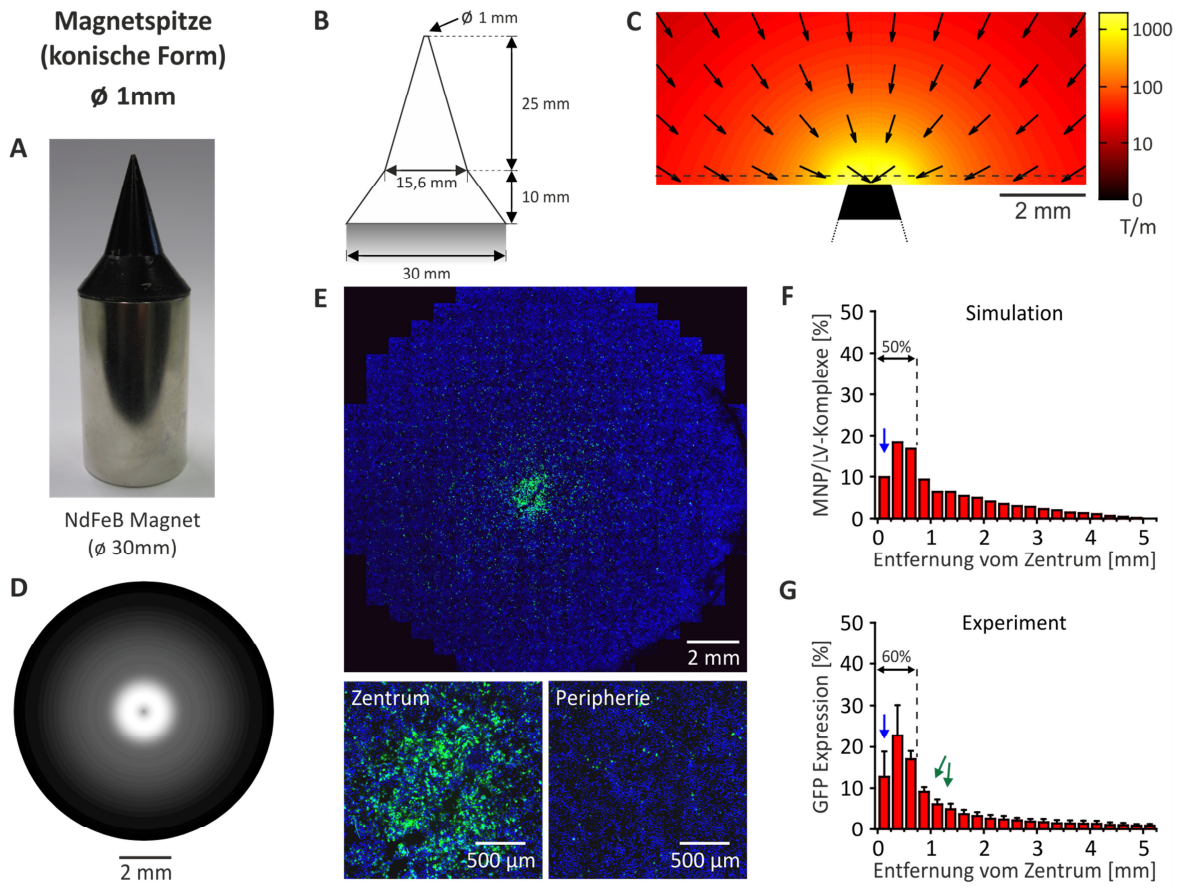


Abbildung 10: Vergleich der lokalen Transduktion mit unterschiedlich gestalteten 1 mm Magnetspitzen. (A, H) Verwendete Permanentmagnete mit konstruierten Magnetspitzen. (B, I)

Schematische Darstellung mit Maßen der Magnetspitzen. (C, J) Magnetische Flussdichtegradienten in absoluten Werten (in Farbe) und Richtung (Pfeile) im Querschnitt zur Symmetrieachse (gestrichelte Linie: Lage der Zellschicht). (D, K) Verteilung der MNP/LV-Komplexe aus Simulationsberechnungen (weiß: Partikel; schwarz keine Partikel). (E, L) Übersichtsaufnahme der eGFP-Expression (grün) eines Beispielsperiments mit Vergrößerungen jeweils vom Zentrum und Peripherie (Kernfärbung mit Hoechst in blau). (F, M) Verteilung der relativen Partikeldichte in einzelnen Schalen. (G, N) Verteilung der relativen eGFP-Expressionsdichte in einzelnen Schalen (n=5). (C, D, F, J, K, M zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Gleich; A-G modifiziert nach Kilgus et al., 2012)

4.1.2 Effizienzänderung einer lokalen Transduktion bei erhöhter Distanz zur Magnetspitze

Da die magnetische Kraft mit steigender Entfernung abnimmt, wurde der Einfluss eines veränderten Abstandes zwischen Zellschicht und Magnetspitze untersucht. Dafür wurde der Abstand von 200 μm auf 1 mm erhöht, wie es durch die gestrichelte Linie in Abbildung 11A gekennzeichnet ist. Das Übersichtsbild eines Beispielsperiments zeigt unter diesen Umständen einen geminderten Lokalisationseffekt, welcher mit einer weiten Streuung der eGFP-Expression einherging (Abbildung 11C). Die dazugehörige radialsymmetrische Analyse veranschaulicht, dass nur ca. 30% der gesamten eGFP-Expression im Radius von 750 μm zu finden war und mit der Entfernung nur schwach abnahm (Abbildung 11E). Im Vergleich dazu lag der prozentuale Anteil der eGFP-Expression bei 60-70%, wenn der Abstand während des Experiments nur 200 μm betrug (Abbildung 11F). Zusätzlich konnte mit Hilfe von Computersimulationen unserer Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Gleich eine Minderung der Lokalität präzise vorhergesagt werden. Die kalkulierte Verteilung der MNP/LV-Komplexe mit einem lokalisierten Anteil von nur 30% im Radius von 750 μm konnte die experimentellen Daten sehr eindrucksvoll bestätigen (Abbildung 11B, D).

Das Ergebnis ließ demzufolge erkennen, dass eine erhöhte Entfernung zur Magnetspitze mit einer deutlich verminderten Lokalisation korreliert.

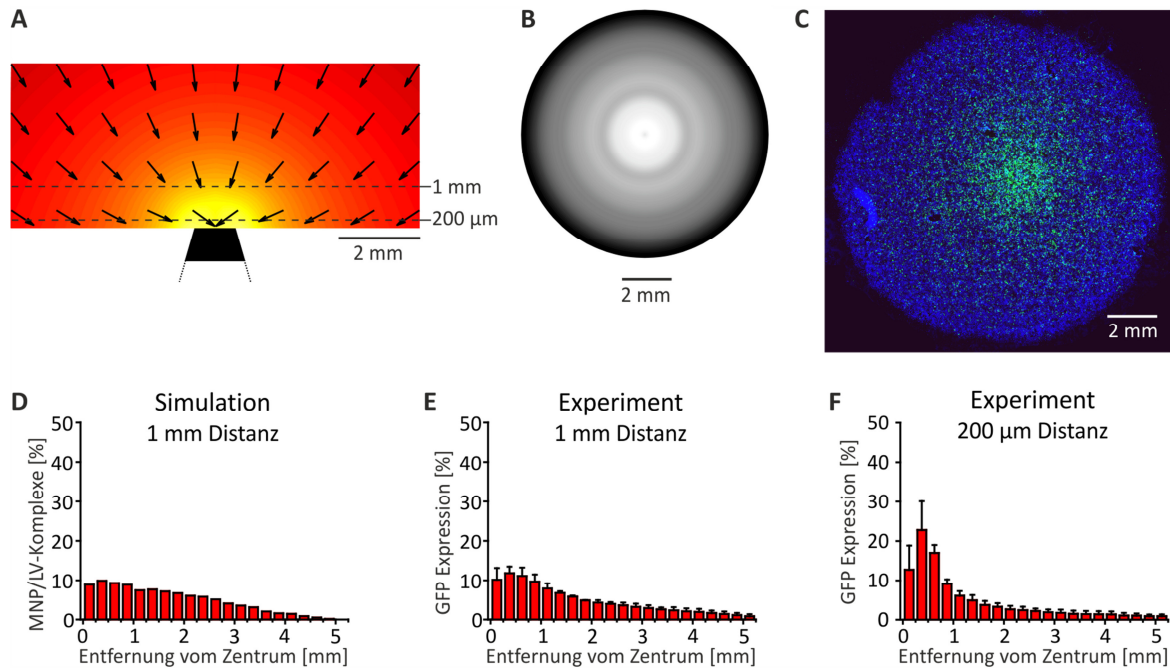


Abbildung 11: Lokale Transduktion von HL-1 Zellen in 1 mm Entfernung von der Magnetspitze. (A) Darstellung der magnetischen Flussdichtegradienten in absoluten Werten (in Farbe) und Richtung (Pfeile) im Querschnitt der Symmetrieachse (gestrichelte Linie: Lage der Zellschicht). (B) Verteilung der MNP/LV-Komplexe aus Simulationsberechnungen (weiß: Partikel; schwarz keine Partikel). (C) Übersichtsaufnahme der eGFP-Expression (grün) eines Beispielexperiments (Kernfärbung mit Hoechst in blau). (D) Verteilung der relativen Partikeldichte in einzelnen Schalen. (E, F) Verteilung der relativen eGFP-Expressionsdichte in einzelnen Schalen bei 1 mm Zellabstand (E) und 200 µm Zellabstand (F) (n=5). (A, B, D zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Gleich; modifiziert nach Kilgus et al., 2012)

4.1.3 Verwendung verschiedener MNPs zur lokalen Transduktion

Neben SO-Mag5 lieferten Vorversuche von unseren Kooperationspartnern (Arbeitsgruppe Pfeifer, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) PEI-Mag2 als weiteren Nanopartikel, der sich für die Transduktion von Kardiomyozyten eignete (Dissertation von C. Trueck 2012). Deswegen wurde PEI-Mag2 ebenfalls in lokalen Transduktionsversuchen getestet, obwohl dieser im Vergleich zu SO-Mag5 ein niedrigeres magnetisches Moment besaß (Trueck et al., 2012). Unter Verwendung der geraden geformten 1 mm Magnetspitze wurde in lokalen Transduktionsversuchen eine vergleichbare Menge Eisen eingesetzt (~ 1,2 µg Eisen/Versuch). Jedoch wurde hierbei ein toxischer Effekt im transduzierten Zellbereich beobachtet. Im Durchlichtbild sind an der Transduktionsstelle dunkle Ablagerungen erkennbar (Abbildung 12A Mitte). Dieser Bereich zeigte keine eGFP-Expression und eine

fehlende Kernfärbung bestätigte ein Absterben der Zellen (Abbildung 12A). Eine Lösung brachte die Reduktion der einzusetzenden Eisenmenge auf 0,6 μg Eisen/Versuch. Dadurch konnte ein Zellsterben vermieden und ein ähnliches lokales Transduktionsergebnis wie bei Verwendung von SO-Mag5 erreicht werden (vgl. Abbildung 10H-N). Ein lokales Areal von ungefähr 1,5 mm Durchmesser zeigte eine deutliche eGFP-Expression, die zur Peripherie deutlich abnahm (Abbildung 12B). Basierend auf der Quantifizierung der eGFP-Dichte ließen sich ungefähr 70% im Radius von 750 μm zuordnen (Abbildung 12C). Auffällig war dennoch eine um 10% geringere eGFP-Dichte im innersten Ring, was evtl. auf toxische Effekte schließen lässt.

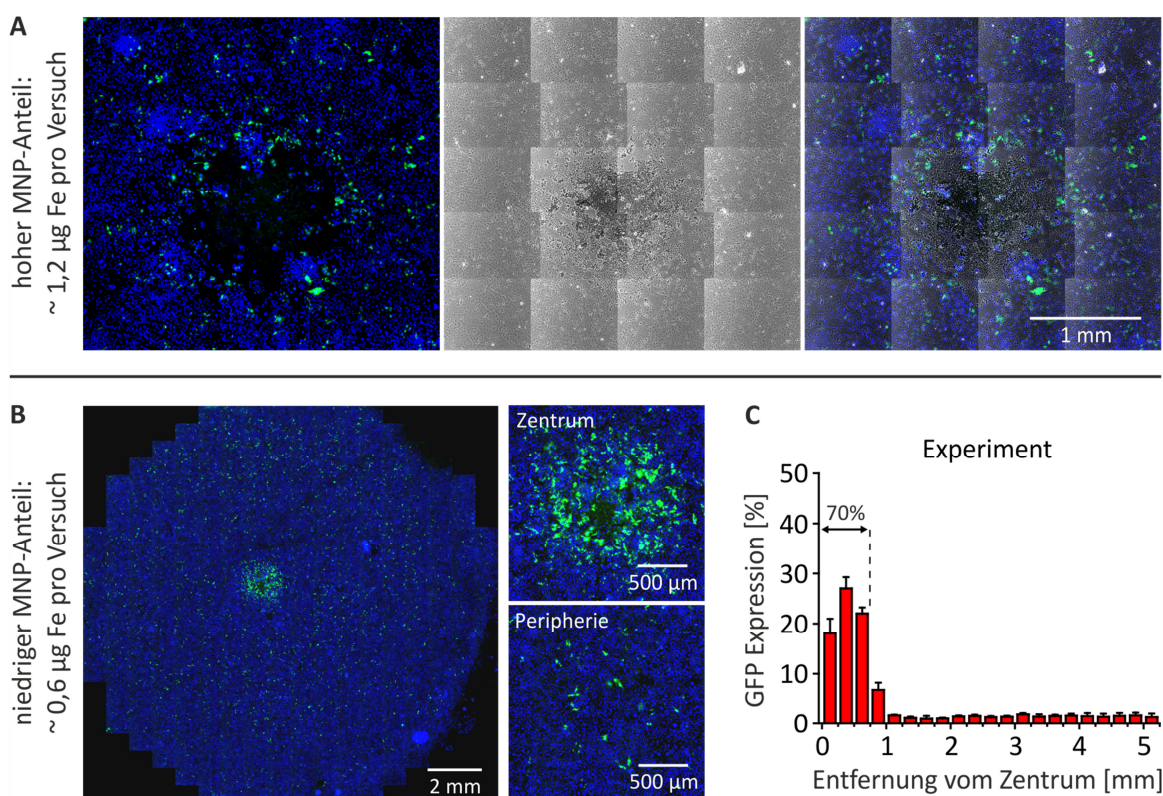


Abbildung 12: Lokale Transduktion mit PEI-Mag2. (A) Fluoreszenz- (links), Durchlichtaufnahme (mittig) und Mischbild (rechts) bei Verwendung von 1,2 μg Eisen/Versuch (eGFP-Expression in grün, Kernfärbung mit Hoechst in blau). (B) Übersichtsaufnahme der eGFP-Expression (grün) bei Verwendung der halben Eisenmenge (0,6 μg Eisen/Versuch) mit Vergrößerungen jeweils vom Zentrum und Peripherie (Kernfärbung mit Hoechst in blau). (C) Verteilung der relativen eGFP-Expressionsdichte in einzelnen Schichten (n=4).

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die lokalen Transduktionsversuche bei Verwendung der beiden MNPs (SO-Mag5 und PEI-Mag2) und den entsprechenden Eisenmengen.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten MNPs in unterschiedlichen Einsatzmengen

MNPs	Eisenmenge/ Versuch [µg Fe]	Virusbindung [fg Fe/VP]	lokal- toxisch	Eisenmenge/ Fläche * [µg Fe/mm²]
SO-Mag5	~ 1,2	200	-	~ 0,5
PEI-Mag2	~ 1,2	200	+	~ 0,5
PEI-Mag2	~ 0,6	200	-	~ 0,25

(* bei der Annahme, dass 75% der eingesetzten Eisenmenge pro Versuch auf eine Fläche mit dem Radius von 750 µm angezogen werden)

4.1.4 Einfluss der MNPs auf die elektrische Aktivität von HL-1 Zellen

Innerhalb des DFG-Forschungsprojektes wurde eine Auswahl an magnetischen Nanopartikeln auf ihre Transduktionseffizienz und toxische Effekte getestet (Trueck et al., 2012). Dabei zeigten SO-Mag5 und PEI-Mag2 Partikel bei globaler flächiger Applikation keine Toxizität. Bei lokaler Transduktion hingegen kommt es zu einer starken lokalen Anreicherung der MNPs. Aufgrund der dadurch auftretenden lokalen toxischen Effekte (siehe Kapitel 4.1.3) war es von Interesse, ob die MNPs außerdem Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der HL-1 Zellen ausüben können. Zur Detektion von Weiterleitungsstörungen innerhalb einer Zellschicht aus Kardiomyozyten wurde die Technik der MEAs eingesetzt, die eine genaue Betrachtung der Erregungsweiterleitung erlaubt. Mit Hilfe der 1 mm Magnetspitze wurden, ähnlich zur lokalen Transduktion, MNPs lokal auf den Elektrodenbereich eines MEAs mit konfluentem HL-1 Zellsynzytium positioniert. Für Untersuchungen mit SO-Mag5 wurden Eisenmengen von 1,8 bzw. 0,9 µg Eisen/Versuch eingesetzt. Abbildung 13 zeigt in beiden Fällen, dass vor der Positionierung ein gekoppeltes HL-1 Synzytium vorhanden war (Kontrolle). Nach MNP-Positionierung im unteren Elektrodenfeld sind die Partikel makro- und mikroskopisch als braune Ablagerung deutlich zu erkennen (roter Kreis in Abbildung 13). Dabei war in einer direkt anschließenden Messung keine Veränderung der Signale zu beobachten, was einen akut toxischen Effekt ausschließt. In den folgenden Tagen waren aus den Elektrodenarealen ohne MNP-Anreicherung deutlich größere Signale messbar, wohingegen Feldpotentiale der Elektroden mit MNP-Anreicherung in Amplitude deutlich reduziert blieben. Daneben konnten in einigen Messungen im MNP-Bereich auch Störungen in der Weiterleitung zwischen Zellen beobachtet werden (Vergrößerung in Abbildung 13B). Bei einer weiteren Reduzierung der Eisenmenge auf ~ 0,22 µg

Eisen/Versuch war keine Beeinflussung der Feldpotentiale mehr feststellbar (Daten nicht gezeigt; n=3).

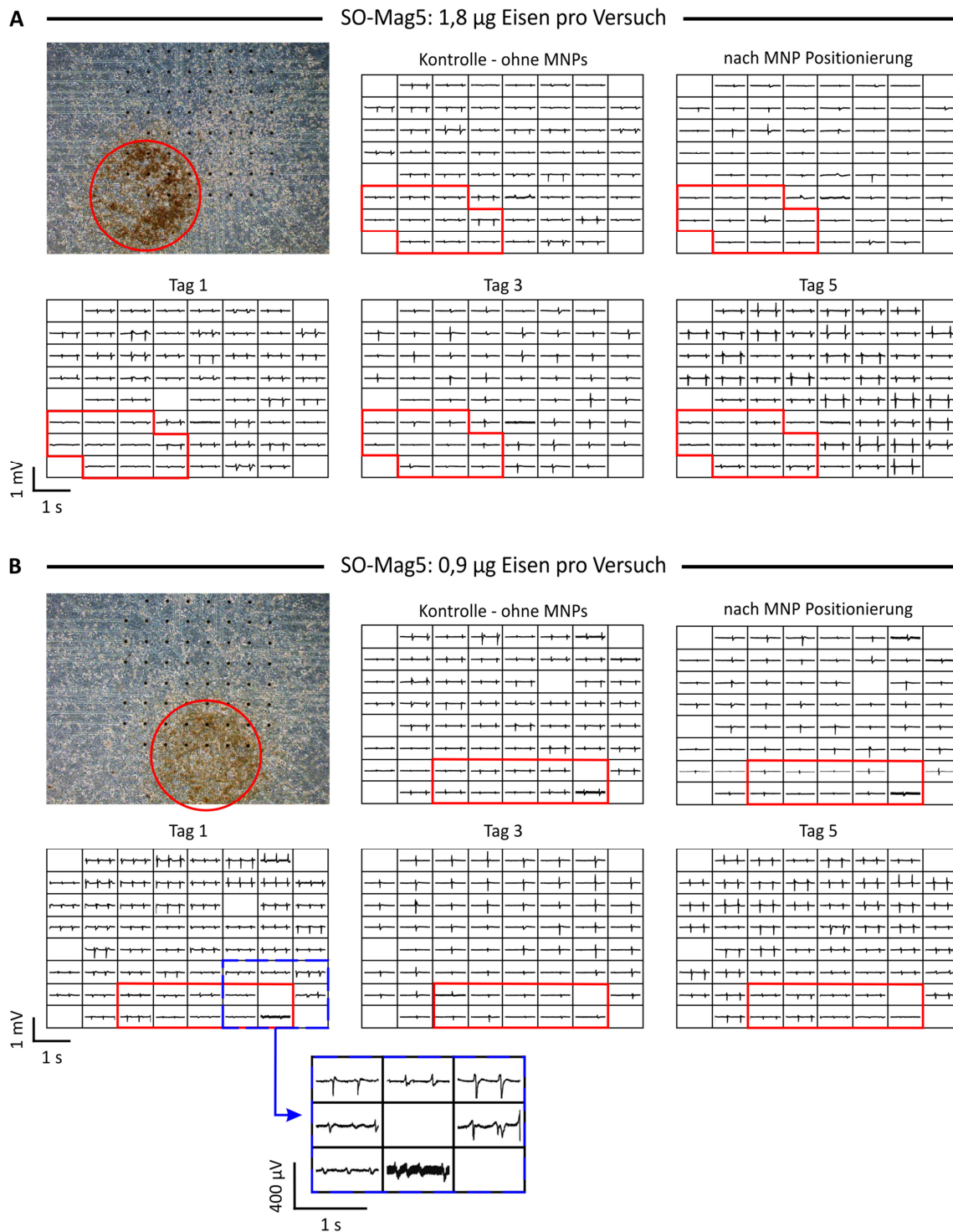


Abbildung 13: Effekte von SO-Mag5 Partikeln auf die electrophysiologischen Eigenschaften von HL-1 Kardiomyozyten. (A, B) Übersichtsbild des Elektrodenfeldes und MEA-Messungen an verschiedenen Zeitpunkten (vor und direkt nach MNP-Positionierung sowie nach einem, drei und fünf Tagen). Rot zeigt den Bereich der MNP-Positionierung bzw. die betroffenen Elektroden des Messfeldes (A: 1,8 μg Eisen/Versuch; B: 0,9 μg Eisen/Versuch; n=3).

Da der Einsatz hoher Mengen von PEI-Mag2 Partikeln bereits zum Zelltod führte (siehe Kapitel 4.1.3), wurden hierfür geringere Mengen von 0,45 µg Eisen/Versuch getestet. Diese geringen Mengen an MNPs waren mikroskopisch im Durchlicht noch zu erkennen (Abbildung 14). Abbildung 14 zeigt ein gekoppeltes Synzytium mit deutlichen Feldpotentialen. Nach MNP-Positionierung im unteren Elektrodenfeld (roter Bereich in Abbildung 14) war bereits eine Verkleinerung der Signale erkennbar, welche sich in den folgenden Tagen nur leicht verbesserten. Im Vergleich zur Kontrollmessung bzw. zu nicht betroffenen Elektroden im oberen Elektrodenareal blieb der markierte Bereich in seiner Amplitudengröße deutlich reduziert. Am dritten Tag traten unverkennbare Weiterleitungsverzögerungen bzw. -störungen auf (Vergrößerung in Abbildung 14).

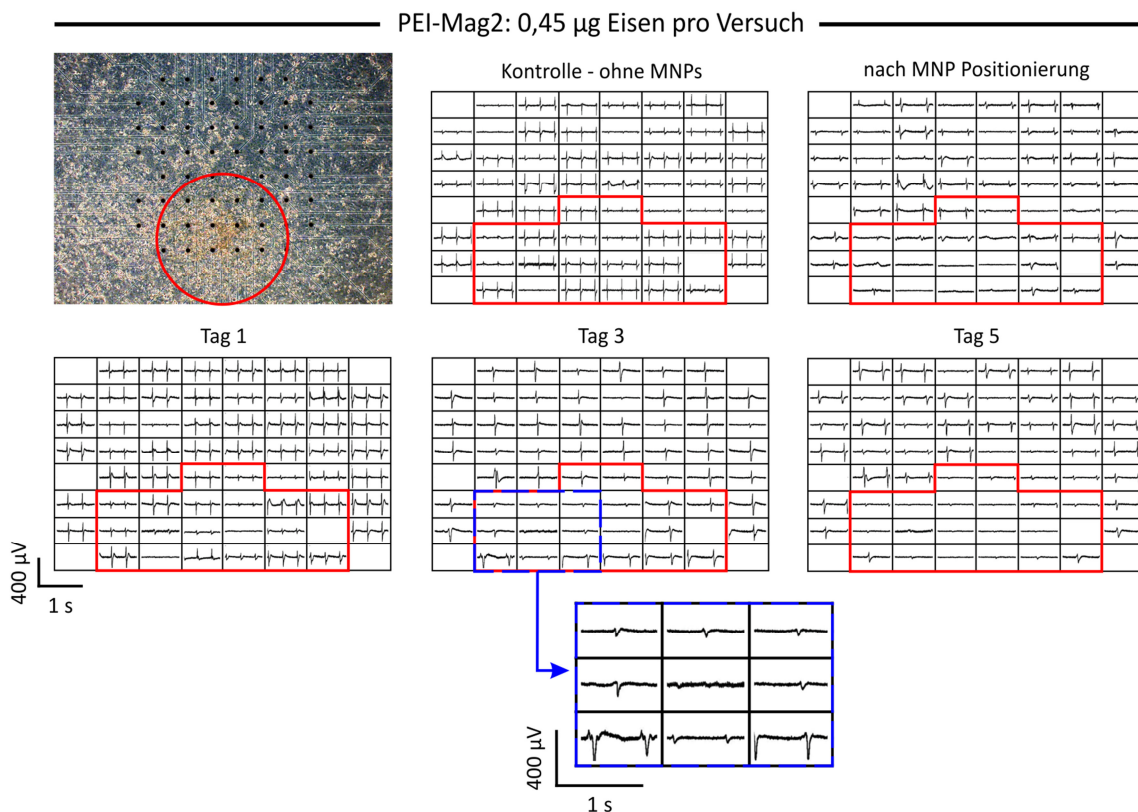


Abbildung 14: Effekte von PEI-Mag2 Partikeln auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von HL-1 Kardiomyozyten. Übersichtsbild des Elektrodenfeldes und MEA-Messungen an verschiedenen Zeitpunkten (vor und direkt nach MNP Positionierung sowie nach einem, drei und fünf Tagen). Rot zeigt den Bereich der MNP-Positionierung und die dadurch beeinflussten Feldpotentiale der Messelektroden (n=3).

4.2 Einsatz von Chr2 als optischer Schrittmacher

4.2.1 Klonierung des Transgentransfervektors pRRL-EF1 α -Chr2-eYFP

Zur Herstellung von Lentiviren werden Transgentransfervektoren benötigt, welche neben dem gewünschten Gen wichtige viruspezifische Elemente enthalten. Die in Abbildung 15 dargestellte Klonierung diente zur Erzeugung eines Transgentransfervektors mit dem Fusionsprotein Chr2-eYFP unter dem ubiquitären EF1 α -Promoter. Als Ausgangsvektor diente das pRRL-EF1 α -eGFP-Plasmid, das bereits alle wichtigen Viruselemente enthielt. Dieses wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und NheI geschnitten, um das eGFP-Fragment zu entfernen. Das zu inserierende Fusionsprotein Chr2-eYFP wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und XbaI aus dem pcDNA3.1-Chr2-eYFP-Plasmid herausgeschnitten. Da eine Restriktion mit den Enzymen NheI und XbaI dieselben Überhänge hinterlässt, konnte das Insert gerichtet in den Vektor ligiert werden. Die Restriktionskontrolle des pRRL-EF1 α -Chr2-eYFP Konstrukts erfolgte mit XhoI und eine gelelektrophoretische Analyse ergab die erwartete Bandenverteilung bei 6190, 1428, 590 und 64 bp (Daten nicht gezeigt). Eine Sequenzierung der Schnittstellen bestätigte die erfolgreiche Klonierung.

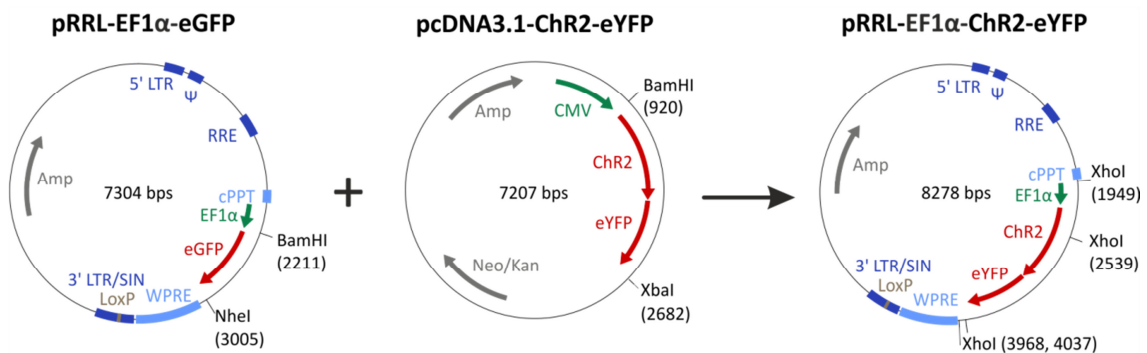


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Klonierung des pRRL-EF1 α -Chr2-eYFP Konstrukts. Einbringen des Chr2-eYFP Fusionsproteins in einen pRRL-EF1 α Vektor mit viruspezifischen Elementen.

4.2.2 Etablierung einer stabilen Chr2-eYFP exprimierenden HL-1 Zelllinie

Nachfolgend wurde eine stabile HL-1 Zelllinie mit konstitutiver Chr2-eYFP-Expression etabliert. Dies erfolgte mit RRL-EF1 α -Chr2-eYFP Lentiviren (Abbildung 16A), welche zur Transduktion auf native HL-1 Zellen gegeben wurden (MOI: 25). Eine Analyse mittels Durchflusszytometrie ergab eine Transduktionseffizienz von ca. 41% (Abbildung 16C). Durch eine zweifache Durchführung einer Zellsortierung von eYFP-positiven HL-1 Zellen

Ergebnisse

mittels Durchflusszytometrie und anschließender Zellexpansion konnte der Anteil positiver Zellen auf über 90% gesteigert werden (Abbildung 16D). Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen dieser Chr2-eYFP exprimierenden Zellen zeigten eine eindeutige und membranständige eYFP-Expression (Abbildung 16E).

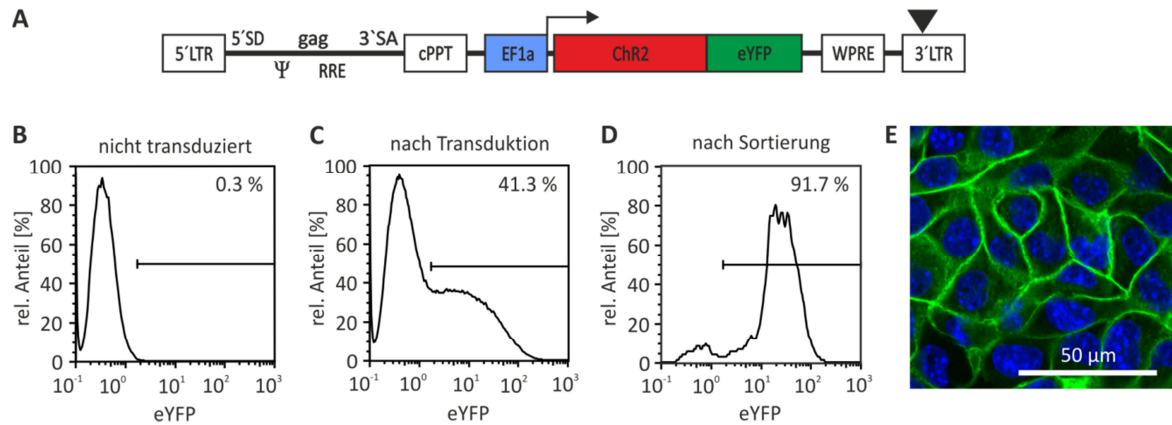


Abbildung 16: Etablierung einer stabilen Chr2-eYFP exprimierenden HL-1 Zelllinie. (A) Schematische Darstellung des lentiviralen RRL-EF1 α -Chr2-eYFP Konstrukts mit virusspezifischen Elementen. (B-D) Durchflusszytometrische Analyse der HL-1 Kardiomyozyten: (B) untransduzierte HL-1 Wildtyp-Kardiomyozyten, (C) HL-1 nach lentiviraler Transduktion und (D) nach zweifacher Aufreinigung mittels Durchflusszytometrie. (E) Fluoreszenzaufnahme Chr2-exprimierender HL-1 Kardiomyozyten mit membranständigem eYFP-Signal (eYFP in grün; Kernfärbung mit Hoechst in blau).

Zur Untersuchung der Funktionalität des eingebrachten Chr2 wurde die Stimulierbarkeit der Zelllinie mit blauem Licht getestet. Dafür wurden diese Zellen auf MEAs ausgesät, auf denen sie nach ein bis zwei Tagen ein Synzytium ausbildeten (Abbildung 17A, B). Messungen der Feldpotentiale zeigten einen spontan aktiven und gekoppelten Zellrasen (Abbildung 17C). Eine zeitliche Analyse dieser Feldpotentiale half die Latenzzeiten und somit die Ausbreitungsrichtung der elektrischen Erregung zu ermitteln. Dadurch ließ sich der potentielle Schrittmacherursprung identifizieren. Abbildung 17D zeigt ein Beispiel, in dem eine Erregungswelle im linken oberen Bereich des MEAs begann (roter Bereich) und in die untere rechte Ecke weitergeleitet wurde (blauer Bereich). Ein spontaner nativer Schrittmacher musste sich demnach im oberen linken Bereich des MEAs befinden. Um eine optische Lichtstimulation zu prüfen, wurde ein kleiner Bereich des Zellrasens mit blauen Lichtpulsen rechts des Elektrodenfeldes (475 nm; 10 ms) beleuchtet, wobei die Belichtungsfrequenz höher war als die spontane Schrittmacherfrequenz. Das belichtete Zellareal befand sich außerhalb des Elektrodenbereichs. Abbildung 17E zeigt die Feldpotentialmessung einer einzelnen Elektrode. Darin ist zu erkennen, dass nach jedem

Lichtpuls (blaue Punktmarkierung) ein Feldpotential ausgelöst wurde. Eine dazugehörige Analyse der Erregungsausbreitung verdeutlicht zudem einen Wechsel der Ausbreitungsrichtung, bei dem das Schrittmacherareal mit dem beleuchteten Bereich übereinstimmte. In dem dargestellten Beispiel führte eine Belichtung im Bereich rechts des Elektrodenfelds zu einem entsprechenden Schrittmacherwechsel aus dieser Richtung (Abbildung 17F).

Zur Aufrechterhaltung einer stabilen Schrittmacheraktivität war ein Minimum an Lichtenergie notwendig. Um einen Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Belichtungszeit zu ermitteln, wurden 40 aufeinanderfolgende Lichtpulse appliziert, die ohne Unterbrechung zu Erregungen der HL-1 Zellen führen sollten. Variationen der Lichtenergie ergaben, dass bei einer niedrigeren Belichtungszeit eine erhöhte Lichtenergie nötig war, um eine stabile Stimulation zu gewährleisten (Abbildung 17G).

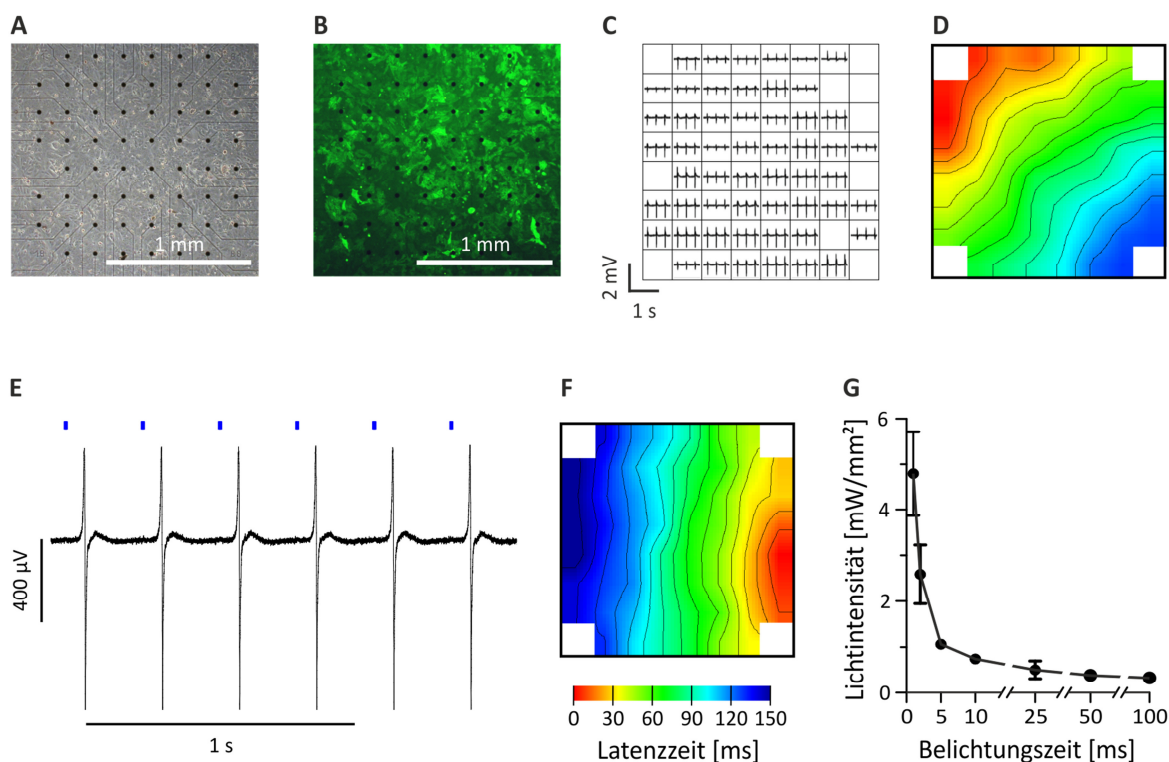


Abbildung 17: Funktionalität der Chr2-eYFP exprimierenden HL-1 Kardiomyozyten. (A) MEA mit einer konfluenten HL-1 Zellschicht und (B) gleichverteilter Fluoreszenz von eYFP-positiven HL-1 Zellen. (C) Feldpotentiale zeigen ein spontan aktives HL-1 Synzytium. (D) Analyse der Latenzzeit hilft bei der Ermittlung der Erregungsausbreitung, von links oben in den rechten unteren Bereich. (E) Lokale Lichtstimulation rechts der Elektroden (10 ms; $0,677 \text{ mW/mm}^2$; 3,5 Hz) führt zu Feldpotentialen nach jedem Lichtpuls. (F) Lokale Lichtstimulation rechts der Elektroden verursacht eine Erregungsausbreitung vom Ort der Lichtstimulation. (G) Eine stabile Lichtstimulation ist von der Lichtintensität und Belichtungszeit abhängig.

4.2.3 Globale Stimulation und räumliche Summation der Feldpotentiale

Messungen von elektrischer Aktivität mittels MEAs ist eine elegante Technik, um Schrittmacheraktivität, Kopplung und elektrische Weiterleitung innerhalb eines Synzytiums zu untersuchen. Daneben lassen sich elektrophysiologische Eigenschaften der Zellen betrachten, indem die gemessenen Feldpotentiale zur genaueren Analyse herangezogen werden. So korreliert die Länge der Feldpotentiale mit der Aktionspotentialdauer. Jedoch können die einzelnen Feldpotentiale in ihrer Form und Größe stark voneinander abweichen (Abbildung 18B) (Halbach et al., 2003). Eine Möglichkeit einen Mittelwert aus allen Feldpotentialen zu bilden, würde eine objektivere Analyse zulassen. Bisher war die Bildung eines gemittelten Feldpotentials jedoch nicht möglich, da die Feldpotentiale aufgrund der Erregungsweiterleitung und der daraus resultierenden Verzögerung zeitlich versetzt vorlagen. Eine Lösung wäre eine gleichzeitige Erregung aller Zellen, so dass alle Feldpotentiale zeitgleich zu messen wären. Im Gegensatz zur elektrischen Stimulation bieten nun die ChR2-eYFP exprimierenden HL-1 Zellen eine erste Möglichkeit das gesamte Synzytium synchron zu aktivieren. Durch globale Beleuchtung (Abbildung 18A) können alle Zellen gleichzeitig erregt werden (Abbildung 18B, C). Eine Fortleitung der Erregungswelle war so nicht mehr sichtbar (Abbildung 18C), da alle Feldpotentiale immer zur gleichen Zeit direkt nach der Belichtung starteten (Abbildung 18D oben). In einer Offline-Analyse konnten alle Feldpotentiale zusammengerechnet werden, um ein durchschnittliches Feldpotential zu erhalten (Abbildung 18D unten). Das gemittelte Feldpotential diente der weiteren Auswertung zur Feldpotentialdauer durch Bestimmung der Zeitdifferenz zwischen Minimum und Maximum des Feldpotentials. Stimulationen mit unterschiedlichen Belichtungsfrequenzen konnten hierbei eine leichte und signifikante Zunahme der Feldpotentialdauer bei höheren Frequenzen aufzeigen (Abbildung 18E, F). Um eine deutliche Verlängerung der Feldpotentialdauer auszulösen, wurde der Kaliumkanalblocker 4-Aminopyridin (100 μM) verwendet, welcher zu einer Aktionspotentialverlängerung in Kardiomyozyten führt. Abbildung 18G zeigt eine drastische Verlängerung der Feldpotentiale im Vergleich zu Kontrollmessungen. Eine Auswertung der Feldpotentialdauer verdeutlicht den signifikanten Anstieg von ca. 10 ms auf 55 ms durch 4-Aminopyridin bei allen untersuchten Stimulationsfrequenzen (Abbildung 18H). In Zukunft ließe sich dieses System für vereinfachte Wirkstofftests an Kardiomyozyten einsetzen.

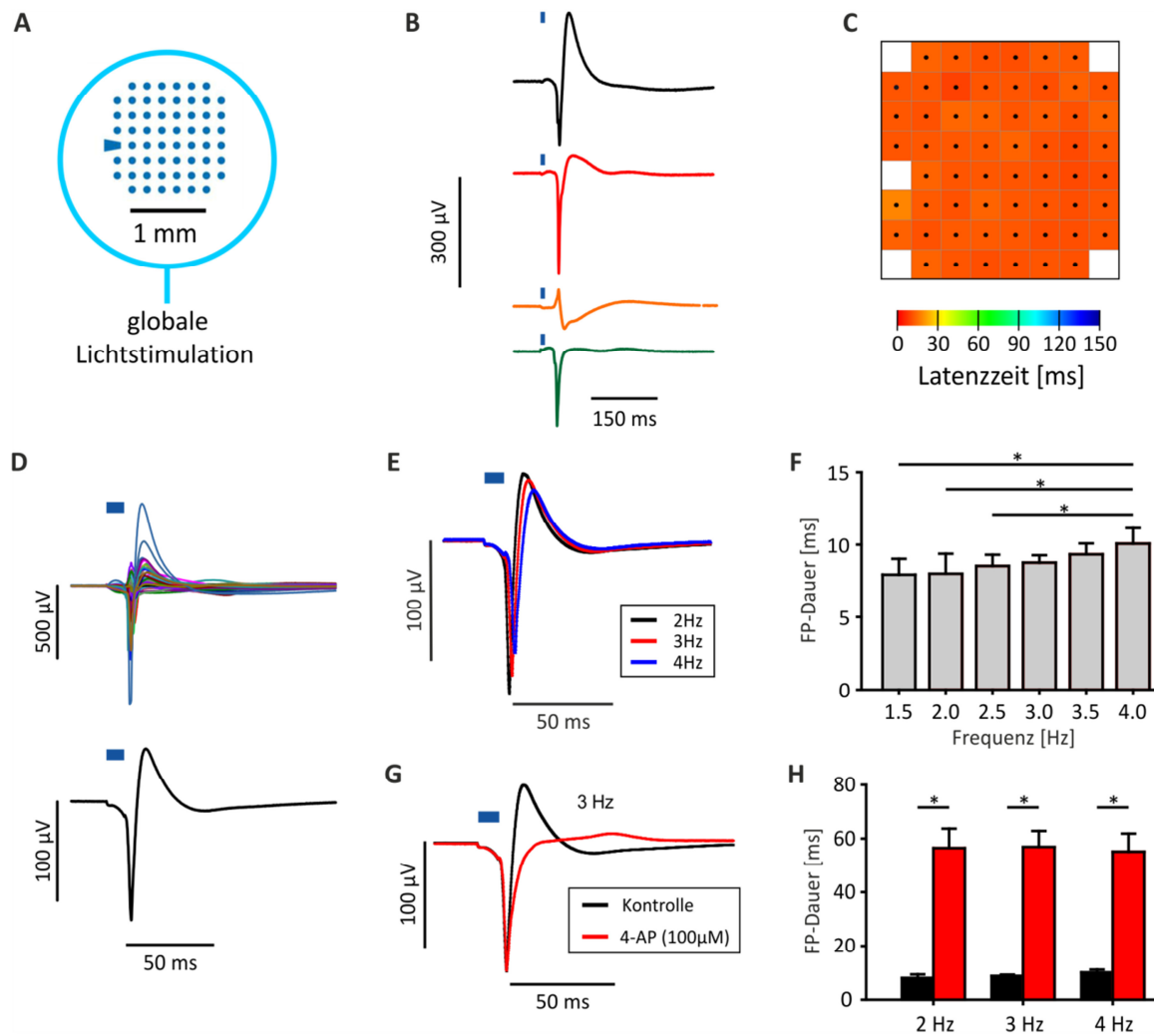


Abbildung 18: Globale Stimulation der Chr2-eYFP exprimierenden HL-1 Zellen und räumliche Summation der Feldpotentiale. (A) Schema der globalen Stimulation durch Beleuchtung des gesamten Elektrodenfeldes. (B) Feldpotentiale von vier unterschiedlichen Elektroden, die bei globaler Beleuchtung (blauer Balken: 10 ms; 0,677 mW/mm²) simultan erregt werden. Die Form und Gestalt kann dabei sehr unterschiedlich sein. (C) Analyse der Latenzzeit verdeutlicht die simultane Aktivierung der Zellen. (D) Überlagerung aller gemessenen Feldpotentiale (oben), welche räumlich gemittelt ein rauschfreies Feldpotential ergeben (unten). (E) Gemittelte Feldpotentiale von HL-1 Zellen, die mit verschiedenen Frequenzen optisch stimuliert wurden. (F) Auswertung der Feldpotentialdauer durch Bestimmung der Zeitdifferenz aus Minimum und Maximum der gemittelten Feldpotentiale mit unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen von 1,5 bis 4 Hz (SD; n=3; t-Test: p < 0,05). (G) Beispiel eines gemittelten Feldpotentials (Stimulationsfrequenz: 3 Hz) mit und ohne Verwendung des Kaliumkanalblockers 4-Aminopyridin (4-AP: 100 µM). (H) Analyse der Feldpotentialdauer verdeutlicht eine signifikante Verlängerung von 10 ms auf 55 ms unter 4-Aminopyridin Wirkung (SD; n=3; t-Test: p < 0,01).

4.2.4 Lokale Transduktion von RRL-EF1 α -ChR2-eYFP Lentiviren

Die Expression von ChR2 in HL-1 Zellen ermöglicht eine optische Stimulation, so dass ChR2 theoretisch als Ersatzschrittmacher eingesetzt werden kann. Damit ist ChR2 besonders geeignet, um im Folgenden eine Schrittmachergenerierung aufgrund lokaler Expression von ChR2 innerhalb eines Kardiomyozytenverbunds zu untersuchen. Dafür wurde die Methode zur lokalen Transduktion angewendet (siehe Kapitel 4.1.1), um mit Hilfe der RRL-EF1 α -ChR2-eYFP Lentiviren eine lokalisierte ChR2-Expression innerhalb eines HL-1 Zellrasens zu erhalten. Dazu wurden aus Lentiviren und SO-Mag5 Partikeln Komplexe gebildet, welche in einem Verhältnis von 50 fg Eisen/VP gekoppelt wurden. Ein lokales Transduktionsexperiment (0,22 μ g Eisen/Versuch) erfolgte mit der geraden 1 mm Magnetspitze und MEAs, auf denen ein konfluenter HL-1 Zellrasen ausgesät war. Nach drei bis vier Tagen war eine starke regional begrenzte eYFP-Expression mit einem Durchmesser von ca. 1 mm rechts der MEA-Elektroden sichtbar, wohingegen im restlichen Bereich des MEAs kaum Zellen transduziert waren (Abbildung 19A, B).

Zur Auswertung der Schrittmacheraktivität wurden Feldpotentiale des MEAs gemessen und die Erregungsausbreitung über die Elektroden ermittelt. In Abbildung 19C ist eine Kontrollmessung ohne Lichtstimulation der transduzierten Zellen dargestellt. Die Messung der Feldpotentiale zeigte spontane Aktivität und Kopplung des HL-1 Zellrasens (Abbildung 19C Mitte). Die Weiterleitung über die Zellen verlief vom oberen in den unteren Bereich des MEAs, so dass von einem spontanen Schrittmacher oberhalb der MEA-Elektroden auszugehen war (Abbildung 19C rechts).

Zur Aktivierung einer optischen Schrittmacheraktivität wurde der transduzierte Zellbereich mit Lichtimpulsen (475 nm; 2,7 mW/mm²; 20 ms) stimuliert (Abbildung 19D links), wobei eine Belichtungsfrequenz stets höher war als die Spontanfrequenz. Dabei folgte auf jeden Lichtimpuls eine Erregungswelle über die Elektroden, was sich in einem Frequenzanstieg widerspiegelte (siehe Abbildung 20A). Eine Analyse der Erregungweiterleitung verdeutlicht zudem einen Richtungswechsel, der seinen Ursprung in der transduzierten und beleuchteten Region hatte (Abbildung 19D). Belichtungen außerhalb des transduzierten Bereichs führten nicht zur optischen Stimulation.

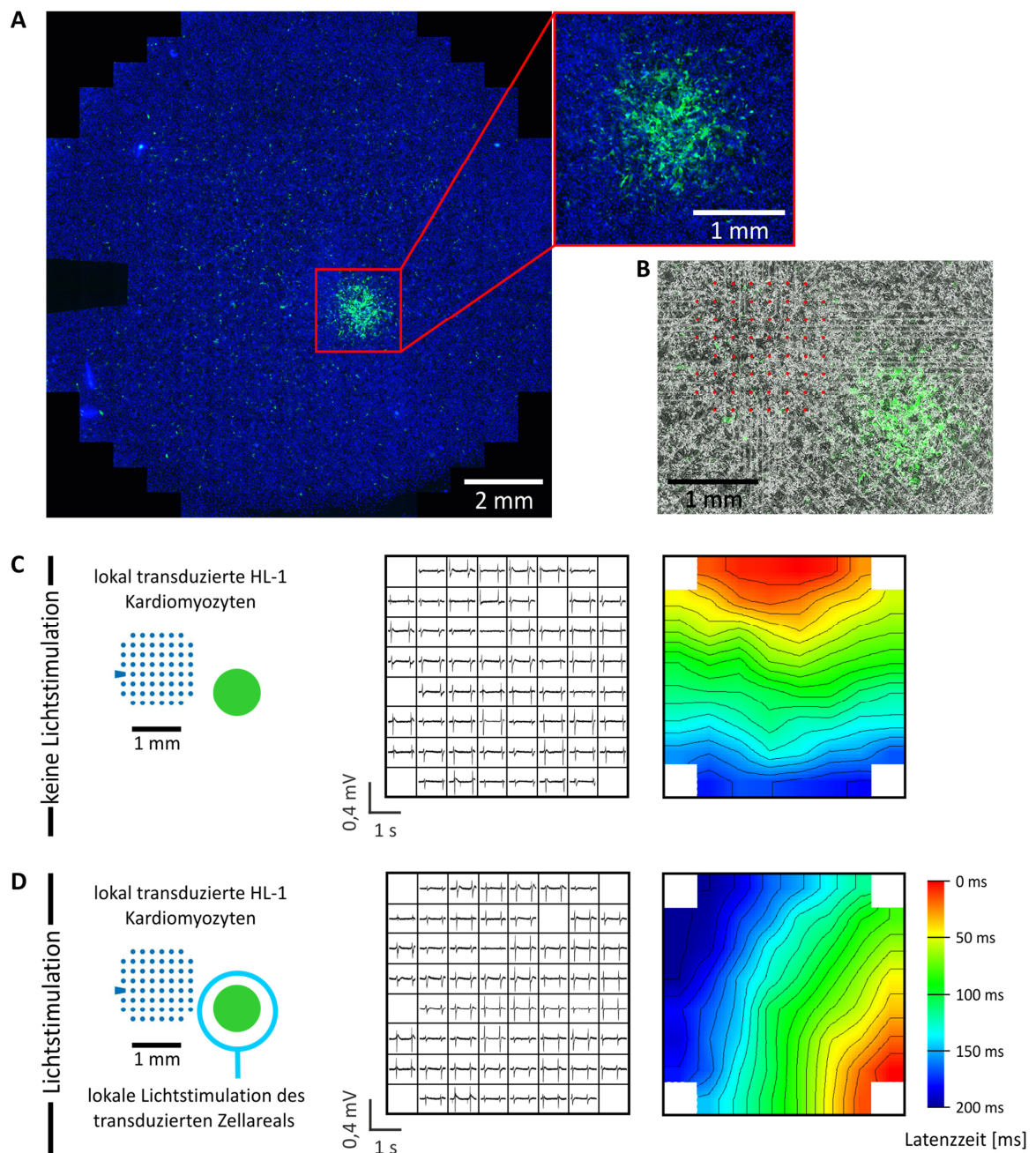


Abbildung 19: Lokale Transduktion von HL-1 Kardiomyozyten mit dem Chr2-Lentivirus. (A) Übersichtsbild eines MEAs mit HL-1 Synzytium mit lokaler Expression von Chr2-eYFP (grün), inklusive Vergrößerung des transduzierten Bereichs (Kernfärbung mit Hoechst in blau). (B) Durchlichtaufnahme mit Elektroden (rote Punkte) und transduzierten Kardiomyozyten im rechten Bereich der MEA-Elektroden (grün). (C) Schematische Darstellung des MEAs mit entsprechender Transduktionsstelle rechts der Elektroden und MEA-Messungen mit Analyse der Latenzzeit ohne Beleuchtung. (D) Schematische Darstellung des MEAs mit entsprechender Transduktionsstelle rechts der Elektroden und MEA-Messungen mit Analyse der Latenzzeit unter Beleuchtung des transduzierten Zellareals (grün).

Bei den Untersuchungen zur optischen Schrittmacheraktivität durch Lichtstimulation der transduzierten Zellen war die Stabilität von wesentlicher Bedeutung. Stabilität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass durch jeden applizierten Lichtpuls eine Erregungswelle entsteht, die sich über den Zellrasen ausbreitet. Erst wenn 20 hintereinander applizierte Lichtpulse die Zellen ohne Unterbrechung erregen konnten, wurde dies als stabiler optischer Schrittmacher anerkannt. Für eine stabile Stimulation waren hierbei hohe Lichtintensitäten von $2,7 \text{ mW/mm}^2$ mit einer Belichtungszeit von 20 bis 50 ms notwendig (Abbildung 20A). In einem Fall konnte sogar kein stabiler Schrittmacher übernommen werden, jedoch wurde eine Unterbrechung der spontanen Schrittmacheraktivität beobachtet (Abbildung 20B).

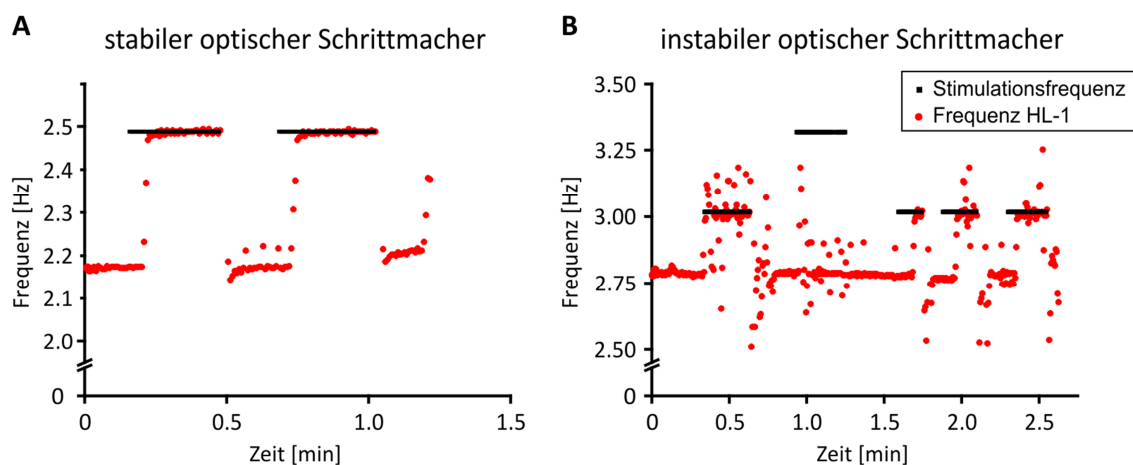


Abbildung 20: Darstellung der Frequenz bei optischer Stimulation des transduzierten Bereichs. (A) Optisch stabiler Schrittmacher, bei dem der HL-1 Zellrasen die Frequenz übernimmt. (B) Optische Stimulation zeigt keine stabile Frequenzübernahme der HL-1 Zellen, jedoch ist die Eigenfrequenz der HL-1 Zellen gestört.

Neben den hier gezeigten lokalen Transduktionsversuchen mit SO-Mag5, bei denen eine verminderte Menge an MNPs eingesetzt wurde ($0,22 \mu\text{g Eisen/Versuch}$), fanden auch Versuche mit hohem Eisenanteil statt ($1,8 \mu\text{g Eisen/Versuch}$). Dadurch sollte eine höhere Transduktionseffizienz erreicht werden. Hierbei konnten jedoch in keinem Versuch die HL-1 Zellen stabil stimuliert werden, trotz eines kräftigen eYFP-Signals im transduzierten Bereich (siehe Kapitel 4.1.4).

Weiterhin wurde PEI-Mag2 als alternativer MNP getestet. Aufgrund seiner zuvor gezeigten Zelltoxizität in hoher Konzentration (siehe Kapitel 4.1.3) musste eine geringere MNP-Menge eingesetzt werden ($0,3 - 0,6 \mu\text{g Eisen/Versuch}$). Jedoch zeigte sich auch in diesen Versuchen, dass eine stabile optische Lichtstimulation nur unzureichend möglich und reproduzierbar war. Eine Übersicht aller Versuche ist in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Übersicht der lokalen Transduktionsexperimente mit RRL-EF1 α -ChR2-eYFP

MNPs	Eisenmenge/ Versuch [$\mu\text{g Fe}$]	Eisenmenge/ Fläche * [$\mu\text{g Fe}/\text{mm}^2$]	Virus- bindung [fg Fe/VP]	Lichtstimulation		
				stabil	nicht stabil	nicht möglich
PEI-Mag2	0,3 - 0,6	0,12 - 0,25	200	2	6	4
SO-Mag5	~ 1,8	~ 0,76	200	0	4	6
SO-Mag5	~ 0,22	~ 0,1	50	4	1	0

(* bei der Annahme, dass 75% der eingesetzten Eisenmenge pro Versuch auf eine Fläche mit dem Radius von 750 μm angezogen werden)

Als Resultat ist festzuhalten, dass lokale Transduktionen prinzipiell *in vitro* genutzt werden können, um einen lokalisierten optischen Schrittmacher herzustellen. Methodisch lieferte dafür die gerade 1 mm Magnetspitze die besten Transduktionsergebnisse. Ein wichtiger Einflussfaktor für eine erfolgreiche Generierung nimmt dabei der ausgewählte MNP und die eingesetzte Eisenmenge ein. So konnten unter den getesteten MNPs, die SO-Mag5 Partikel die besseren Ergebnisse liefern, jedoch ausschließlich unter der Bedingung, dass die Transduktion mit einer geringen Eisenmenge durchgeführt wurde.

4.3 Möglichkeiten zur Generierung eines biologischen Ersatzschrittmachers

In der Literatur sind zahlreiche Möglichkeiten beschrieben, um biologische Schrittmacheraktivität in Kardiomyozyten herzustellen. In diesem Teil der Arbeit sind unterschiedliche Ansätze aufgegriffen worden, um eine Schrittmacheraktivität *in vitro* zu erzeugen. Eine klassische Möglichkeit ist eine Überexpression von Schrittmacherkanälen (HCN-Kanäle), welche die Einwärtsströme der Zellen steigern. Daneben können auch Gene herunterreguliert werden, die für das Ruhemembranpotential der Herzmuskelzelle verantwortlich sind, wie es bereits mit Hilfe des dominant negativen K_{ir} -Kanals (Kir2.1AAA) gezeigt wurde (Miake et al., 2002, 2003). Eine erst kürzlich vorgestellte Initiierung von Schrittmacheraktivität erfolgte durch Überexpression von Transkriptionsfaktoren Tbx18 (Kapoor et al., 2012).

4.3.1 Erhöhung des Schrittmacherpotentials (I_f) durch Überexpression des HCN4-Kanals

4.3.1.1 Klonierung des Transgenvektors pRRL-EF1 α -HCN4-eGFP

Zur gentherapeutischen Generierung eines Schrittmachers wird häufig auf eine Überexpression von klassischen Schrittmacherkanälen, wie die HCN-Kanäle, zurückgegriffen. Die im Sinusknoten vorkommende dominante Isoform HCN4 (Shi et al., 1999) konnte bereits erfolgreich eingesetzt werden, um nach Injektion im linken Ventrikel (Schwein) Schrittmacheraktivität erzeugen zu können (Cai et al., 2007). Die HCN4 Isoform war ein ausgewählter HCN-Kanal und wurde in einen Transgenvektor zur Herstellung von Lentiviren kloniert. Die Klonierungsstrategie für den Vektor pRRL-EF1 α -HCN4-eGFP ist in Abbildung 21 dargestellt. Als Ausgangsvektor diente ein pRRL-EF1 α -eGFP-Plasmid, welches bereits alle wichtigen Viruselemente und den Promoter enthielt. Das eGFP-Fragment konnte mittels einer Doppelrestriktion mit Eco47III und Sall und anschließender Gelextraktion entfernt werden. Das Fusionsprotein HCN4-eGFP wurde mit denselben Restriktionsenzymen herausgeschnitten, so dass es gerichtet in den Vektor ligiert werden konnte. Ein Restriktionsverdau mit Eco47III mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte eine Bandenverteilung bei 6641, 3733, 604 und 23 bp (Daten nicht gezeigt). Eine Sequenzierung an den Schnittstellen bestätigte die erfolgreiche Klonierung.

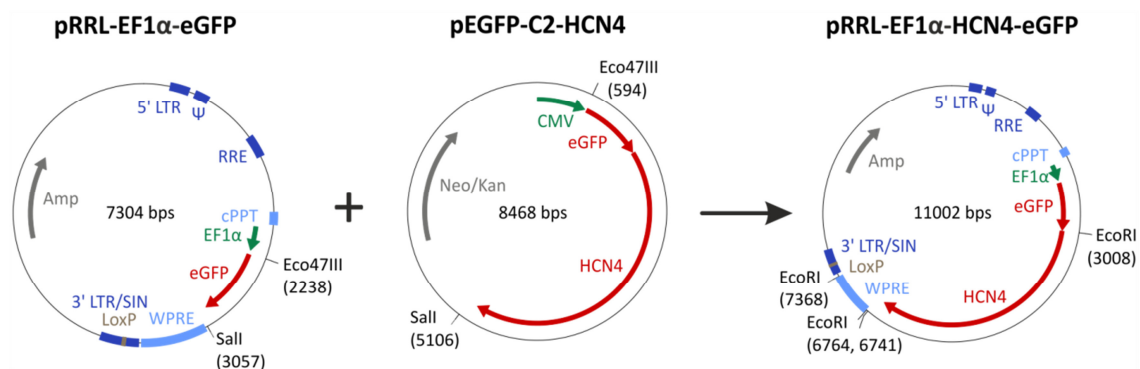


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des pRRL-EF1 α -HCN4-eGFP Konstrukts. Einbringen des HCN4-eGFP Fusionsproteins in einen pRRL-EF1 α -Vektor mit viruspezifischen Elementen.

4.3.1.2 Funktionsanalyse der RRL-EF1 α -HCN4-eGFP Lentiviren auf HEK293 und HL-1 Zellen mit Hilfe der Voltage-Clamp-Technik

Der fertig klonierte Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -HCN4-eGFP wurde von der Arbeitsgruppe Pfeifer zur Herstellung von Lentiviren genutzt (Abbildung 22A). Für einen Test wurden sowohl HEK293 als auch HL-1 Zellen über Nacht transduziert (MOI: 10). Dabei waren nach zwei bis drei Tagen positiv transduzierte Zellen anhand einer eGFP-Fluoreszenz erkennbar. Eine funktionelle Untersuchung erfolgte durch die Arbeitskollegin Dr. Daniela Malan (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) mittels Patch-Clamp-Technik zur Messung von Schrittmacherströmen (I_f -Ströme) in Einzelzellen. Dabei zeigten positiv-transduzierte HEK293 Zellen stets einen I_f -Strom (Abbildung 22C), wohingegen in Kontrollmessungen mit nativen HEK293 Zellen kein I_f -Strom messbar war (Abbildung 22B).

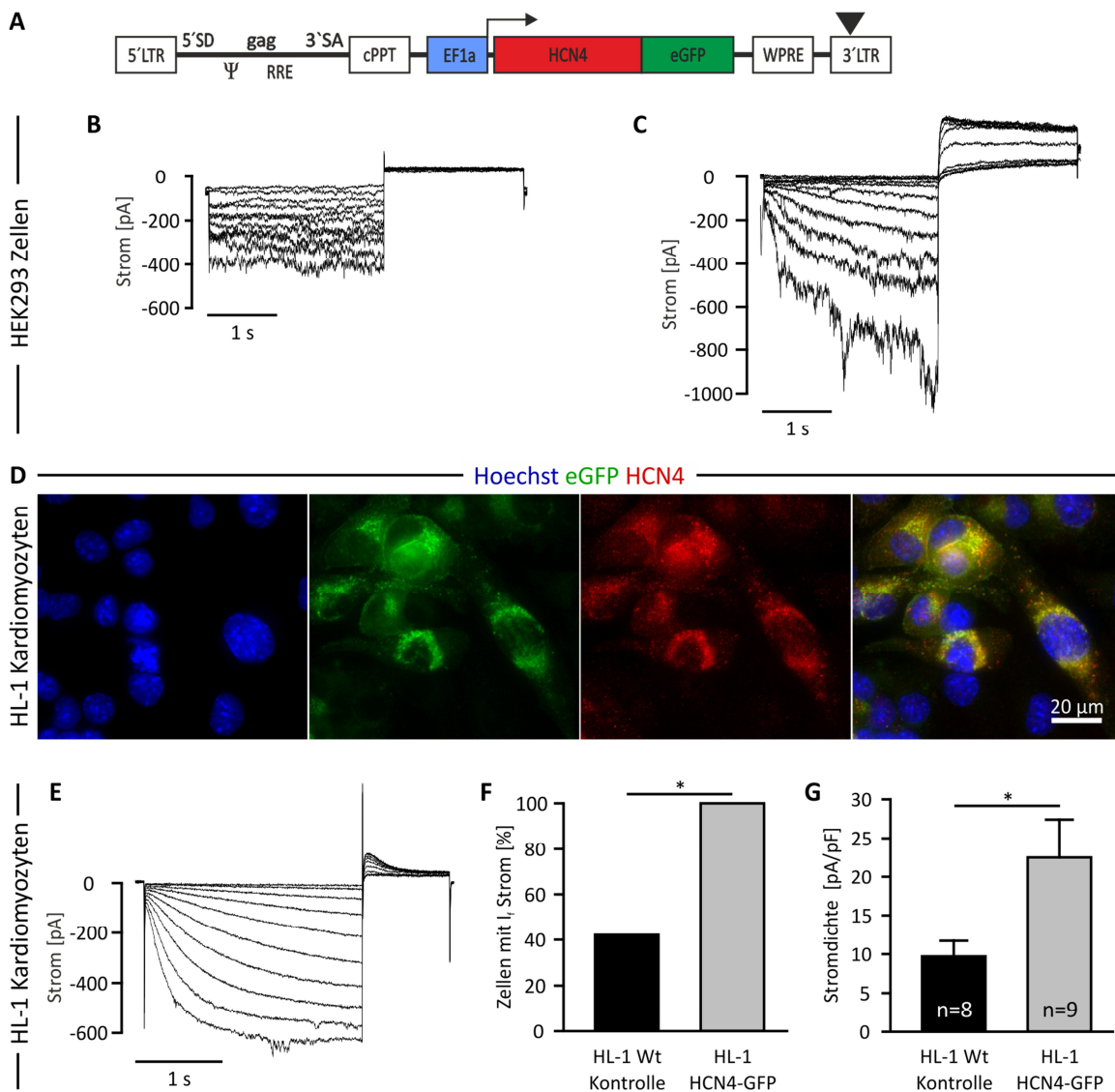


Abbildung 22: Funktionsanalyse des RRL-EF1 α -HCN4-eGFP Lentivirus auf HEK293 und HL-1 Einzelzellen. (A) Schematische Darstellung des Lentivirus mit entsprechenden

virusspezifischen Elementen. (B) Messungen des I_f -Stroms in nicht transduzierten nativen HEK293 und (C) HCN4-eGFP exprimierenden HEK293 Zellen. (D) HCN4-Immunofluoreszenzfärbungen von transduzierten HL-1 Kardiomyozyten (Kernfärbung mit Hoechst in blau, eGFP in grün, HCN4 in rot). (E) Messung des I_f -Stroms einer HCN4-eGFP exprimierenden HL-1 Zelle. (F) Auswertung des relativen Anteils an nativen und HCN4-eGFP transduzierten HL-1 Kardiomyozyten mit vorhandenem I_f -Strom (Fisher Test: $p=0,0035$). (G) Durchschnittliche Stromdichte von nativen und HCN4-eGFP exprimierenden HL-1 Zellen (SD; t-Test: $p=0,049$).

In Abbildung 22D sind mikroskopische Aufnahmen von HL-1 Kardiomyozyten dargestellt, welche aufgrund der eGFP-Fluoreszenz eine klare Expression des Fusionsproteins (HCN4-eGFP) erkennen lassen. Immunofluoreszenzfärbungen mit HCN4-Antikörpern zeigen zudem eine gute Überlagerung mit der eGFP-Expression (Abbildung 22D). HL-1 Kardiomyozyten besitzen die Besonderheit, dass sie zu einem gewissen Anteil spontane Schrittmacheraktivität aufweisen. In Kontrollmessungen von HL-1 Wildtypzellen hatten ca. 40% einen messbaren I_f -Strom, was mit publizierten Werten übereinstimmt (Sartiani et al., 2002). Im Vergleich dazu konnte bei allen positiv-transduzierten HL-1 Zellen ein I_f -Strom nachgewiesen werden (Abbildung 22E, F). Eine weitere Analyse der gemessenen HL-1 Zellen mit I_f -Strom konnte eine Erhöhung der Stromdichte bei den transduzierten Zellen aufdecken (Abbildung 22G).

Diese Daten belegen, dass Einzelzellen (HEK293 und HL-1) durch die Expression des HCN4-Kanals einen I_f -Strom besitzen und HCN4 damit als potentieller Schrittmacherkandidat in Betracht kam.

4.3.2 Erhöhung des Schrittmacherpotentials (I_f) durch Überexpression eines modifizierten HCN2-Kanals

4.3.2.1 Klonierung des Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP

Ein weiterer interessanter Kandidat zur Schrittmachergenerierung war ein HCN2-Kanal, welcher vorzugweise im Sinusknoten exprimiert wird. Bucchi et al. stellte eine Mutation des HCN2-Kanals vor, welche eine schnellere Aktivierung und eine Verschiebung zu positiveren Potential aufweist (Bucchi et al., 2006). Mit diesen Eigenschaften ist der mutierte HCN2-Kanal eine aussichtsreiche Variante zur Manipulation der Schrittmacheraktivität in Kardiomyozyten. Für die Herstellung entsprechender Lentiviren musste der Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP kloniert werden (Abbildung 23). Als Ausgangsvektor diente der Vektor pRRL-EF1 α -HCN2-eGFP,

der bereits parallel zum Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -HCN2-eGFP hergestellt wurde (siehe Kapitel 4.3.1.1). Dieser enthielt alle wichtigen Viruselemente, so dass mittels Doppelrestriktion mit Eco47III und NotI das HCN2-eGFP-Fragment entfernt werden konnte. Das pDCIE-mHCN2(E324A) Plasmid hatte bereits eine angehängte IRES-eGFP Sequenz, so dass das gesamte Fragment mit den Restriktionsenzymen SmaI und NotI herausgeschnitten wurde. Eine zusätzliche Restriktion mit DraI fragmentierte das restliche Rückgrat des Plasmids, damit eine deutlichere Auftrennung in der Gelelektrophorese vollzogen werden konnte. Über die Schnittstellen konnte das Insert gerichtet in den Vektor ligiert werden. Ein Restriktionsverdau durch KpnI mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte die erwartete Bandenverteilung bei 5849, 1620, 1554 und 1487 bp (Daten nicht gezeigt). Eine Sequenzierung an den Schnittstellen bestätigte die erfolgreiche Klonierung.

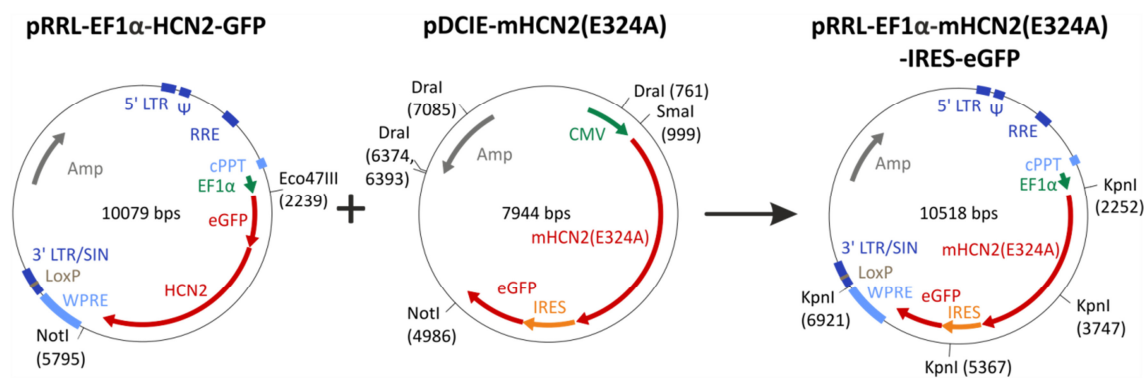


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des pRRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP Konstrukts. Einbringen des mHCN2(E324A)-IRES-eGFP Fragmentes in einen pRRL-EF1 α -Vektor für die Herstellung eines Lentivirus mit entsprechenden virusspezifischen Elementen.

4.3.2.2 Funktionsanalyse der RRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP Lentiviren auf HL-1 Zellen durch fluoreszenzbasierte Kalziummessung

Der Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP diente der Herstellung entsprechender Lentiviren durch die Arbeitsgruppe Pfeifer (Abbildung 24A). Zur Überprüfung wurden HL-1 Zellen über Nacht mit den Lentiviren transduziert. Nach zwei bis drei Tagen waren positiv-transduzierte Zellen anhand einer zytosolischen eGFP-Expression erkennbar. Da native HL-1 Zellen HCN2-Kanäle exprimieren (Sartiani et al., 2002), bestätigten HCN2 Antikörperfärbungen sowohl bei nativen als auch positiv transduzierten HL-1 Zellen eine HCN2-Expression (Abbildung 24B).

Da eine Patch-Clamp Analyse mit HL-1 Zellen sehr schwierig und zeitaufwendig ist, erfolgte eine Analyse der spontanen Schrittmacheraktivität und eine Untersuchung der

exprimierten HCN2(E324A)-Kanäle mittels fluoreszenzbasierter Kalziummessung (Ca^{2+} -*Imaging*). Dadurch lassen sich Kalzium-Transienten in Einzelzellen messen, die Aussagen über eine spontane Schrittmacheraktivität zulassen. Eine Auszählung der spontan aktiven Zellen, d.h. der Zellen mit einem regelmäßigen auftretenden Kalzium-Transienten, zeigte einen erhöhten Anteil bei transduzierten Zellen im Vergleich zu nativen HL-1 Zellen (Kontrolle). So waren 40% der nativen HL-1 Zellen spontan aktiv, wohingegen transduzierte Zellen einen Anteil von 65% aufwiesen (Abbildung 24C). Zur weiteren Analyse wurde in beiden Gruppen die Frequenz in den spontan aktiven Zellen ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 24D zu sehen, welches eine signifikant erhöhte Frequenz von transduzierten Zellen vorweist.

Die Expression der mutierten HCN2-Isoform konnte in HL-1 Zellen die Schrittmacheraktivität deutlich erhöhen, so dass auch HCN2 als potentieller Schrittmacherkandidat in Betracht kam.

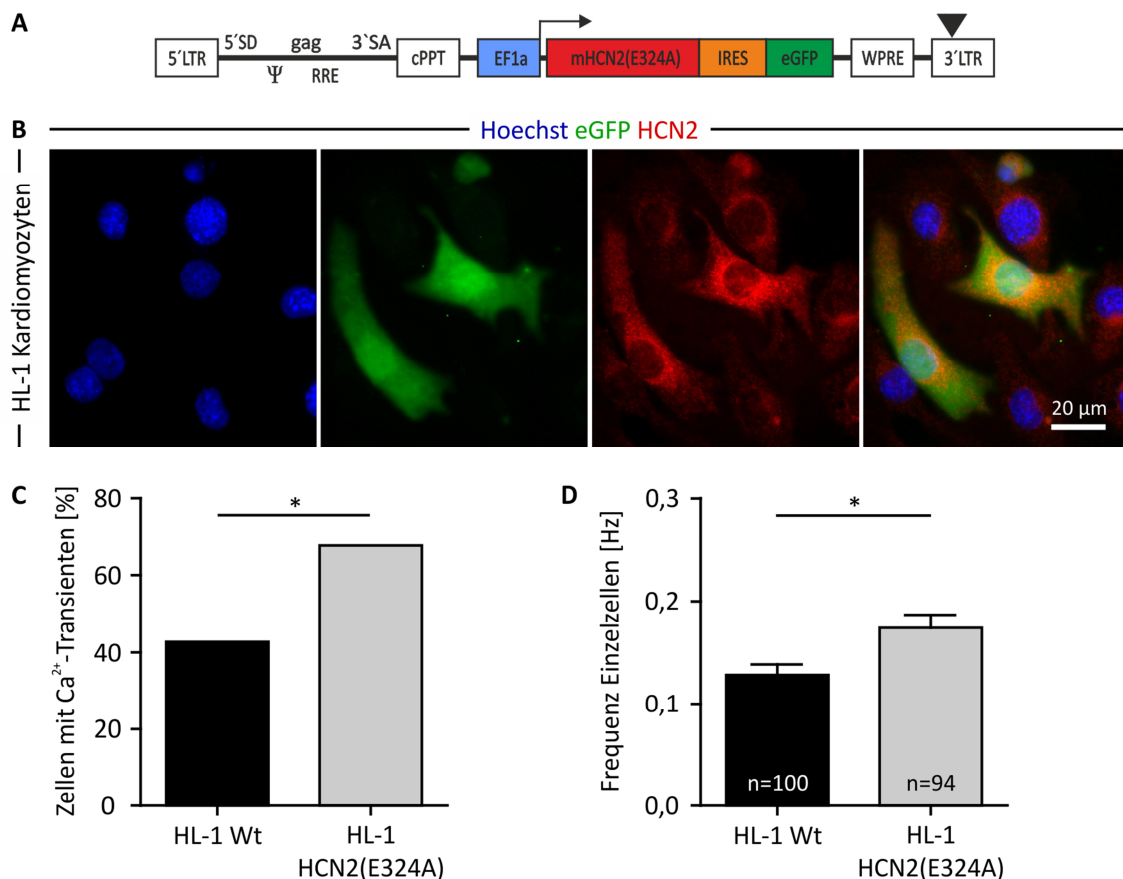


Abbildung 24: Funktionsanalyse des RRL-EF1 α -mHCN2(E324A)-IRES-eGFP Lentivirus auf HL-1 Einzelzellen. (A) Schematische Darstellung des Lentivirus mit entsprechenden viruspezifischen Elementen. (B) HCN2-Immunofluoreszenzfärbungen von transduzierten HL-1 Kardiomyozyten (Kernfärbung mit Hoechst in blau, eGFP in grün, HCN2 in rot). (C) Spontan aktiver Anteil an Zellen mit Ca^{2+} -Transienten (Fisher Test: $p=0,0001$). (D) Frequenzanalyse von HL-1 Einzelzellen mit Ca^{2+} -Transienten (SEM; t-Test: $p=0,0056$).

4.3.3 Inhibition des Ruhemembranpotentials durch Expression eines dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals

4.3.3.1 Klonierung des Transgenvektors pRRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP

Eine weitere Methode der Schrittmachergenerierung wurde von Miake et al. vorgestellt. Durch die Expression eines dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals gelang es das Ruhemembranpotential (I_{K1}) zu inhibieren und dadurch eine Schrittmacheraktivität herzustellen (Miake et al., 2003, 2002). Um dieses Prinzip zur Schrittmachergenerierung zu nutzen, wurde der Transgenvektor pRRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP für die Herstellung von Lentiviren kloniert (Abbildung 25). Als Ausgangsvektor diente das pRRL-EF1 α -HCN2-eGFP Plasmid, welches alle virusspezifischen Elemente enthielt. Das Entfernen des HCN2-eGFP-Fragmentes geschah mittels Doppelrestriktion mit Eco47III und NotI. Da das Plasmid bereits das mutierte Kir2.1AAA-Fragment mit einer IRES-eGFP Sequenz enthielt, konnte das gesamte Fragment mit den Restriktionsenzymen XhoI und NotI herausgeschnitten werden. Nach Auffüllen der Überhänge wurde eine ungerichtete *blunt-end* Ligation durchgeführt. Über eine Testrestriktion mit Sall konnte ein Klon mit der gewünschten Inserierungsrichtung identifiziert werden. Diese zeigten zwei signifikante Banden bei 7795 und 1378 bp (Daten nicht gezeigt). Eine Sequenzierung an den Schnittstellen bestätigte die erfolgreiche Klonierung.

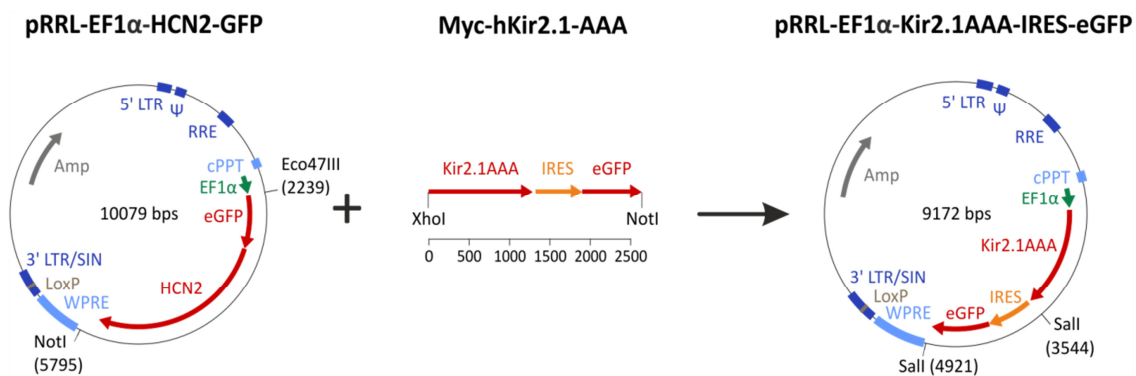


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Klonierung des pRRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Konstrukts. Einbau des mutierten Kir2.1AAA-Fragmentes in einen pRRL-EF1 α -Vektor für die Herstellung eines Lentivirus mit entsprechenden virusspezifischen Elementen.

4.3.3.2 Funktionsanalyse der RRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Lentiviren auf HL-1 Zellen durch fluoreszenzbasierte Kalziummessung

Der fertig klonierte Transgentransfervektor pRRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP wurde von der Arbeitsgruppe Pfeifer zur Herstellung von Lentiviren genutzt (Abbildung 26A). Diese wurden über Nacht zur Transduktion von HL-1 Zellen eingesetzt, wobei positiv transduzierte Zellen nach zwei bis drei Tagen eine zytosolische eGFP-Expression aufwiesen (Abbildung 26B). Eine Untersuchung der Schrittmacheraktivität erfolgte durch fluoreszenzbasierte Kalziummessungen (Ca^{2+} -Imaging). Eine Auszählung der Zellen mit Schrittmacheraktivität zeigte unter den transduzierten Zellen einen Anteil von 60%. Im Vergleich lag der Anteil bei nativen HL-1 Zellen bei 40% (Abbildung 26C). Des Weiteren wurden die Frequenzen der spontan aktiven Zellen bestimmt. Dabei ergab sich mit 0,2 Hz eine signifikant erhöhte Frequenz bei transduzierten Zellen im Vergleich zu 0,13 Hz bei nativen HL-1 Zellen (Abbildung 26D).

Diese Daten zeigen, dass die Expression eines dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals zur Erhöhung der Schrittmacheraktivität in Einzelzellen führten und dadurch eine weitere Möglichkeit zur Generierung eines Ersatzschrittmachers darstellten.

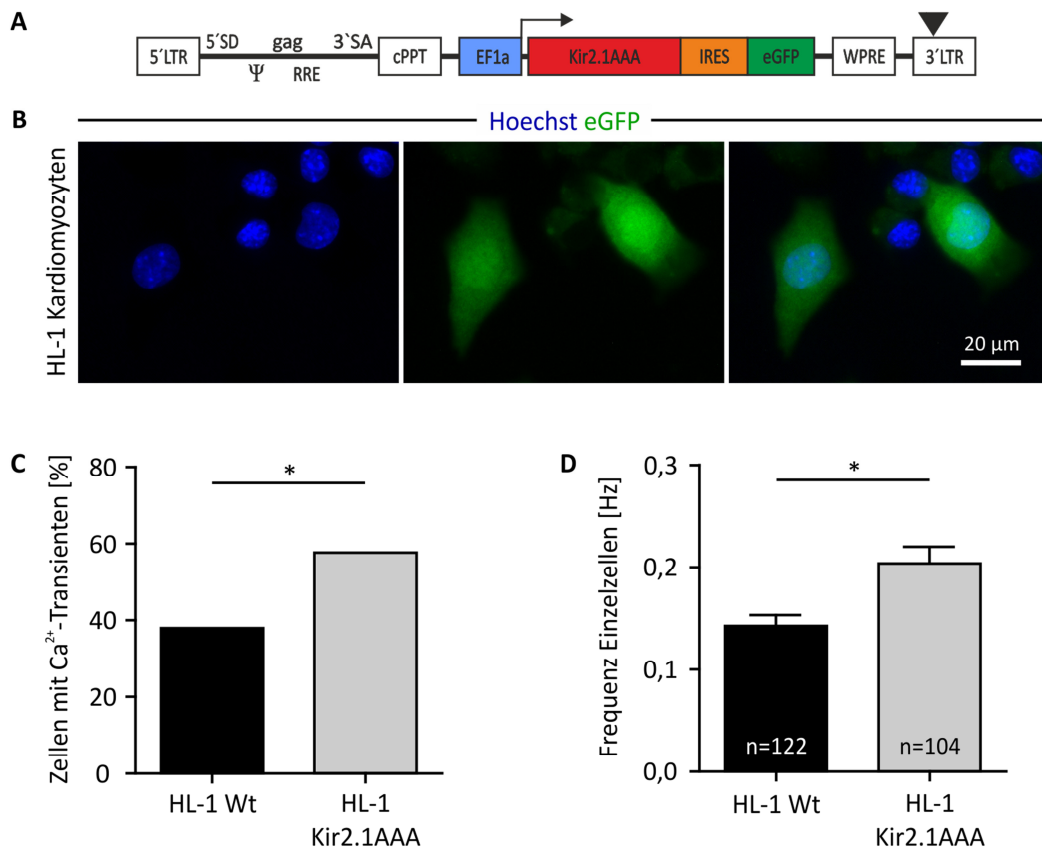


Abbildung 26: Funktionsanalyse des RRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Lentivirus auf HL-1 Einzelzellen. (A) Schematische Darstellung des Lentivirus mit entsprechenden viruspezifischen Elementen. (B) Immunfluoreszenzfärbung von transduzierten HL-1 Kardiomyozyten (Kernfärbung

mit Hoechst in blau, eGFP in grün). (C) Spontan aktiver Anteil an HL-1 Einzelzellen mit Ca^{2+} -Transienten (Fisher Test: $p=0,0001$). (D) Frequenzanalyse von HL-1 Einzelzellen mit Ca^{2+} -Transienten (SEM; t-Test: $p=0,0014$).

4.3.4 Konversion in Schrittmacherzellen durch Überexpression des Transkriptionsfaktors Tbx18

4.3.4.1 Klonierung des Transgentransfervektors pRRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP

Kapoor et al. veröffentlichte vor kurzem eine neue Methode zur Schrittmachergenerierung in adulten Kardiomyozyten, indem der Transkriptionsfaktor Tbx18 verwendet wurde. Tbx18 ist normalerweise für die Entwicklung des Sinusknotens wichtig, doch eine Überexpression in adulten Kardiomyozyten führte zu einer Umwandlung in Schrittmacher-ähnliche Zellen (Kapoor et al., 2012). Dieser Ansatz einer Zellkonversion ist eine vielversprechende Alternative und wurde als eine weitere Möglichkeit zur Schrittmachergenerierung verfolgt.

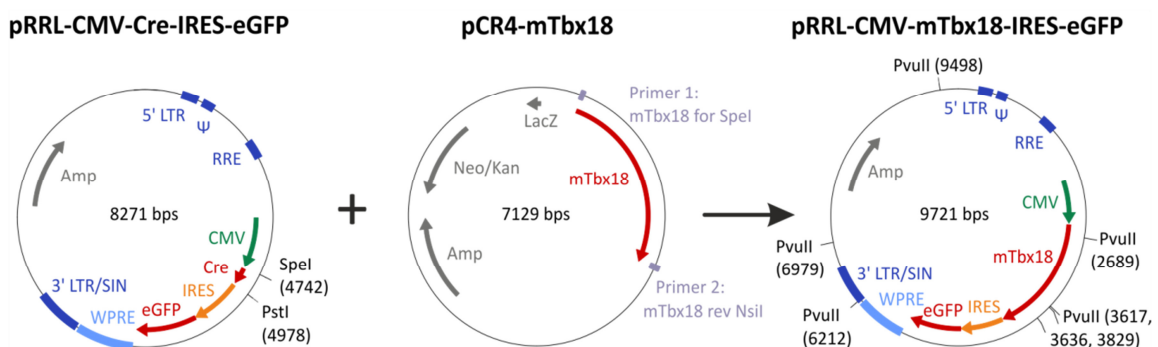


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Klonierung des pRRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP Konstrukts. Austausch der Cre-Sequenz mit dem mTbx18-Fragment in einem pRRL-CMV-Vektor für die Herstellung eines Lentivirus mit entsprechenden viruspezifischen Elementen.

Abbildung 27 stellt die Klonierungsstrategie des Transgentransfervektors pRRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP dar, bei der das murine Tbx18 und eGFP unter einem CMV-Promoter exprimiert werden sollen. Als Ausgangsvektor diente ein pRRL-CMV-Cre-IRES-eGFP Konstrukt der Arbeitsgruppe Pfeifer, welches die spezifischen Viruselemente enthielt. Das Cre-Fragment konnte mittels Doppelrestriktion mit SpeI und PstI und anschließender Gelextraktion entfernt werden. Da beim pCR4-mTbx18 Plasmid keine passenden Restriktionsschnittstellen an den Sequenzenden vorlagen, wurde das Fragment mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden Primer mit entsprechenden

Restriktionsschnittstellen gestaltet, um eine gerichtete Ligation in den Vektor zu erlauben (Tabelle 8). Eine Restriktionskontrolle erfolgte mit PvuII und eine gelelektrophoretische Analyse bestätigte die zu erwartende Bandenverteilung. Eine Sequenzierung bewies die erfolgreiche Klonierung und fehlerfreie PCR-Amplifikation.

Tabelle 8: Verwendete Primer für eine mTbx18 Amplifikation

Primername	Sequenz (eingebaute Schnittstelle in rot)
mTbx18 for SpeI	GATCACTAGTGCGGGGATGGCGGAGAAG
mTbx18 rev NsiI	GATCATGCATTCAGACCATATGTGCAGACACTTGAG

4.3.4.2 Funktionsanalyse der RRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP Lentiviren durch fluoreszenzbasierte Kalziummessung von Kardiomyozyten

Das klonierte Plasmid pRRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP diente zur Erzeugung entsprechender Lentiviren durch die Arbeitsgruppe Pfeifer (Abbildung 28A). Für eine Untersuchung wurden sowohl HL-1 Zellen als auch embryonale Kardiomyozyten mit den Viren transduziert.

Abbildung 28B zeigt HL-1 Zellen, wobei positiv-transduzierte Zellen nach einigen Tagen eine deutliche eGFP-Expression aufwiesen. Zusätzlich bestätigten Immunofluoreszenzfärbungen eine kernständige Tbx18-Expression in eGFP-exprimierenden HL-1 Zellen. Fluoreszenzbasierte Kalziummessungen dienten zur Untersuchung der Schrittmacheraktivität. Eine Auszählung der Zellen mit Schrittmacheraktivität zeigte unter den transduzierten Zellen einen Anteil von 17%. Dieser Wert lag damit deutlich niedriger als bei nativen HL-1 Zellen, welche einen Anteil von ca. 40% aufwiesen (Abbildung 28D).

Zusätzlich wurden embryonale Kardiomyozyten mit Lentiviren transduziert und untersucht. Positiv transduzierte Zellen waren nach zwei bis drei Tagen durch eine eGFP-Expression erkennbar. In Übereinstimmung mit Immunofluoreszenzfärbungen zeigten auch diese Zellen ein kernständiges Tbx18-Signal (Abbildung 28C). Fluoreszenzbasierte Kalziummessungen von transduzierten und nicht transduzierten Kardiomyozyten ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Schrittmacheraktivität. In beiden Gruppen betrug die Frequenz ungefähr 1,2 Hz (Abbildung 28E).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass eGFP-positive Zellen zwar Tbx18 Überexpression aufwiesen, jedoch eine Konversion in Schrittmacherzellen mit erhöhter Schrittmacheraktivität leider nicht festgestellt werden konnte.

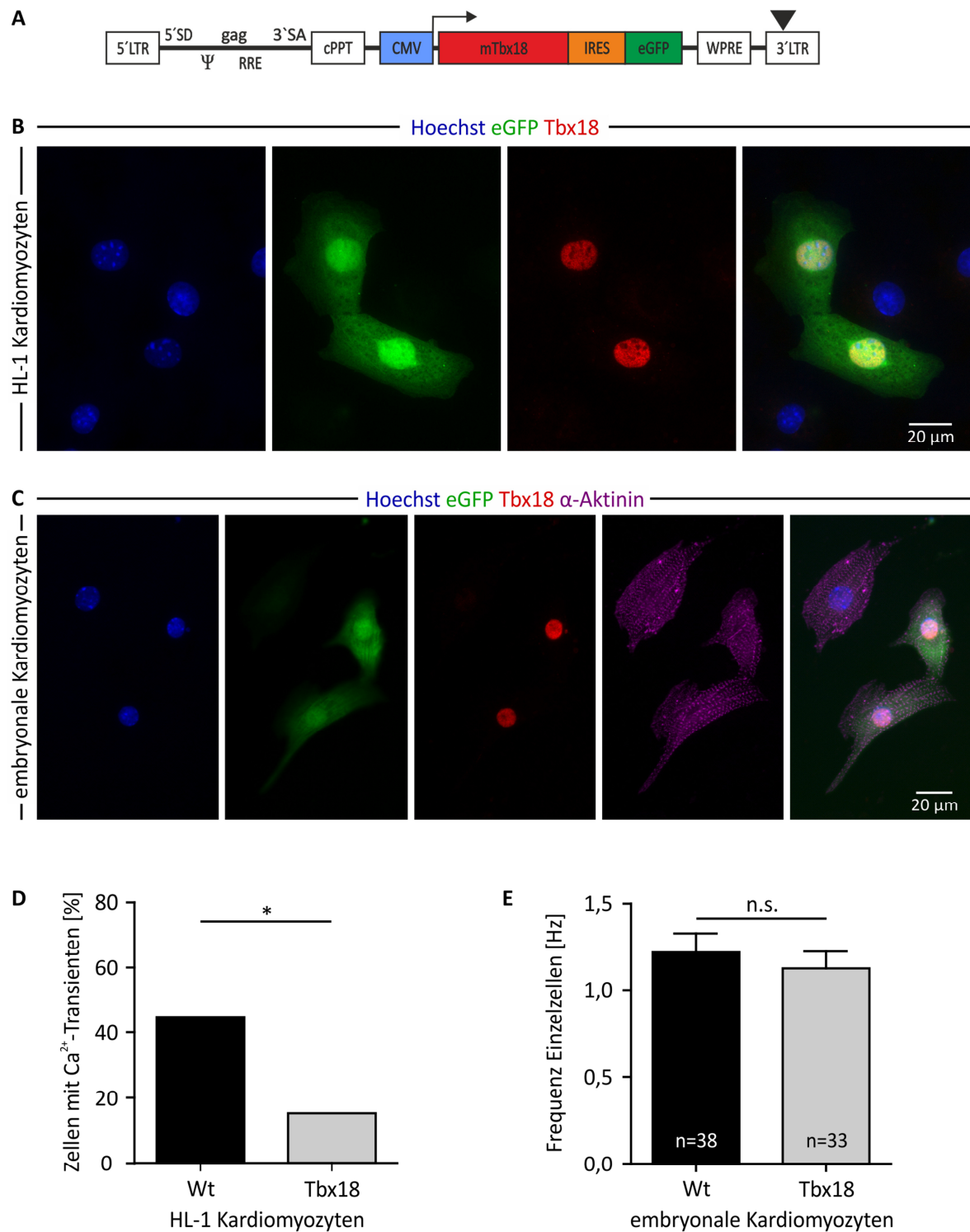


Abbildung 28: Funktionsanalyse des RRL-CMV-mTbx18-IRES-eGFP Lentivirus auf HL-1 Einzelzellen und embryonalen Kardiomyozyten. (A) Schematische Darstellung des Lentivirus mit entsprechenden viruspezifischen Elementen. (B, C) Immunofluoreszenzfärbung von transduzierten HL-1 Kardiomyozyten (B) und von transduzierten embryonalen Kardiomyozyten (C) mit kernständigem Tbx18-Signal (Kernfärbung mit Hoechst in blau, eGFP in grün, Tbx18 in rot, α -Aktinin in violett). (D) Auszählung der HL-1 Einzelzellen mit Ca^{2+} -Transienten (Fisher Test: $p=0,003$). (E) Frequenzanalyse von einzelnen embryonalen schlagenden Kardiomyozyten per Auszählung der Ca^{2+} -Transienten (SEM; t-Test: $p=0,53$; n.s. = nicht signifikant).

4.4 Generierung von biologischen Schrittmachern durch lokale Transduktion *in vitro*

Für eine lokalisierte biologische Schrittmachergenerierung innerhalb eines Synzytiums aus Kardiomyozyten wurde die Methode der lokalen Transduktion eingesetzt und die in Kapitel 4.3 beschriebenen Lentiviren verwendet. Für eine Untersuchung der Schrittmacheraktivität wurden MEAs eingesetzt, deren Feldpotentiale kontinuierlich für den gesamten Versuchszeitraum von bis zu sieben Tagen aufgezeichnet wurden. Dafür wurden die MEAs mit den Zellen im Inkubator gehalten. Nach Beendigung der Versuche wurden in Offline-Analysen die Richtungsausbreitung der elektrischen Erregung und damit die Lokalisation des Schrittmacherursprungs jedes einzelnen Schlages bestimmt.

4.4.1 Methode zur Richtungsanalyse der Erregungsausbreitung in MEA-Langzeitmessungen

Die mit einem MEA gemessenen Feldpotentiale eignen sich sehr gut, um die Erregungsausbreitung bzw. -weiterleitung innerhalb eines Synzytiums von Herzmuskelzellen zu beobachten. Die Software MC-Rack analysiert dazu die genauen Zeitpunkte der einzelnen Feldpotentiale von jeder Elektrode und berechnet die zeitliche Verzögerung untereinander, woraus die Weiterleitung der Erregung dargestellt werden kann. Diese Möglichkeit erlaubt Richtungsveränderungen zu erkennen sowie die Herkunft der Erregung zu detektieren. Allerdings bietet die Software keine Möglichkeit die Ausbreitungsrichtung über einen längeren Zeitraum darzustellen und zusammenfassend zu analysieren. Deswegen musste nach einer weiterführenden Lösung gesucht werden, welche die Ausbreitungsrichtung jeder einzelnen Erregungswelle aus den gemessenen MEA-Daten berechnet und somit letztendlich eine ausgiebige Analyse der Schrittmacheraktivität über einen langen Zeitraum ermöglicht. Da aufgrund der langen Aufnahmezeiten (7 Tage) mit weit über 10^6 Erregungswellen sehr hohe Datenmengen entstanden, musste das Programm eine solche Menge an Datenpunkten verarbeiten. Das war mit dem Programm OriginPro8G möglich, welches den weiteren Vorteil eines eigenen Interpreters bietet. Ein Interpreter ist ein internes Computerprogramm, welches ein selbstgeschriebenes Skript bearbeitet und dadurch eine Reihe von rechenintensiven Operationen für die weitere Datenverwertung veranlasst. Um die hohe Datenmenge zu bearbeiten und für alle aufgezeichneten Erregungswellen im MEA eine Ausbreitungsrichtung zu berechnen, wurde ein umfangreiches Skript geschrieben (siehe Anhang). Die zugrundeliegende Methode zur Berechnung der Ausbreitungsrichtung eines einzelnen Schlages wird im Folgenden beschrieben.

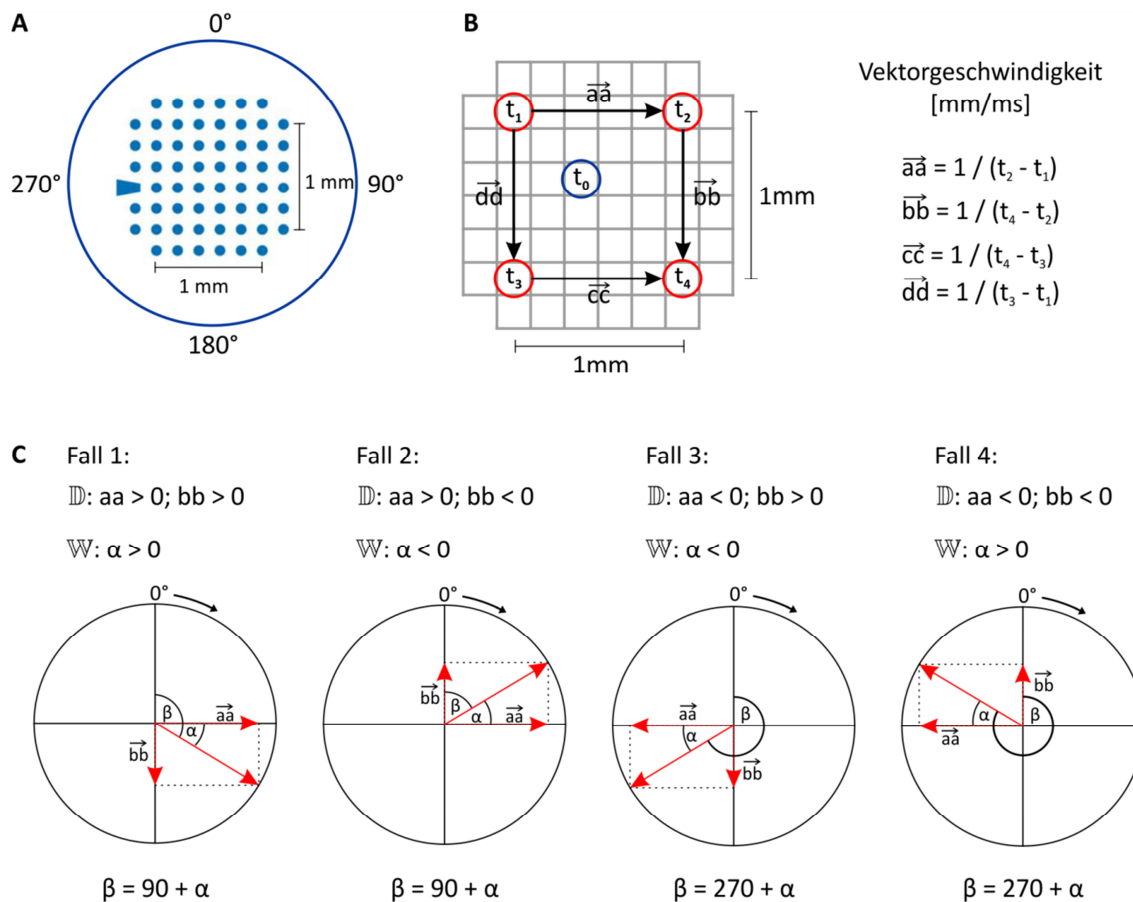


Abbildung 29: Richtungsanalyse der Erregungsausbreitung aus MEA-Langzeitmessungen.

(A) Schematische Darstellung der Elektroden eines MEAs mit Definition der Ausbreitungswinkel. (B) Berechnung der Vektorgeschwindigkeiten aus den t_{\min} -Werten (rot) bezogen zur Referenzelektrode t_0 (blau). (C) Bestimmung der Ausbreitungswinkel durch Verwendung der Arkustangensfunktion mit Beachtung der Definitions- und Wertebereiche.

Abbildung 29A zeigt eine klassische Übersicht des MEA-Elektrodenfelds. Für eine vollständige Richtungsanalyse eines MEAs über einen längeren Zeitraum sollte die Ausbreitungsrichtung jeder einzelnen Erregung als Gradzahl ausgegeben werden, wobei nach Definition 0° oberhalb der Elektroden liegt und die Gradzahl im Uhrzeigersinn aufsteigt. Mit der MC-Rack-Software werden zuerst für jeden Schlag die Aktivierungszeitpunkte (t_{\min} -Zeiten) von vier ausgewählten Elektroden (t_1 bis t_4) bezogen auf eine Referenzelektrode (t_0 in Abbildung 29B) berechnet und exportiert. Diese Elektroden haben einen Abstand von 1 mm, so dass sich durch Division mit der Zeitdifferenz zweier Elektroden die entsprechende Vektorgeschwindigkeit in mm/ms berechnen lässt. Insgesamt werden aus den t_{\min} -Werten vier Geschwindigkeitsvektoren bestimmt (\vec{aa} , \vec{bb} , \vec{cc} , \vec{dd}), wobei jeweils zwei parallel zueinander liegen (Abbildung 29B). Aus zwei zueinander senkrechten Vektoren kann die Ausbreitungsrichtung bestimmt

werden. Dazu wurde der Arkustangens der trigonometrischen Funktion verwendet, um den entsprechenden Winkel zu berechnen (bezeichnet als Winkel α in Abbildung 29C). Aufgrund des Definitions- und Wertebereichs der Arkustangensfunktion ($-90^\circ < f(x) < 90^\circ$) muss die Ausbreitungsrichtung an das eigens definierte Gradsystem (siehe Abbildung 29A) angepasst werden. Dabei sind aufgrund der vorliegenden Vorzeichen der Vektorgeschwindigkeiten vier Fälle zu beachten, um eine korrekte Umrechnung des Ausbreitungswinkels β zu garantieren. Diese sind in Abbildung 29C dargestellt.

In Abbildung 29 ist die Berechnung der Ausbreitungsrichtung bei Verwendung der beiden Geschwindigkeitsvektoren \vec{a} und \vec{b} dargestellt. Durch weitere Kombinationen der vorhandenen Vektoren sind insgesamt vier Möglichkeiten gegeben, die Ausbreitungswinkel zu bestimmen ($\vec{a} + \vec{b}$, $\vec{a} + \vec{d}$, $\vec{c} + \vec{b}$, $\vec{c} + \vec{d}$). Daher wurde für jede Erregung viermal eine Ausbreitungsrichtung berechnet und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Bei Standardabweichungen über 90° wurden die ermittelten Werte verworfen, um Messfehler auszuschließen.

Zusätzlich kann aus der Zeit zwischen zwei Schlägen die vorliegende Frequenz errechnet werden. Dieser Informationsgewinn erlaubt eine genauere Betrachtung der Schrittmacherfrequenz über die gesamte Versuchsdauer.

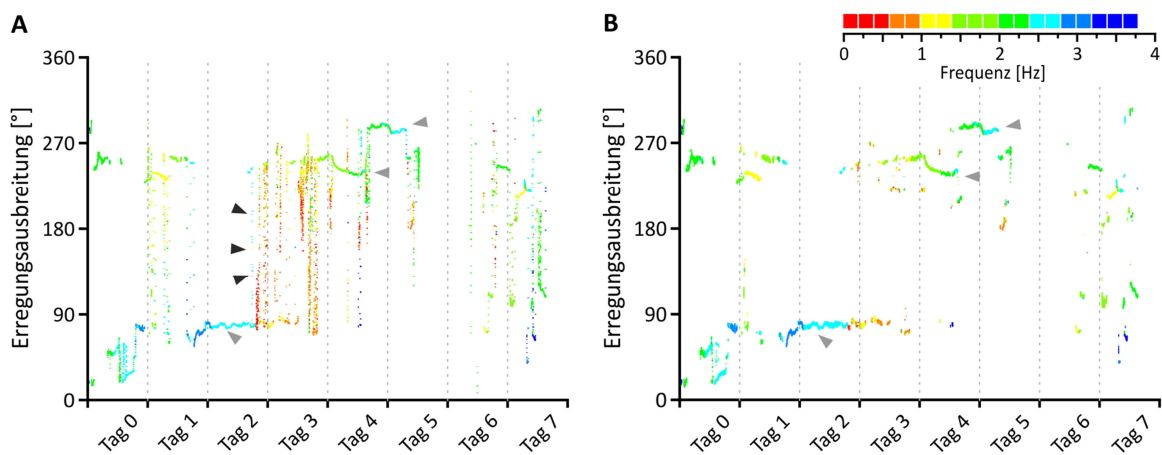


Abbildung 30: Langzeitmessung eines Kontrollversuches (ohne Transduktion).

(A) Erregungsausbreitung aller gemessenen Erregungswellen, wobei neben mehreren dominanten Schrittmachern (graue Pfeile) eine Vielzahl an Einzelschlägen auffällt (schwarze Pfeile). (B) Darstellung der Erregungsausbreitung der ausschließlich stabilen Schrittmacher (graue Pfeile) nach Aussortierung einzelner unregelmäßiger Erregungen durch einen Filter. (Die Farben markieren die dazugehörigen Frequenzen)

Abbildung 30A zeigt ein exemplarisches Beispiel eines Kontrollversuchs, bei dem die Feldpotentiale von ausplattierten HL-1 Wildtypzellen für mehrere Tage kontinuierlich aufgezeichnet und daraus die Erregungsausbreitung für jeden einzelnen Schlag analysiert wurde. Grundsätzlich veranschaulicht dieses Beispiel, dass das Synzytium aus HL-1 Zellen die meiste Zeit spontan aktiv war. Gelegentlich traten einige wenige inaktive Phasen auf, wie es am Tag 5 zu sehen ist. Auffällig sind zudem unterschiedliche dominante stabile Schrittmacher, welche über einen Zeitraum von wenigen Stunden bis zu mehreren Tagen in Erscheinung traten (Abbildung 30 graue Pfeile). Zwischendurch fallen phasenweise starke, sprunghafte Schrittmacherwechsel ohne sichtbare Präferenz auf (Abbildung 30A schwarze Pfeile). Eine Farbkodierung veranschaulicht die vorliegenden Frequenzen. Dadurch konnte beobachtet werden, dass sogar lokal stabile Schrittmacher über die Zeit in ihrer Frequenz variierten.

Da für die Langzeitanalyse grundsätzlich stabile Schrittmacher von Interesse waren, wurden die analysierten Werte in einem weiteren Schritt gefiltert, indem einzelne unabhängige Erregungswellen oder zufällige Einzelereignisse aussortiert wurden. Damit eine Schrittmachererregung als stabil eingestuft wurde, mussten 51 hintereinander folgende Erregungswellen denselben Ausbreitungswinkel aufweisen. Dazu wurde für jeden Schlag der Ausbreitungswinkel von 25 vor- und nachliegenden Werten gemittelt und mit dem Winkel des zu untersuchenden Punktes verglichen. Sobald die Toleranzgrenze von $\pm 2,5^\circ$ überschritten wurde, wurde die Erregungsausbreitung als nicht stabil bewertet und somit aussortiert. Phasen mit starken, sprunghaften Schrittmacherwechseln wurden somit nicht mehr angezeigt (Abbildung 30B).

4.4.2 Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung nach lokaler Transduktion von Schrittmachergenen

Die oben beschriebene Methode (siehe Kapitel 4.4.1) wurde eingesetzt, um die Generierung eines lokalen biologischen Schrittmachers innerhalb eines Zellrasens von Kardiomyozyten über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Unter den getesteten Schrittmacherkandidaten konnten die Überexpression von HCN-Genen (HCN4- und die modifizierte HCN2-Variante) und Expression des dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals die Schrittmacheraktivität in Einzelzellen erhöhen (siehe Kapitel 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3). Nun sollten *in vitro* Langzeitversuche zeigen, ob durch lokale Transduktion innerhalb eines Kardiomyozyten Synzytiums biologische Schrittmacheraktivität erzeugt und ein stabiler Ersatzrhythmus generiert werden kann.

Abbildung 31 repräsentiert die theoretische Überlegung zum Ablauf eines Langzeitexperiments. Zu Beginn findet eine Kontrollmessung von ca. 24 Stunden statt, welche zur Identifikation des primär spontanen Schrittmachers des HL-1 Zellverbunds dient (Abbildung 31: (A) blauer Pfeil, (B) blaue Linie). Infolgedessen kann die Transduktionsstelle zur Generierung eines biologischen Schrittmachers so gewählt werden (Abbildung 31A: grüner Punkt), dass die zu erwartende Erregungsausbreitung möglichst entgegengesetzt verläuft (Abbildung 31: (A) grüner Pfeil, (B) hellroter Bereich). Bei einer erfolgreichen lentiviralen Transduktion am Tag 1 (Abbildung 31B: schwarzer Pfeil) kann erst nach einigen Tagen von einer stabilen Expression ausgegangen werden, so dass mit einem Wechsel des Schrittmachers nach drei bis vier Tagen zu rechnen ist.

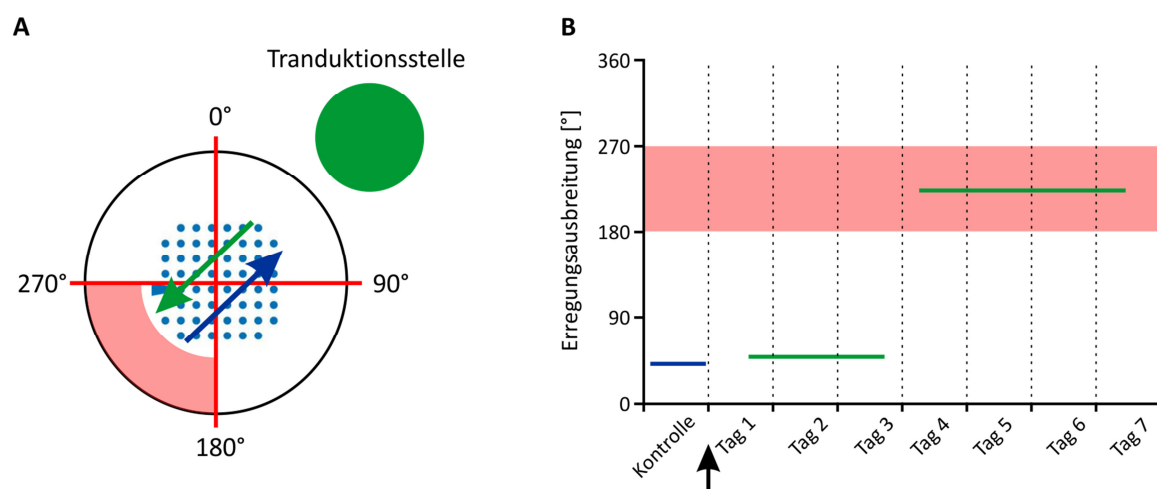


Abbildung 31: Theoretische Überlegungen eines Langzeitexperiments mit lokaler Generierung eines biologischen Schrittmachers. (A) MEA-Übersicht mit primärer Erregungsausbreitung in 45° Richtung am Kontrolltag (blauer Pfeil) und Transduktionsstelle (grüner Punkt) mit zu erwartender Ausbreitungsrichtung (grüner Pfeil) in den entsprechenden gegenüberliegenden Sektor (hellrot) (B) Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung mit primärer Kontrollmessung für ca. 24 Stunden (blau), anschließender lokaler Transduktion (schwarzer Pfeil) und Änderung der Erregungsausbreitung in die zu erwartende Richtung (hellroter Streifen).

In Abbildung 32 ist ein tatsächlicher Langzeitversuch mit analysierter Erregungsausbreitung zusammengefasst. Dabei wurden nach einem Kontrolltag die HL-1 Zellen mit dem RRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Lentivirus lokal transduziert (Abbildung 32A: Schematische Darstellung). Die lokale Transduktion erfolgte im unteren Bereich der Elektroden mit einer geringen MNP-Menge von SO-Mag5 (insgesamt 0,22 μ g Eisen/Versuch; 50 fg Fe/VP). Nach drei Tagen konnten im transduzierten Bereich eGFP-exprimierende Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 32A). Zur Beurteilung eines erfolgreichen Schrittmacherwechsels wurde ein Ausbreitungssektor von 90° ($0^\circ \pm 45^\circ$)

gewählt, in dessen Richtung eine generierte Erregungsausbreitung zu erwarten war (Abbildung 32A, B: roter Bereich). Im Beispielerperiment konnte am Tag 5 und 6 nach Transduktion ein Schrittmacherwechsel in die gewünschte Richtung beobachtet werden (Abbildung 32B). Für eine Quantifizierung wurde der Anteil aller Schläge in den zu erwartenden Sektor von 90° (Abbildung 32A, B: roter Bereich) sowie für die restlichen Sektoren bestimmt und für jeden einzelnen Tag gemittelt (Abbildung 32A, B: hellgrauer Bereich). Abbildung 32C zeigt die Anzahl an Schlägen pro Tag in den zu erwartenden Ausbreitungssektor. Anfänglich war die Anzahl sehr niedrig. Im Verlauf ist erst am sechsten Tag ein starker Anstieg an Schlägen in den zu erwartenden Sektor zu erkennen. Somit zeigt diese Darstellung eine deutliche Zunahme der Schläge aus dem transduzierten Bereich einige Tage nach der Transduktion.

Eine Übersicht aller Einzelexperimente ist in Abbildung 32D zu sehen. Zwar war bei den Einzelversuchen stets eine große Variabilität der Erregungsausbreitung ersichtlich, dennoch zeigte sich bei den meisten Versuchen am Tag 5 und 6 eine erhöhte Anzahl an Schlägen in den zu erwartenden Richtungssektor. Zur besseren Auswertung wurden aus den Werten der Einzelversuche die Mittelwerte und die Standardabweichung gebildet (Abbildung 32E). Darin ist erkennbar, dass sich an den Tagen 5 und 6 die Anzahl an Erregungswellen im Vergleich zu den Tagen davor durchschnittlich verdoppelt bzw. verdreifacht hatte (Abbildung 32E). Die starke Variabilität der Einzelversuche, resultierend in einer hohen Standardabweichung, lässt sich auf die fehlende Stabilität der generierten Schrittmacher zurückführen. Am Tag 7 der Versuche lässt sich zudem ein starker Abfall der spontanen Aktivität beobachten (Abbildung 32D, E). Dies ist auf eine abnehmende Qualität durch ein Ablösen der Zellen zurückzuführen.

Ein direkter Vergleich der Schläge in den zu erwartenden Ausbreitungssektor zu den restlichen Sektoren (normalisiert auf einen 90° -Sektor) bestätigt eine signifikante Zunahme an Erregungswellen an den Tagen 5 und 6 nach Transduktion. So liegt die mittlere Anzahl an Schrittmachererregungen in den restlichen Sektoren relativ konstant bei ca. 5.000 Schlägen, wohingegen die Anzahl im Ausbreitungssektor am Tag 5 und 6 auf ca. 15.000 verdreifacht und damit signifikant erhöht ist (Abbildung 32F).

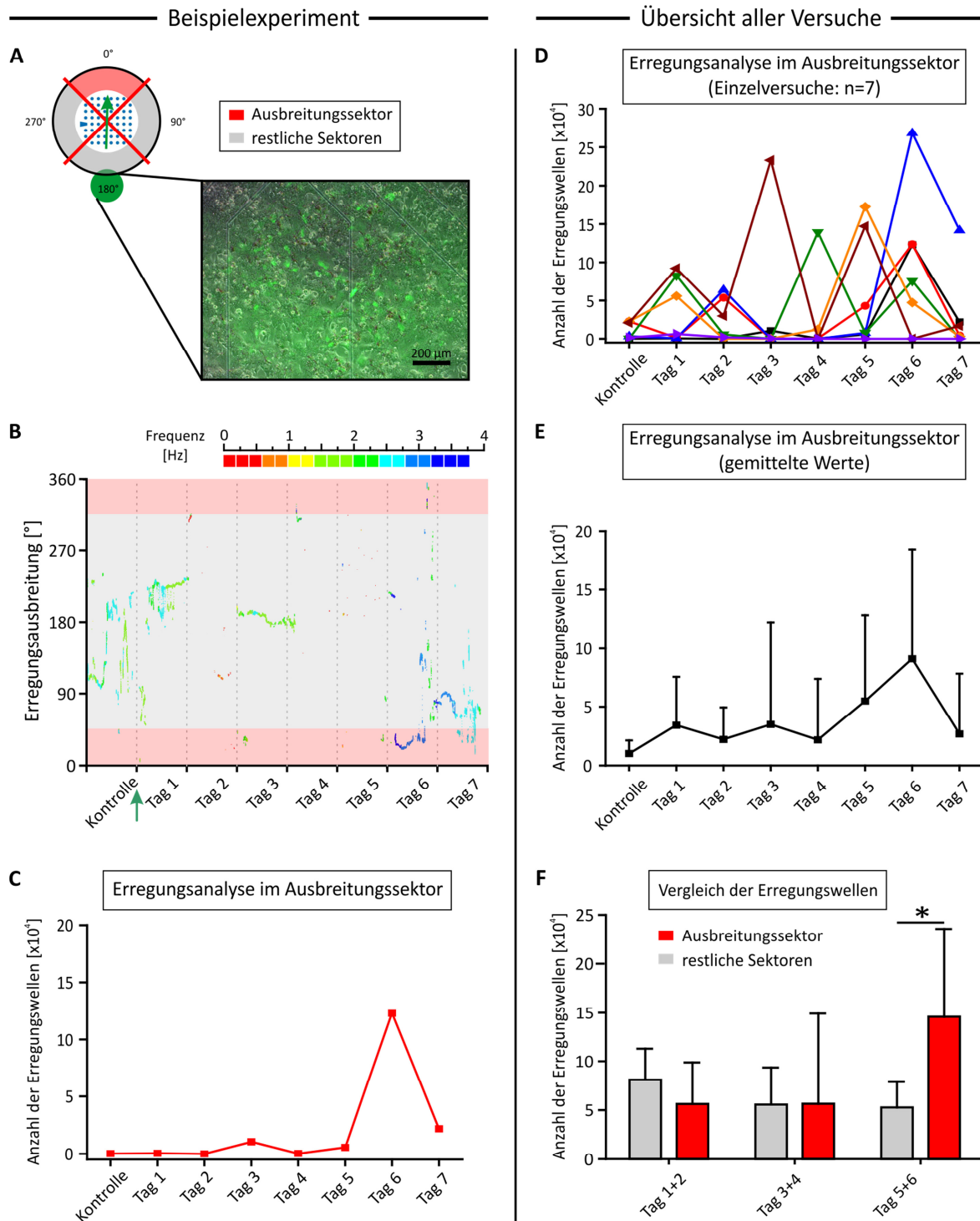


Abbildung 32: Langzeitexperiment zur Schrittmachergenerierung durch lokale Expression des dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals. (A) MEA-Übersichtsbild mit Transduktionsstelle unterhalb der Elektroden und der zu erwartenden Erregungsausbreitung (grüner Pfeil) sowie eine Fluoreszenzaufnahme der transduzierten Stelle mit eGFP-exprimierenden HL-1 Zellen. (B) Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung: lokales Transduktionsexperiment erfolgte nach 24 Stunden (grüner Pfeil) mit zu erwartender Erregungsausbreitung in 0° Richtung (hellroter Bereich $0^\circ \pm 45^\circ$). (C) Langzeitanalyse des dargestellten Versuchs: Auszählung der Schläge pro Tag in Richtung des zu erwartenden Ausbreitungssektors. (D) Übersicht aller Langzeitversuche mit

Anzahl der Schläge in den zu erwartenden Ausbreitungssektor pro Tag ($n=7$). (E) Gemittelte Anzahl der Schläge aller Versuche in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung (arithmetisches Mittel mit SD; $n=7$). (F) Vergleich der Anzahl an Schlägen von je zwei Tagen in den Ausbreitungssektor zu den Schlägen in den restlichen Sektoren (normalisiert auf eine Sektoreinheit von 90° ; arithmetisches Mittel mit SD; t-Test: $p=0,03$).

Als Kontrolluntersuchung zur Analyse der Erregungsausbreitung fanden Langzeitmessungen mit HL-1 Zellen ohne Anwendung einer lokalen Transduktion statt. Ein Beispiel eines solchen Experiments ist in Abbildung 30 zu sehen. Um eine vergleichbare Auswertung der Erregungsausbreitung durch Auszählung der Schläge (wie oben gezeigt) sicherzustellen, musste bei den Kontrollversuchen ein theoretischer Ausbreitungssektor (von 90°) bestimmt werden. Dazu wurde am Tag 0 die Anzahl der Schläge in vier Sektoren (von je 90°) ermittelt. Als theoretischer Ausbreitungssektor wurde folglich der Sektor bestimmt, der dem Sektor mit den meisten Schlägen gegenüber lag. Für diesen ausgesuchten Sektor wurde die Anzahl an Erregungswellen für jeden einzelnen Tag ermittelt. Abbildung 33A zeigt die einzelnen Kontrollversuche. Wie bereits beim Einzelversuch in Abbildung 30 zu sehen (siehe Kapitel 4.4.1), zeigt sich eine hohe Variabilität der nativen Schrittmacheraktivität. Im Durchschnitt liegen die Werte jedoch an allen Tagen zwischen 2.000 bis 5.000 Schlägen und es fallen keine großen Abweichungen auf (Abbildung 33B). Ein weiterer direkter Vergleich der Anzahl an Schlägen (von je zwei Tagen) in den theoretischen Ausbreitungssektor zum restlichen Ausbreitungsbereich (normalisiert auf einen 90° -Sektor) ergibt zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied (Abbildung 33C). Zusammenfassend zeigen die Kontrollversuche bei Betrachtung der Durchschnittswerte eine gleichmäßige Verteilung bei der Erregungsausbreitung.

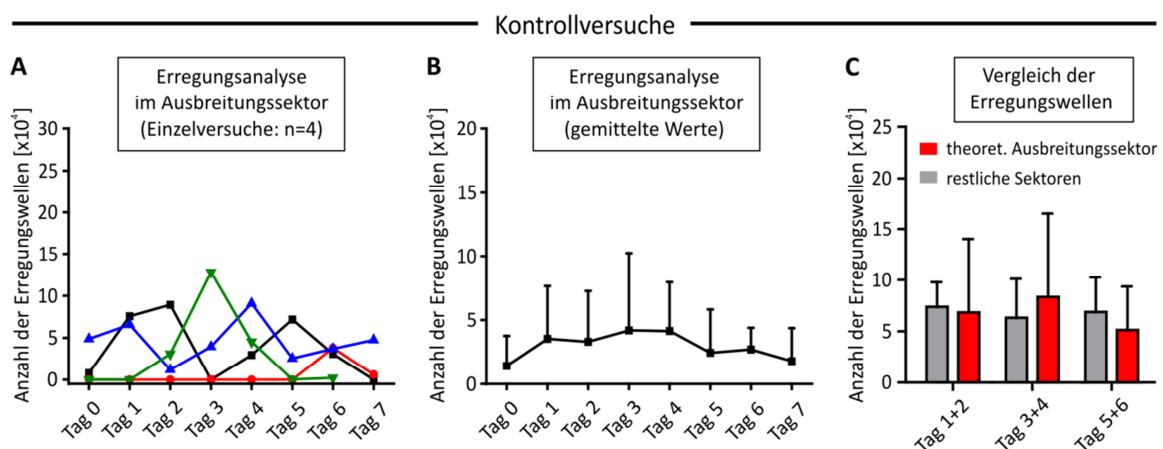


Abbildung 33: Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung bei Kontrollen ohne lokale Transduktion. Ähnlich wie bei den Langzeitauswertungen mit lokaler Transduktion wurde in

diesen Fall Tag 0 als Kontrolltag angesehen, um eine theoretische Transduktionsstelle einschließlich der zu erwartenden Ausbreitungsrichtung zu bestimmen. (A) Anzahl der täglichen Schrittmacherwellen in die zu untersuchende Ausbreitungsrichtung der einzelnen Versuche. (B) gemittelte Anzahl der Erregungswellen in den zu untersuchenden Sektor (arithmetisches Mittel mit SD). (C) Vergleich der Anzahl an Schlägen von je zwei Tagen in den Ausbreitungssektor zu den restlichen Sektoren (normalisiert auf eine Sektoreinheit von 90°; arithmetisches Mittel mit SD).

Die lokalen Transduktionsversuche zur Generierung eines biologischen Schrittmachers mit Hilfe des dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals fanden zudem unter veränderten Bedingungen statt. So wurde zur lokalen Transduktion eine erhöhte SO-Mag5 Menge (200 fg Fe/VP; Gesamtmenge: 1,4 µg Eisen/Versuch) eingesetzt, um eine bessere Transduktion der Zellen zu erreichen. Trotz einer deutlichen eGFP-Expression im transduzierten Zellareal, war in keinem Experiment eine erfolgreiche Steigerung der Schrittmacheraktivität in den zu erwartenden Ausbreitungssektor zu erkennen (Abbildung 34A, B). Ein Vergleich der Schläge in den Ausbreitungssektor zu den restlichen Sektoren ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 34C).

In einer weiteren Versuchsreihe kamen alternativ bei der lokalen Transduktion die PEI-Mag2 Partikel zum Einsatz (200 fg Fe/VP; Gesamtmenge: 0,5 µg Eisen/Versuch). Bei Betrachtung der Versuchsergebnisse lieferte nur ein Experiment einen starken Anstieg der Schrittmacheraktivität am Tag 5 und 6 (Abbildung 34D, rot). Ein Vergleich der Erregungswellen in den zu erwartenden Ausbreitungssektor mit den restlichen Sektoren zeigte keinen signifikanten Anstieg an den Tagen 5 und 6 nach Transduktion (Abbildung 34F).

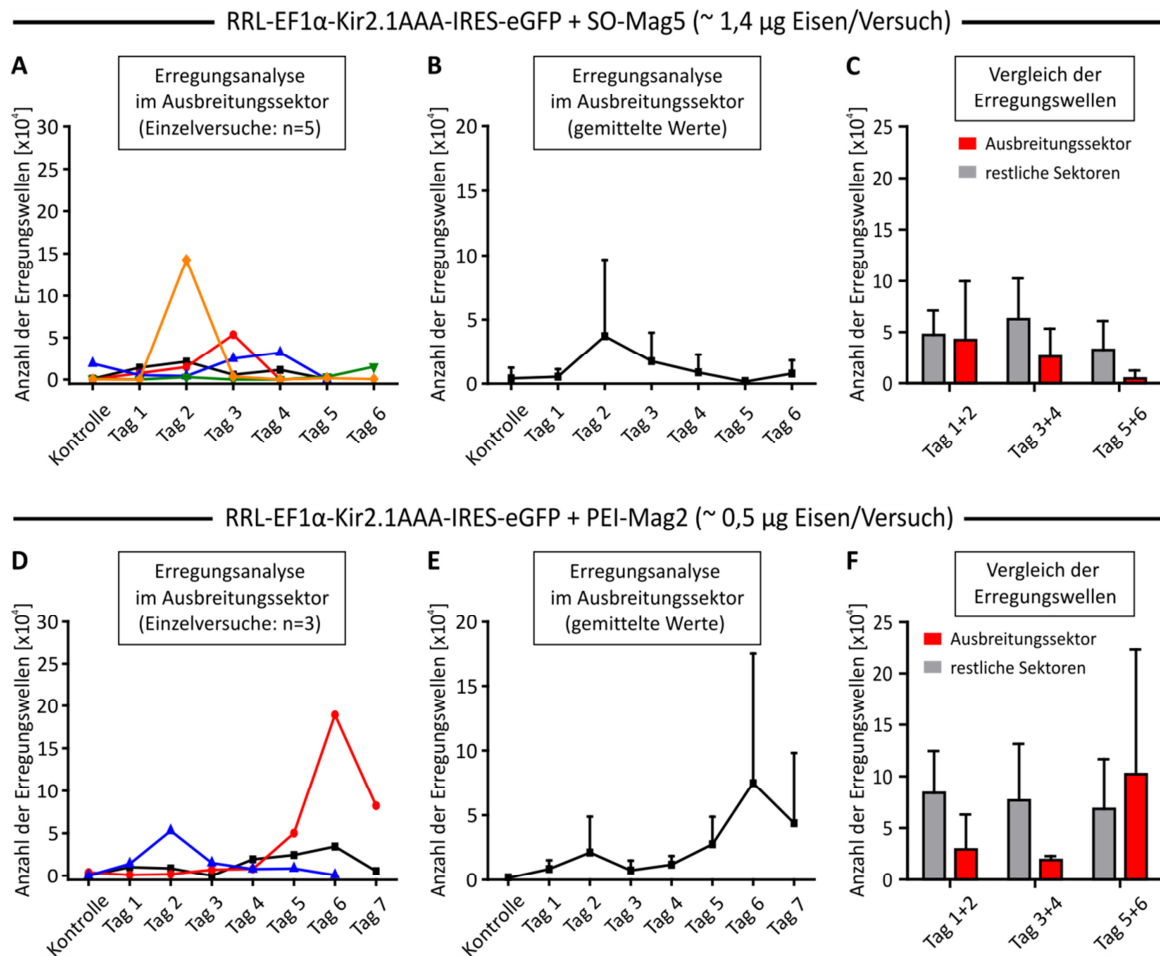


Abbildung 34: Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung bei lokaler Transduktion mit dem RRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Lentivirus und verschiedenen MNPs. (A-C) Verwendung von SO-Mag5 (erhöhte Eisenmenge). (D-F) Verwendung von PEI-Mag2. (A, D) Anzahl der Erregungswellen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung der einzelnen Versuche. (B, E) gemittelte Anzahl der Schrittmacherwellen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung (arithmetisches Mittel mit SD). (C, F) Vergleich der Anzahl an Schlägen von je zwei Tagen in den Ausbreitungssektor zu den restlichen Sektoren (normalisiert auf eine Sektoreinheit von 90°; arithmetisches Mittel mit SD).

In Kapitel 4.3 wurden verschiedene Lentiviren zur Schrittmachergenerierung beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Transduktion von HL-1 Zellen sowohl mit den HCN4- als auch mit den HCN2(E324A)-Viren zu einer erhöhten Schrittmacheraktivität führte. Für eine gute Transduktion wurden die Experimente mit einer erhöhten Menge an SO-Mag5 durchgeführt (200 fg Fe/VP; Gesamtmenge: ca. 1,8 bis 2 μ g Eisen/Versuch). In Abbildung 35A und D sind jeweils die Einzelversuche mit HCN4 bzw. mit HCN2(E324A) dargestellt. Die Graphen zeigen hierbei die Zahl an Schlägen in den zu erwartenden Bereich für jeden einzelnen Tag. In beiden Versuchsreihen ist einige Tage nach der Transduktion keine Erhöhung der Anzahl der Schläge in den zu erwartenden

Ergebnisse

Ausbreitungssektor zu erkennen. Das wird auch aus den gemittelten Werten ersichtlich, die in beiden Fällen einen kontinuierlichen Verlauf zeigen, bei dem täglich ca. 3.000 Schläge in den zu erwartenden Ausbreitungssektor messbar waren (Abbildung 35B, E). Ein direkter Vergleich des Anteils an Schlägen in den Ausbreitungssektor zu den restlichen Sektoren konnte ebenso keine lokale Schrittmachergenerierung belegen (Abbildung 35C, F).

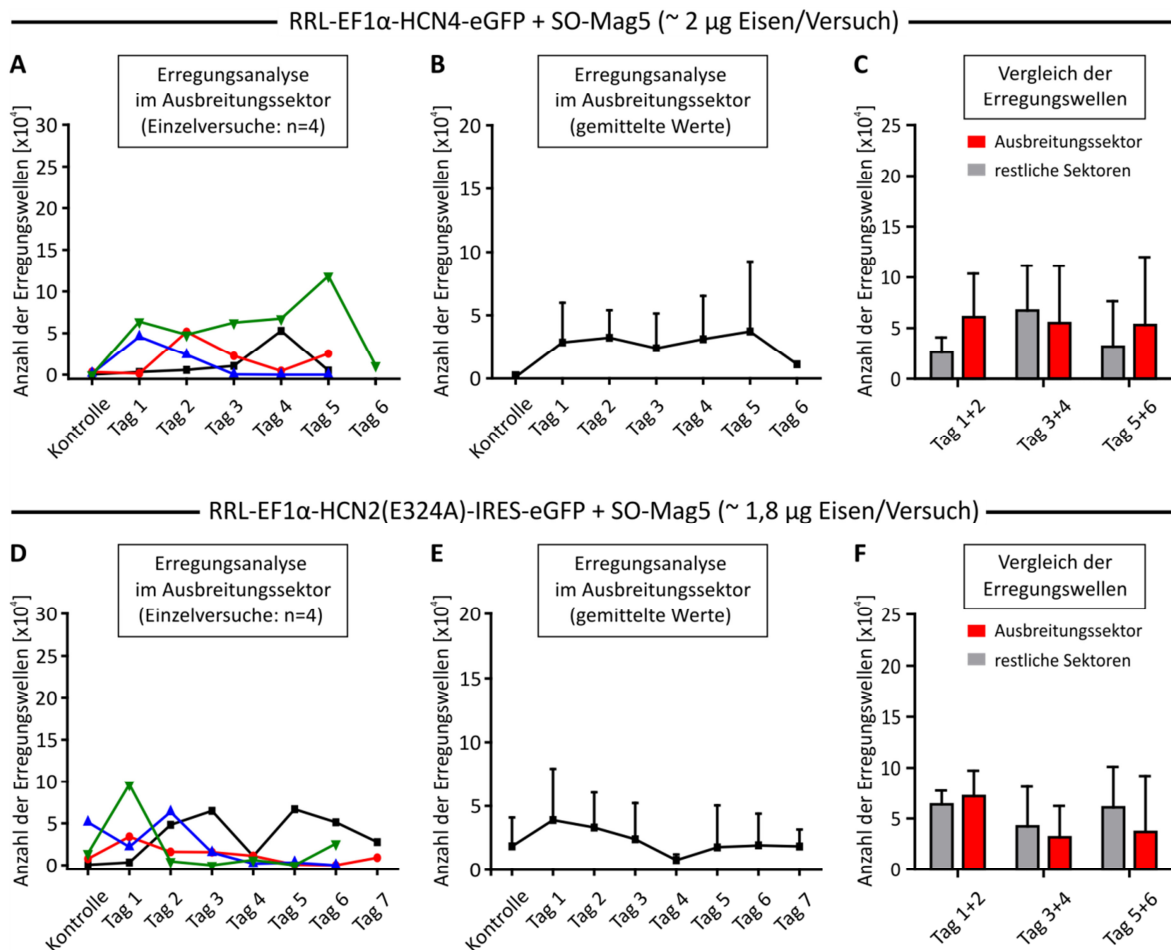


Abbildung 35: Langzeitanalyse der Erregungsausbreitung bei lokaler Transduktion mit Lentiviren für eine HCN-Überexpression in Kombination mit einer hohen MNP-Menge. (A-C) Verwendung des RRL-EF1 α -HCN4-GFP Lentivirus. (D-F) Verwendung des RRL-EF1 α -HCN2(E324A)-IRES-eGFP Lentivirus. (A, D) Anzahl der Erregungswellen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung der einzelnen Versuche. (B, E) gemittelte Anzahl der Erregungswellen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung (arithmetisches Mittel mit SD). (C, F) Vergleich der Anzahl an Erregungswellen von je zwei Tagen in den Ausbreitungssektor zu den restlichen Sektoren (normalisiert auf eine Sektoreinheit von 90°; arithmetisches Mittel mit SD).

Zusammenfassend sind in Abbildung 36 die Ergebnisse zur lokalen Schrittmachergenerierung mit unterschiedlichen Schrittmachergenen und unter verschiedenen

Bedingungen abgebildet und den Kontrollversuchen ohne Transduktion gegenüber gestellt. Zu jeder Versuchsreihe ist darin die Anzahl an Schlägen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung von jeweils zwei Folgetagen nach dem Transduktionsexperiment (Tag 1+2, Tag 3+4, Tag 5+6) zu sehen. In den ersten beiden sowie am dritten und vierten Tag gibt es keine auffälligen Änderungen und die Anzahl an Erregungswellen lag zwischen 3.000 und 8.000. Von Bedeutung sind jedoch die Änderungen an Tag 5 und 6 nach der Transduktion. Die Schrittmacheraktivität bei lokaler Expression von HCN4 bzw. HCN2(E324A) blieb an diesen Tagen unverändert und ähnlich zur Kontrolle. Bei diesen Versuchen wurden jedoch stets eine hohe SO-Mag5 Menge zur lokalen Transduktion eingesetzt. Eine ähnlich hohe Eisenmenge konnte ferner bei Verwendung des Kir2.1AAA-Kanals zu keiner erhöhten Schrittmacheraktivität führen. Hierbei fällt sogar eine Erniedrigung der Anzahl an Schlägen auf, was auf eine negative Auswirkung der MNPs auf die Weiterleitung hindeutet. Erfolgte hingegen eine lokale Expression des Kir2.1AAA-Kanals mit einer reduzierten SO-Mag5 Menge, führte dies zu einem signifikanten Anstieg der Schrittmacheraktivität. Im Vergleich zur Kontrolle verdreifachte sich hierbei die Anzahl auf ungefähr 15.000 Schläge an den Tagen 5 und 6.

Der Einsatz des PEI-Mag2 Partikels zur lokalen Transduktion von Kir2.1AAA zeigt eine tendenzielle Erhöhung der Schläge an Tag 5 und 6. Diese weist eine sehr hohe Standardabweichung auf und ist daher nicht signifikant. Grund hierfür ist, dass nur in einem Versuch eine erhöhte Schrittmacheränderung zu erkennen war (Abbildung 34D).

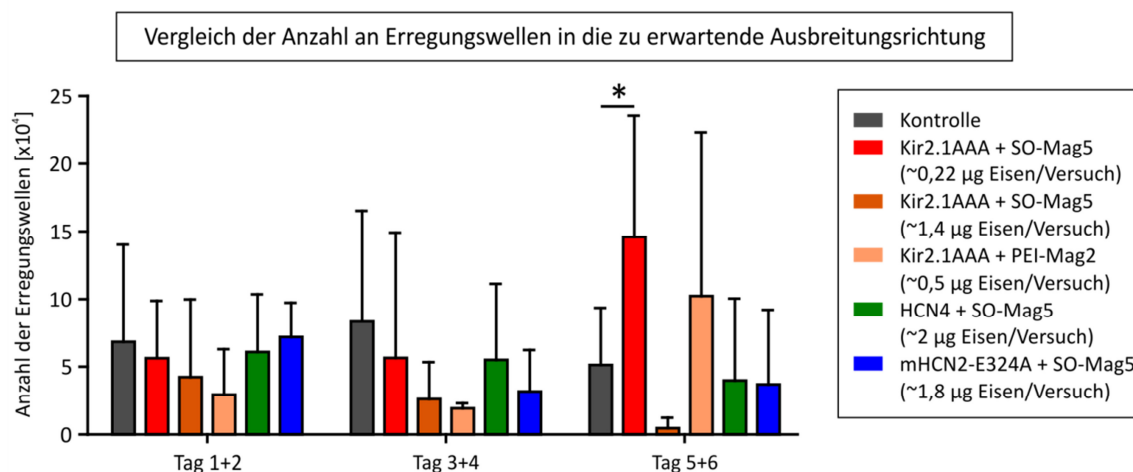


Abbildung 36: Analyse der Anzahl an Erregungswellen. Dargestellt ist die Anzahl der Erregungen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung am ersten und zweiten Tag, am dritten und vierten Tag sowie am fünften und sechsten Tag nach dem Transduktionsexperiment. In den ersten vier Tagen sind hierbei keine auffälligen Änderungen zu erkennen. Erst am fünften und sechsten Tag ist die Anzahl an Erregungen in die zu erwartende Ausbreitungsrichtung deutlich angestiegen, wenn der RRL-EF1 α -Kir2.1AAA-IRES-eGFP Lentivirus mit verringertem SO-Mag5 eingesetzt wurde (arithmetisches Mittel und SD; t-Test: $p=0,04$).

Gemeinhin ist festzustellen, dass die Verwendung des mutierten Kir2.1AAA-Gens durch Transduktion mit einer geringen Eisenmenge zu einer erhöhten lokalen Schrittmacheraktivität führte.

4.5 Markieren von Zellen mittels MNPs (SO-Mag5)

In der medizinischen Forschung versprechen neben der Gentherapie ebenso die zelltherapeutischen Ansätze hohes Potential. Ein wichtiges Thema ist dabei der Zellersatz, welcher mit einer sicheren Zellpositionierung und Zellanreicherung im Zielgewebe verbunden ist. Einen entscheidenden Beitrag zur Lokalisation kann hierbei die Anwendung von MNPs einnehmen, indem Zellen durch die endozytotische Aufnahme von MNPs ein magnetisches Moment erhalten und aufgrund dessen mit Hilfe eines Magnetfelds positioniert werden können. Das Ausmaß einer magnetischen Markierung ist abhängig von den verwendeten MNPs und der Einsatzmenge. In der hier vorliegenden Arbeit wurden Kardiomyozyten mit SO-Mag5 in unterschiedlichen Eisenmengen beladen und der Anteil an magnetisierten Zellen ermittelt. Neben der HL-1 Zelllinie wurden zusätzlich ES-Zell-abgeleitete Kardiomyozyten verwendet, welche die physiologischeren Eigenschaften besitzen und damit für einen Zellersatz mehr Relevanz haben. Die Trennung der beladenen von nicht-beladenen Zellen erfolgte mit Hilfe eines speziell angefertigten Magnetständers für 1,5 ml Reaktionsgefäße (Wenzel et al., 2012). Durch eine Zählung beider Gruppen (beladene magnetisch anziehbare und nicht markierte Zellen) konnte die Effizienz der Beladung ermittelt werden (Abbildung 37A). Abbildung 37 (B, C) zeigt den prozentualen Anteil an magnetisierten Zellen, wenn diese mit unterschiedlichen Eisenmengen beladen wurden. So nehmen die HL-1 Kardiomyozyten anscheinend die MNPs sehr gut auf. Bereits eine geringe Menge von 25 pg Eisen/Zelle reichte aus um mehr als 60% der Zellen zu beladen, die damit magnetisch anzureichern waren. Die Verwendung von 100 pg Eisen/Zelle magnetisierte über 90% der Zellen. Im Vergleich benötigen ES-Zell-abgeleitete Kardiomyozyten deutlich höhere Mengen an Eisen. Erst bei einem Einsatz von 200 pg Eisen/Zelle konnte ein Anteil von ca. 60% der Zellen magnetisch angezogen werden. Durch eine Verdopplung auf 400 pg Eisen/Zelle ließ sich der Wert nur ca. 10% steigern.

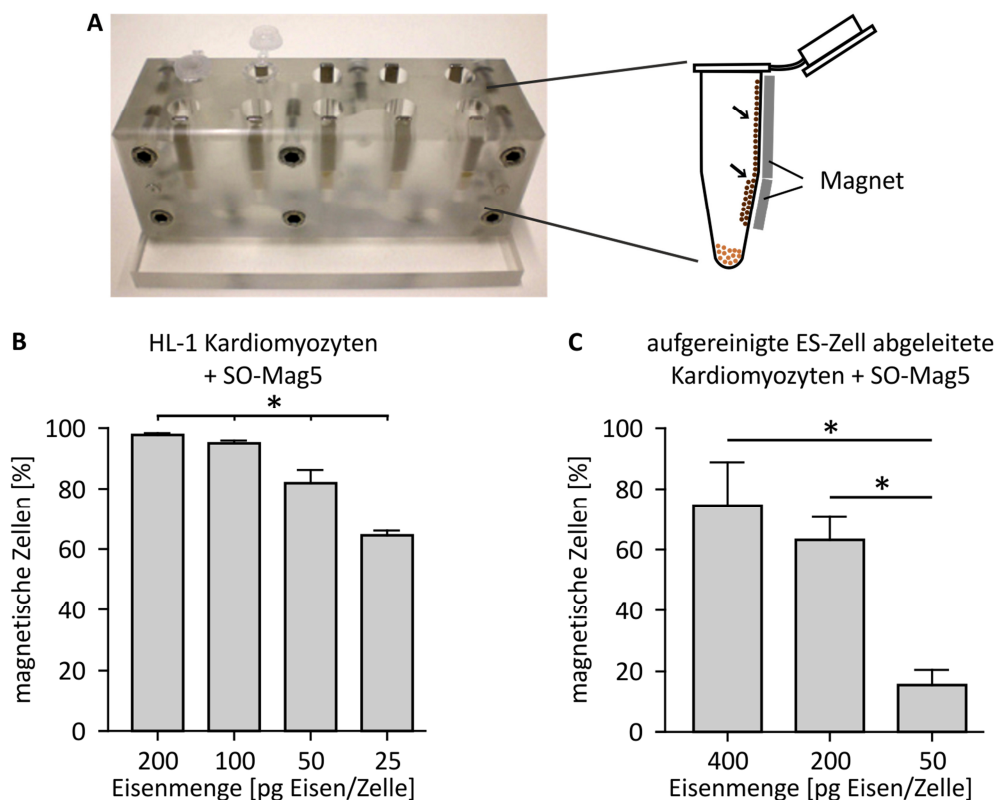


Abbildung 37: Beladung von Kardiomyozyten mit magnetischen Nanopartikeln. (A) Magnetständer für 1,5 ml Reaktionsgefäße mit Stabmagneten an einer Seite zur Anreicherung der magnetisierten Zellen (dunkelbraun, Pfeile) und Trennung von nicht magnetischen Zellen (hellbraun) (modifiziert nach Wenzel et al., 2012). (B, C) Beladung von Kardiomyozyten mit unterschiedlichen Eisenmengen an SO-Mag5 und Quantifizierung der Magnetisierungseffizienz (B: HL-1 Kardiomyozyten; C: ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten).

4.6 Lokale Positionierung von MNP-beladenen ES-Zell-abgeleiteten Kardiomyozyten

4.6.1 Lokale Positionierung von Kardiomyozyten auf das Elektrodenfeld eines MEAs

Zur Herstellung eines funktionellen Synzytiums aus Kardiomyozyten auf einem MEA werden im Durchschnitt weit über 100.000 Zellen benötigt. Eine direkte Platzierung einiger tausend Zellen lokalisiert auf die Elektroden eines MEAs würde eine deutliche Reduzierung der Zellanzahl bedeuten.

Für eine lokale Positionierung wurden aufgereinigte ES-Zell-abgeleitete Kardiomyozyten mit 200 pg Eisen/Zelle beladen und mit Hilfe der 1 mm Magnetspitze auf den Elektrodenbereich eines MEAs angereichert. Dabei war der Einsatz von 5.000 bis 10.000 Zellen ausreichend, um ein Synzytium auf den Elektroden zu bilden (Abbildung 38C). Messungen der Feldpotentiale bestätigten eine gekoppelte elektrische Aktivität der Zellen (Abbildung 38D) (Kilgus et al., 2012).

Bei Kontrollversuchen ohne Verwendung eines magnetischen Feldes waren die Kardiomyozyten zufällig und einzeln auf dem gesamten MEA verteilt (Abbildung 38A), so dass keine Feldpotentiale messbar waren (Abbildung 38B).

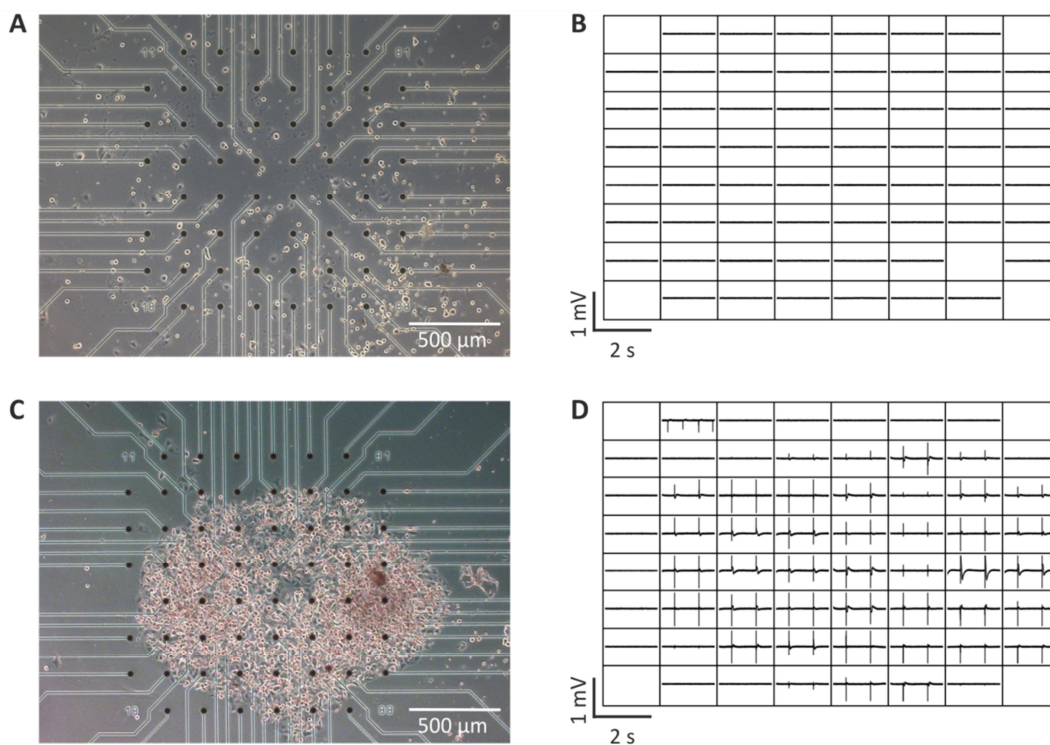


Abbildung 38: lokale Positionierung von Kardiomyozyten. (A) Kontrollversuch zur Positionierung von beladenen Kardiomyozyten auf die Elektroden eines MEAs ohne Anlegen eines magnetischen Feldes mit (B) entsprechenden Feldpotentialen. (C) Positionierung von beladenen Kardiomyozyten auf die Elektroden eines MEAs durch Verwendung der 1 mm Magnetspitze direkt unterhalb des Elektrodenfeldes mit (D) gemessenen Feldpotentialen. (modifiziert nach Kilgus et al., 2012)

4.6.2 Generierung eines Ersatzschrittmachers durch Positionierung von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten

Die Zellersatztherapie bietet eine weitere Möglichkeit zur Generierung eines biologischen Ersatzschrittmachers. Eine lokale Positionierung mittels MNPs ermöglicht die lokale Anreicherung einer ausreichenden Zahl an schrittmacherfähigen Zellen, die schließlich Schrittmacheraktivität übernehmen können. Um dieses Prinzip zu zeigen, dienten aufgereinigte ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten als Schrittmacherzellen, welche durch eine Kotransfektion ChR2-eYFP exprimierten und deshalb mittels Beleuchtung stimulierbar waren (Bruegmann et al., 2010). Die zu positionierenden Kardiomyozyten wurden über Nacht mit SO-Mag5 mit einer Konzentration von 200 pg Eisen/Zelle beladen und am folgenden Tag auf ein MEA mit vollständigem HL-1 Synzytium lokal angereichert. Die Positionierung fand mit der geraden 1 mm Spitze im Umfeld der Elektroden statt. Abbildung 39A veranschaulicht die Positionierung der Zellen rechts des Elektrodenfeldes. Im vergrößerten Durchlichtbild zeigten die lokalisierten Zellen aufgrund der aufgenommenen MNPs ein braunes Erscheinungsbild. Dieses stimmte mit dem eGFP-Fluoreszenzbild überein (Abbildung 39B). Messungen der Feldpotentiale in Abbildung 39C präsentierten ein spontan aktives HL-1 Synzytium mit einem Schrittmacherursprung oberhalb der Elektroden. Bei globaler Beleuchtung des MEAs mit 475 nm ($\geq 0,4 \text{ mW/mm}^2$; Lichtimpulse 10-20 ms) ergab sich eine Änderung der Schrittmacheraktivität, da jedem Lichtpuls eine Erregungswelle folgte. Weiterhin bewies die Analyse der Latenzzeit einen Wechsel des Schrittmacherursprungs, welcher während der optischen Stimulation von der rechten Seite der Elektroden kam, also dem Bereich der positionierten Kardiomyozyten. Der Graph in Abbildung 39D präsentiert in einer längeren Messung, dass die Spontanfrequenz der HL-1 Zellen zwischen 2,4 und 2,7 Hz lag. Bei globaler Stimulation des MEAs mit Lichtpulsen von 3 bis 4 Hz, übernahmen die ChR2-exprimierenden Zellen die Schrittmacheraktivität (n=5).

Diese *in vitro* Versuche bestätigen, dass modifizierte aufgereinigte ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten innerhalb eines existierenden Synzytiums positioniert werden und dort als Schrittmacher agieren können.

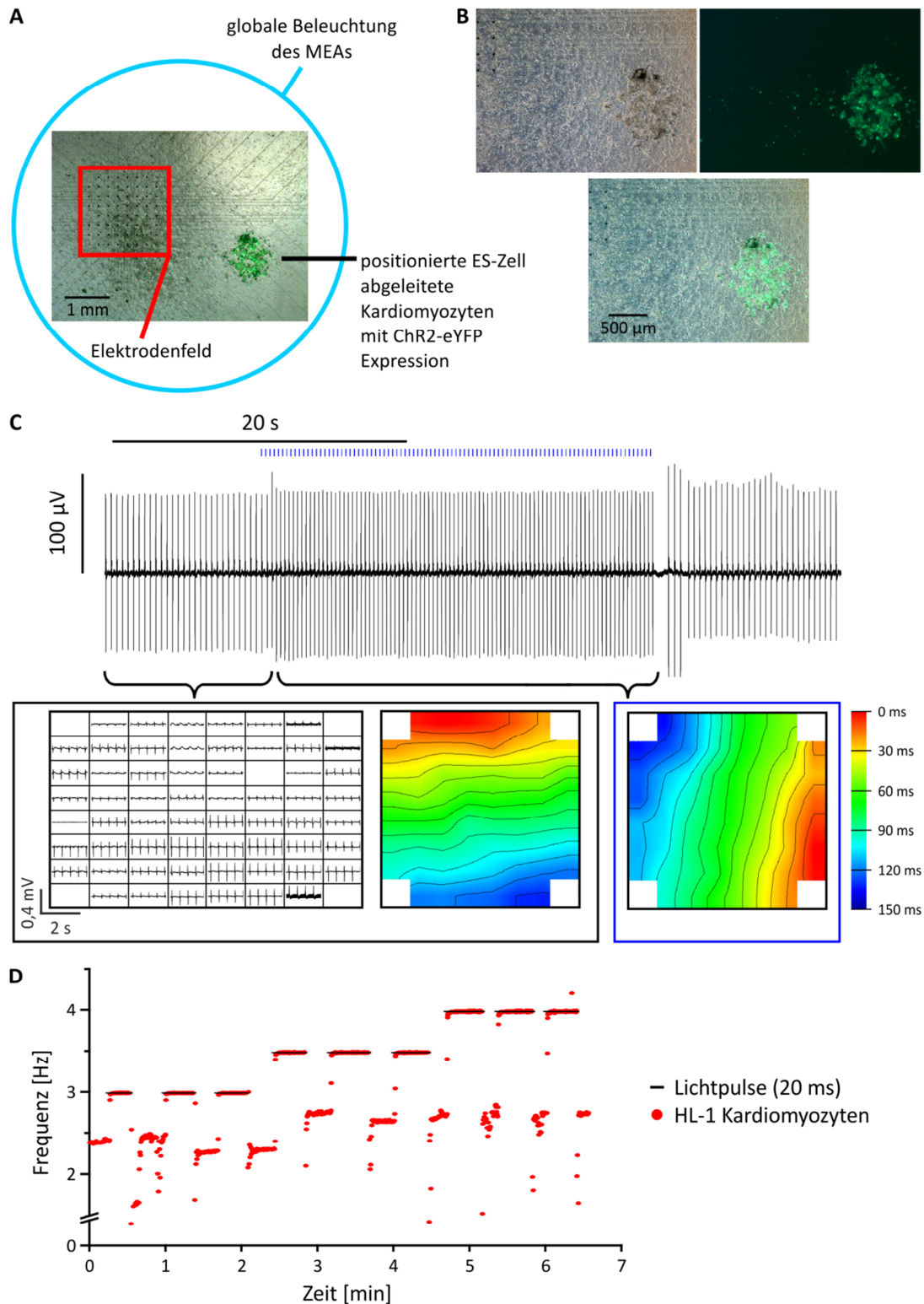


Abbildung 39: Positionierung von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten auf ein MEA mit gekoppeltem HL-1 Synzytium. (A) Übersichtsaufnahme des MEAs mit Elektrodenfeld und magnetisch positionierten ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten und (B) vergrößerter Transmissionslicht- und Fluoreszenzaufnahme dieser Zellen. (C) MEA-Messung mit längerer Aufnahme einer Beispielelektrode und paralleler Analyse der Latenzzeit ohne und mit Beleuchtung (Lichtpulse in blau). (D) Frequenzanalyse über mehrere Minuten des HL-1 Synzytium mit Veränderung unter Beleuchtung bei 3, 3,5 und 4 Hz.

5 Diskussion

Die Generierung eines biologischen Ersatzschrittmachers, der sowohl eine hohe Stabilität als auch physiologische Eigenschaften eines nativen Schrittmachers aufweist, ist äußerst schwierig. Da die Lokalität hierbei von entscheidender Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit eine Methode zur lokalen Transduktion bzw. zur lokalen Zellpositionierung entwickelt. Mit Hilfe dieser Technik konnten ein lokaler optischer Ersatzschrittmacher *in vitro* generiert sowie weitere biologische Ersatzschrittmacher genauer untersucht werden.

5.1 Toxizität der MNPs

Beim Einsatz von MNPs ist die Frage nach Toxizität von zentraler Bedeutung, da MNPs negative Effekte auf die Zielzellen haben können. In dieser Arbeit wurden mit SO-Mag5 und PEI-Mag2 zwei unterschiedliche MNPs eingesetzt, bei denen anfänglich innerhalb der DFG-Forschergruppe in zwei Testverfahren zur Zellviabilität (LDH- und MTT-Assay) keine Toxizität festgestellt werden konnte (Trueck et al., 2012). Klassische Toxizitätstests sollten jedoch bezüglich der MNPs kritisch betrachtet werden. So gibt es erste Hinweise, dass der MTT-Assay zur Toxizitätsbestimmung bei bestimmten porösen Siliziumoxid-Partikeln nicht angewendet werden kann. Der Grund ist eine Redoxreaktion, in der MTT reduziert und gleichzeitig die Partikeloberfläche oxidiert werden, was zu einem verfälschten Ergebnis des MTT-Assays führt (Laaksonen et al., 2007). Bei einer lokalen Transduktion muss außerdem die Tatsache berücksichtigt werden, dass eine große Menge der MNPs aus der Gesamtlösung auf eine sehr kleine Fläche konzentriert wird. Genaue Aussagen über den Umfang der lokal angezogenen Eisenmenge sind nur annäherungsweise möglich und beziehen sich auf Erkenntnisse von lokalen Transduktionsversuchen und entsprechenden Computersimulationen (Kilgus et al., 2012). Bei einer Annahme, dass 75% der eingesetzten Eisenmenge durch die 1 mm Spitze auf eine Fläche mit einem Radius von 750 μm angezogen werden, befanden sich durchschnittlich 0,1 bis 0,76 $\mu\text{g Eisen/mm}^2$ (entspricht 0,22 bis 1,8 $\mu\text{g Eisen/Versuch}$) in diesem Areal und konnten von den Zellen aufgenommen werden. In diesem Bereich zeigten sich bei lokalen Transduktionen mit PEI-Mag2 und SO-Mag5 unterschiedliche toxische Effekte. Der Einsatz von PEI-Mag2 Partikeln löste bei einer Menge von 0,5 $\mu\text{g Eisen/mm}^2$ (1,2 $\mu\text{g Eisen/Versuch}$) eine hohe lokale Sterblichkeit der HL-1 Zellen aus im Vergleich zu SO-Mag5 Partikeln. Erst durch Reduktion der PEI-Mag2 Menge auf unter 0,25 $\mu\text{g Eisen/mm}^2$ (max. 0,6 $\mu\text{g Eisen/Versuch}$) konnte ein lokales Zellsterben vermieden werden (Abbildung 12). Der PEI-Mag2 Partikel scheint also einen stärkeren Effekt auf die

Zellsterblichkeit zu haben als SO-Mag5. Dies steht in Übereinstimmung mit neueren Untersuchungen von S. Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn), die ein erhöhtes Absterben von Endothelzellen durch den Einsatz von PEI-Mag2 in einem LDH-Test nachgewiesen hat. Der Einsatz von bis zu $0,1 \mu\text{g Eisen}/\text{mm}^2$ auf bPAEC Zellen (bovine pulmonal-arterielle Endothelzellen) ergab ein signifikant erhöhtes Zellsterben, wohingegen dieselbe Eisenmenge an SO-Mag5 keinen Einfluss hatte (mündliche Kommunikation).

Ein Grund für die unterschiedliche Zelltoxizität von SO-Mag5 und PEI-Mag2 könnte in der unterschiedlichen Beschichtung liegen. Eine Beschichtung aus Siliziumoxid, die beim SO-Mag5 Partikel vorliegt, scheint keine erkennbaren Effekte auf die Zellsterblichkeit zu haben. Jedoch sind in der Literatur Hinweise zu finden, dass MNPs mit Polyethylenimin-Beschichtung, wie es bei PEI-Mag2 eingesetzt wird, die Zellfunktion stören oder einen erhöhten Zelltod verursachen. Der Grund liegt in der chemischen Struktur, insbesondere die primären und sekundären Amine sind toxisch (Fischer et al., 2003; Arsianti et al., 2010; Calarco et al., 2013). Außerdem werden MNPs unterschiedlich degradiert, was besonders von der Oberflächenbeschichtung abhängt und einen Einfluss auf die Zellvitalität hat (Lévy et al., 2010). Vermutlich erfolgt eine stärkere Degradation von PEI-Mag2 Partikeln, welche infolgedessen in geringerer Dosis als SO-Mag5 zu Schädigungen der Zellen führen. In diesem Zusammenhang berichtete Levy et al., dass die Degradation von MNPs mit einem starken Anstieg an löslichen Eisen-Ionen einhergeht, was die Zellphysiologie beeinflussen kann (Lévy et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass ein hohes Level an freiem Eisen Apoptose von Kupfer-Zellen induzieren kann (Lunov et al., 2010). Der genaue Mechanismus der MNP-Degradation ist unbekannt und nur unzureichend verstanden. Dieser muss genauer untersucht werden, um in Zukunft toxische Effekte ausschließen zu können.

In weiteren Versuchen wurde mit Hilfe von MEAs die Erregungsfortleitung innerhalb eines HL-1 Synzytiums unter lokaler Anreicherung der MNPs untersucht (siehe Kapitel 4.1.4). Hierbei konnten unter Anreicherung von SO-Mag5 ($0,76 \mu\text{g Eisen}/\text{mm}^2$; max. $1,8 \mu\text{g Eisen}/\text{Versuch}$) sowie PEI-Mag2 Partikeln ($0,19 \mu\text{g Eisen}/\text{mm}^2$; $0,45 \mu\text{g Eisen}/\text{Versuch}$) Feldpotentiale von den betroffenen Elektroden gemessen werden, was eine Zellsterblichkeit ausschloss. Jedoch waren die Feldpotentiale der Elektroden mit MNP-Anreicherung beeinträchtigt und vereinzelt waren Weiterleitungsstörungen erkennbar (Abbildung 13, 14). Damit scheinen die MNPs einen Einfluss auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der HL-1 Zellen auszuüben. Ein Grund könnte eine durch Degradation auftretende Erhöhung der zellulären Eisen-Konzentration sein, die für verminderte Feldpotentiale und für eine schlechtere Erregbarkeit und Weiterleitung der Zellen verantwortlich war. Außerdem können MNPs die Zellmembran schädigen, was eine

Beeinflussung der Membrankanäle bedeutet und damit die Membranströme einbeziehen würde. So wies Hoskins et al. morphologische Zellveränderungen durch MNPs nach, da die MNPs möglicherweise die Zellmembran direkt angriffen (Hoskins et al., 2012). Duan et al. konzentrierte seine Untersuchungen von MNPs speziell auf kardiovaskuläre Toxizitätseffekte *in vitro* und *in vivo*. Unter anderem zeigten die Ergebnisse eine dosis- und zeitabhängige Beeinflussung der Herzaktivität in Zebrafisch Embryonen, die eine deutliche Reduktion der Herzfrequenz aufwies (Duan et al., 2013). Gemeinhin liefert die Literatur viele Berichte über MNPs, welche die Zelleigenschaften auf ganz unterschiedliche Weise beeinflussen können. So geben mehrere Studien Hinweise darauf, dass MNPs die zelluläre Gen- und Proteinexpression aufgrund des degradierten freien Eisens (Soenen et al., 2010), des induzierten zellulären Stresses (z.B. durch ROS) (Kedziorek et al., 2010) oder durch perinukleäre MNP-Lokalisation beeinflussen können (Pisanic et al., 2007). Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse, dass MNPs einen drastischen Einfluss auf die Zellphysiologie haben können.

Für eine gentherapeutische Schrittmachergenerierung sind die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen äußerst wichtig und sollten nicht negativ beeinflusst werden, um eine Erregungsbildung und -weiterleitung zu ermöglichen. Jedoch zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss der MNPs auf die erfolgreiche Generierung eines lokalen Ersatzschrittmachers. Am anschaulichsten war dies beim optischen Schrittmacher ChR2 festzustellen, wenn die lokale Transduktion mit einer hohen Eisenmenge an SO-Mag5 ($0,76 \mu\text{g Eisen}/\text{mm}^2$; $1,8 \mu\text{g Eisen}/\text{Versuch}$) erfolgte. Trotz einer kräftigen lokalen Expression von ChR2 und keinem sichtbaren Zellsterben war ein Großteil der Zellen gar nicht oder nur schlecht optisch stimulierbar (Tabelle 7). Erst bei lokaler Transduktion mit niedrigerer SO-Mag5 Konzentration ($0,1 \mu\text{g Eisen}/\text{mm}^2$; $1/8$ der ursprünglichen Menge) konnten die ChR2-transduzierten Zellen durch Belichtung eine lokale Schrittmacheraktivität übernehmen (Abbildung 19). Ebenso gaben die Langzeitversuche der verschiedenen biologischen Schrittmachergene (HCN4, HCN2(E324A), Kir2.1AAA) keine überzeugenden Hinweise für einen erfolgreichen Schrittmacherwechsel (Abbildung 34, 35), wenn die lokale Transduktion mit einer hohen MNP-Menge erfolgte. Erst eine reduzierte SO-Mag5 Menge ($0,1 \mu\text{g Eisen}/\text{mm}^2$; $1/8$ der ursprünglichen Menge) führte in Langzeitversuchen mit dem dominant negativen Kir2.1AAA-Kanal nach 5 bis 6 Tagen zu einer erhöhten Schrittmacheraktivität im transduzierten Bereich (Abbildung 32). Zusammenfassend bestätigen diese Versuche, dass für die Generierung eines lokalen Schrittmachers nur eine begrenzte Eisenmenge eingesetzt werden sollte, da ansonsten die elektrophysiologischen Eigenschaften negativ beeinflusst wurden. Die Beobachtung stimmt mit Erkenntnissen von Duan et al. überein,

welcher bei Embryonen unter MNP-Einfluss eine geringere Herzfrequenz messen konnte (siehe oben).

Obwohl eine MNP-vermittelte Transduktion die Transduktionsrate erhöht, ist die Transduktionseffizienz aufgrund der limitiert einzusetzenden Eisenmenge eingeschränkt. Dies zeigt sich besonders bei Betrachtung der physikalischen und infektiösen Virustiter, welche teilweise sehr unterschiedlich ausfallen können (Tabelle 1). Aufgrund einer linearen Beziehung zwischen physikalischen Virustiter und MNPs bei der Komplexierung, ist ein schlechtes Verhältnis zwischen physikalischem und infektiösem Virustiter nicht durch einen erhöhten MNP-Einsatz auszugleichen und die Wahrscheinlichkeit einer hohen Transduktionsrate ist daher nur begrenzt möglich. In Zukunft könnte hier der Einsatz anderer Virusarten (z.B. Adenoviren) helfen, um die Transduktionseffizienz zu steigern (Sapet et al., 2012; Vannucci et al., 2013). Für eine weitere Diskussion zur biologischen Schrittmachergenerierung wird auf die Kapitel 5.5 und 5.6 verwiesen.

Grundsätzlich sind toxische Effekte der MNPs dosisabhängig, können aber schon in geringerer Menge Einfluss auf physiologische Eigenschaften haben. Prinzipiell verdeutlichen diese Resultate, dass durch die klassischen Toxizitätstests (wie z.B. MTT) zur Zellsterblichkeit kein ausreichender Informationsgewinn über den Zustand der Zellen gewonnen werden kann. Alternativ könnten hierbei verschiedene Apoptose-Assays (z.B. Annexin V, Caspase 3) helfen, um bessere Aussagen über das Vorliegen und den zeitlichen Ablauf einer zellulären Apoptose machen zu können. Zusätzlich sollte in Zukunft neben gängigen Toxizitätsstudien auch die Untersuchung wichtiger (elektro-) physiologischer Eigenschaften der Zellen im Vordergrund stehen.

5.2 Lokale Transduktion mittels MNPs und Magneten

In der biomedizinischen Forschung findet die Methode der Magnetofektion eine breite Anwendung, um Transfektions- bzw. Transduktionseffizienz von verschiedenen Zelltypen zu steigern (Haim et al., 2004; Hofmann et al., 2009; Plank et al., 2003; Scherer et al., 2002). Dabei wird durch Applikation eines magnetischen Feldes eine stärkere Sedimentation der MNPs inklusive der gekoppelten Viren verursacht, so dass infolge der Kontakt mit den Zellen und dadurch die Möglichkeit einer endozytotischen Aufnahme gesteigert wird (Arsianti et al., 2010; Huth et al., 2004). Unsere Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) konnten die Virusbindungseigenschaft und Transduktionseffizienz von verschiedenen neuen MNPs charakterisieren (Trueck et al., 2012). Dabei fielen besonders die beiden Kandidaten SO-Mag5 und PEI-Mag2 positiv für die Transduktion von Herzmuskelzellen

auf, so dass die beiden Partikel als Grundlage für die lokalen Transduktionsversuche dienten (Dissertation von C. Trueck).

Bislang fanden Untersuchungen zur Genexpression mittels Magnetofektion auf einem gesamten Zellrasen statt und eine lokalisierte Genexpression wurde wenig betrachtet. Weber et al. zeigte eine erste lokalisierte Expression innerhalb eines Zellrasens durch Verwendung von kleinen Stabmagneten von 5 mm Durchmesser (Weber et al., 2009). Für eine Transduktion kleinerer Flächen von unter 2 mm² besitzen kleine Stabmagneten kein ausreichend starkes Magnetfeld. Daher wurden von unseren Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik (IMETUM), Technische Universität München) verschiedene Magnetspitzen konstruiert, welche in Kombination mit einem starken Permanentmagneten ein ausreichend starkes Magnetfeld auf einer Fläche von ca. 1 mm Durchmesser erzeugten. Mit einem Abstand von 200 µm zwischen Zellschicht und Magnetspitze konnten alle drei hergestellten Spitzentypen für eine lokale Anreicherung der MNP/LV-Komplexe verwendet werden, was in einer entsprechend lokalen Genexpression auf einer Fläche von 1-2 mm² resultierte (Abbildung 9, 10) (Kilgus et al., 2012). Die experimentellen Daten der lokalen Transduktionen konnten von der Arbeitsgruppe Gleich anhand von Computersimulationen zur Verteilung der MNP/LV-Komplexe mit sehr hoher Übereinstimmung vorhergesagt werden (Abbildung 9, 10) (Kilgus et al., 2012). Ein genauere Vergleich der Transduktionsergebnisse bei Verwendung der beiden 1 mm Spitzen zeigte, dass das Design der Spitzen die Lokalisationseffizienz beeinflusste. So ermöglichte die gerade geformte 1 mm Magnetspitze eine höhere und lokalere Expression als die konisch geformte Spitze (Abbildung 10). Bei der konischen Form treten die Magnetfeldlinien an der Spitze in einem flacheren Winkel aus, was für eine größere Streuung sorgte. Zudem ist der Austritt der Magnetfeldlinien an den Kanten der Magnetspitze stärker, wodurch es zu einer geringeren Anreicherung im innersten Radiusbereich ($r = 250 \mu\text{m}$) kam (Abbildung 10). Die gerade Form konnte die beiden nachteiligen Effekte korrigieren, da die Magnetfeldlinien in einem steileren Winkel aus der Magnetspitze austreten. Das führte zu einer homogeneren Transduktion mit deutlich weniger Streuung außerhalb des Transduktionsbereichs (Abbildung 10). Insgesamt zeigten die lokalen Transduktionsversuche, dass die Verwendung von Magneten und magnetischen Nanopartikeln eine vielversprechende gentherapeutische Methode *in vitro* darstellen und somit hohes Potential für *in vivo* Anwendungen bieten. Ansätze, in denen Wirkstoffe wie Doxorubicin mittels MNPs gezielt im Körper angereichert wurden, sind bereits gezeigt worden (Wilson et al., 2004). So könnte diese Methode von hoher medizinischer Relevanz sein, um in Zukunft Gene oder Wirkstoffe innerhalb des Körpers zu lokalisieren.

Lokale Transduktionsexperimente mit einer erhöhten Distanz von 1 mm zwischen Zellschicht und Magnetspitze verringerten die Lokalisationseffekte und gingen mit einer weiten Streuung der Expression einher. Das Problem ist die Magnetstärke, deren Maximum direkt an der Magnetspitze vorliegt und mit steigender Entfernung stark abnimmt. Da der Gradient der magnetischen Flussdichte nicht weiter beeinflusst werden kann, bleibt nur die Möglichkeit die Streuung auf indirektem Wege zu verringern. Durch einen zweiten Gegenpol gegenüber der Magnetspitze könnte die Form des Magnetfeldes verändert und eine radiale Verteilung minimiert werden. Der starke Abfall der magnetischen Flussdichte mit der Entfernung beschränkt den möglichen Einsatz für *in vivo* Anwendungen, so dass diese Methode zurzeit nur oberflächennah einzusetzen wäre. Für Anwendungen in tieferen Geweben muss in Zukunft nach weiteren technischen Möglichkeiten zur Erzeugung genauerer und stärkerer Magnetfelder gesucht werden. Interessant ist hierbei die Entwicklung von nicht-magnetischen Stents, die erst durch ein starkes externes Magnetfeld magnetisiert werden und daraufhin eine magnetische Anziehungskraft auf applizierte MNPs ausüben (Chorny et al., 2010). Einen hoffnungsvollen Einsatz versprechen außerdem MRI-Systeme, welche bereits als magnetisches Leitsystem für Zellen *in vitro* verwendet wurden (Riegler et al., 2010) und damit großes Potential für *in vivo* Positionierungen von MNPs haben.

Prinzipiell muss aus biomedizinischer Sicht sichergestellt werden, dass die verwendeten MNP-Komplexe für einen *in vivo* Einsatz grundlegende Eigenschaften erfüllen. So sollten diese bei systemischer Gabe im Blut stabil vorliegen, kapillargängig sein und nicht vom Endothel absorbiert werden. Außerdem sollten die verwendeten MNPs keine toxischen Effekte oder einen negativen Einfluss auf die physiologischen Eigenschaften der Zellen bzw. des Zielgewebes haben (siehe Kapitel 5.1).

5.3 Lokale Zellpositionierung mittels MNPs und Magneten

Eine Markierung von Zellen durch MNPs, welche durch Endozytose aufgenommen werden, ist seit längerem bekannt und gestattet viele Anwendungsmöglichkeiten, wie MRI-Detektion und magnetassistierte Anreicherung (Wilhelm and Gazeau, 2008). In Zellersatztherapien bietet die Beladung mit MNPs eine interessante Möglichkeit, Zellen mit Hilfe eines magnetischen Feldes genauer zu positionieren und anzureichern. So konnte die Methode genutzt werden, um magnetisierte Endothelzellen an Gefäßwänden anzuhäufen (Hofmann et al., 2009; Pislaru et al., 2006; Wenzel et al., 2012).

In dieser Arbeit wurde der Ansatz zur Beladung von Kardiomyozyten mit MNPs aufgegriffen. Innerhalb der DFG-Forschergruppe eignete sich zur Zellmarkierung besonders der SO-Mag5 Partikel, was auf seine Verträglichkeit *in vitro* und auf sein hohes

magnetisches Moment zurückzuführen war (Kilgus et al., 2012; Mykhaylyk et al., 2012; Trueck et al., 2012). Untersuchungen zur Toxizität von S. Rieck (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) belegten keine Zellsterblichkeit von Endothelzellen, die mit unterschiedlichen Mengen an SO-Mag5 von maximal 200 pg Eisen/Zelle beladen wurden (mündliche Kommunikation). Zur Beladung mit SO-Mag5 wurden in dieser Arbeit sowohl HL-1 Kardiomyozyten als auch aufgereinigte ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten untersucht. Die proliferative HL-1 Zelllinie ließ sich bereits durch deutlich niedrigere Mengen an SO-Mag5 beladen. Hingegen waren ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten schlechter zu markieren, was auf dem ausdifferenzierten und post-mitotischen Zustand beruhen könnte (Abbildung 37).

Eine lokale Positionierung von wenigen tausend Zellen auf ein kleines Areal von 1-2 mm² ist in der Literatur bisher nicht beschrieben, so dass mit Hilfe der 1 mm Spitze eine lokale Anreicherung von beladenen Kardiomyozyten auf eine kleine Fläche *in vitro* untersucht wurde. Die Anreicherung erfolgte auf dem ca. 2 mm² großen Elektrodenbereich eines MEAs, um ein funktionales und elektrisch gekoppeltes Synzytium zu generieren, bestehend aus wenigen tausend ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten (Abbildung 38) (Kilgus et al., 2012). Ohne eine lokale Anreicherung benötigt man gewöhnlich für die Generierung eines solchen Synzytiums aus ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten über hunderttausend Zellen, damit ein MEA mit einer Gesamtfläche von ca. 300 mm² vollständig bedeckt wäre. Die Herstellung und Aufreinigung einer solch hohen Zellanzahl ist sehr zeit- und kostenintensiv (Kolossoff et al., 2006), so dass mit der Methode zur lokalen Zellpositionierung über 95% der Zellen gespart wurden. Auf diese Weise können in Zukunft selbst geringe Zellzahlen von aufwendig zu gewinnenden oder krankheitsspezifischen Kardiomyozyten mit MEAs untersucht werden.

Bisher kamen MNP-beladene Kardiomyozyten auf dem Gebiet der Gewebezüchtung zum Einsatz. So konnte diese Technik genutzt werden, um *in vitro* ein 3-dimensionales Synzytium zu erzeugen oder eine ringförmige Gewebestruktur aus Kardiomyozyten mit kontraktilen Eigenschaften zu formen (Shimizu et al., 2007; Akiyama et al., 2010; Ito and Kamihira, 2011). Ferner sind MNPs für die Zelltherapie *in vivo* von großer Bedeutung, da diese Technik eine deutliche bessere Zellintegration ins Gewebe erlaubt und für Zelltransplantationen neue Möglichkeiten eröffnet. Cheng et al. konnte eine zelluläre Integration von magnetisierten Kardiomyozyten (*Cardiosphere-Derived Cells*) ins Gewebe nach intramyokardialer Injektion mit Hilfe eines Magneten deutlich steigern (Cheng et al., 2010, 2012). Analog belegen Arbeiten von A. Ottersbach (Institut für Physiologie I, Universität Bonn), dass durch Applikation eines magnetischen Feldes MNP-beladene embryonale Kardiomyozyten nach Injektion in den Ventrikel von Mäuseherzen besser

zurückgehalten werden und deutlich besser im Gewebe anwachsen (mündliche Kommunikation).

5.4 Generierung eines lokalen optischen Schrittmachers

Das wichtigste Ziel dieser Arbeit bestand in der lokalisierten Generierung eines Ersatzschrittmachers innerhalb eines bestehenden Kardiomyozytenverbunds. Neben der Auswahl eines spezifischen, aber regional begrenzten Areals innerhalb eines Zellverbundes sollte eine starke Lokalisation von Schrittmachergenen bzw. Schrittmacherzellen zu einer deutlich besseren Möglichkeit zur Schrittmachergenerierung führen. Die räumliche Abgrenzung einer Anhäufung von schrittmacherfähigen Zellen zu den übrigen Kardiomyozyten erhöht die Wahrscheinlichkeit einer gerichteten Depolarisation des umgebenden Synzytiums im Vergleich zu einzelnen diffus verteilten Schrittmacherzellen (siehe Kapitel 5.6). Um einen ersten Beweis einer lokalen Schrittmachergenerierung *in vitro* zu liefern, wurde die MEA Technologie verwendet, die eine Analyse der Erregungsausbreitung auf 2-dimensionaler Ebene erlaubte. Als Schrittmacher diente der lichtsensitive Ionenkanal ChR2. Dieser nichtselektive Ionenkanal konnte bereits *in vitro* und *in vivo* zur optischen Stimulation von Kardiomyozyten genutzt werden (Arrenberg et al., 2010; Bruegmann et al., 2010). Mit Hilfe einer lokalen Transduktion mit SO-Mag5 (0,1 µg Eisen/mm²; 0,22 µg Eisen/Versuch) gelang es, einen regionalen optischen Schrittmacher mit einem Durchmesser von ca. 1,5 mm zu generieren, der unter Beleuchtung den gesamten Zellrasen erregen konnte. Das Ergebnis zeigt, dass ein Zellareal mit diesen Ausmaßen ausreicht, um als Einheit eine übergreifende Schrittmacheraktivität zu übernehmen.

Das Prinzip einer lokalen Schrittmachergenerierung konnte ebenso mit Hilfe einer lokalen Zellpositionierung von ChR2-Kardiomyozyten gezeigt werden, um einen lokalen Schrittmacher aus ChR2-exprimierenden ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten innerhalb eines HL-1 Zellrasen zu generieren (siehe Kapitel 4.6.2). Dabei war eine Zahl von ca. 10.000 positionierten Kardiomyozyten ausreichend, die unter Beleuchtung Schrittmacheraktivität des HL-1 Zellrasens übernahmen (Abbildung 39).

Prinzipiell bestätigen die Versuche den Einsatz von ChR2 als potentiellen Schrittmacherersatz, wie dies bereits durch transgene Tiere geschah (Arrenberg et al., 2010; Bruegmann et al., 2010). Zudem zeigen die Ergebnisse beider Versuchsmethoden, dass bereits eine lokale Anreicherung von Zellen mit Schrittmacheraktivität fähig ist, das umliegende Areal stabil zu erregen. Bisher war eine Einbeziehung der Lokalität wenig beachtet. Grund hierfür war eine fehlende Methode, die eine exakte und lokal begrenzte Transduktion bzw. Zellpositionierung erlaubte. Bisherige Versuche beschreiben eine

Erregungsübertragung bei Mischkulturen aus ChR2-exprimierenden HEK-Zellen und nativen Kardiomyozyten (Jia et al., 2011).

Insgesamt beleuchten die hier gezeigten Versuche (siehe Kapitel 4.2.4 und 4.6.2) zum ersten Mal, dass eine lokale Expression von Schrittmachergenen bzw. Zellen ausreichend ist, um Schrittmacheraktivität in einem Zellsynzytium aus HL-1 Kardiomyozyten zu übernehmen. Diese Versuche bildeten somit die Grundlage für die Untersuchung weiterer Möglichkeiten zum biologischen Schrittmacherersatz.

5.5 Biologischer Ersatzschrittmacher durch lokalen Gentransfer

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit lag in der Identifizierung möglicher biologischer Schrittmachergene und deren Untersuchung als lokale Ersatzschrittmacher innerhalb eines Kardiomyozytenverbunds. Speziell für diese Untersuchung wurde eine neue *in vitro* Methode entwickelt, die eine Langzeitanalyse der Schrittmacheraktivität über mehrere Tage erlaubte. Als Grundsystem diente wiederum die MEA Technologie. Jedoch waren damit bislang keine kontinuierlichen Langzeitanalysen über mehrere Tage realisierbar. Mit Hilfe eines eigenen geschriebenen Skripts für Oringin8Pro wurde eine nachträgliche Auswertung der Ausbreitungsrichtung aller einzelnen Schläge möglich. Dadurch waren über den gesamten Versuchsverlauf von mehreren Tagen die auftretenden Schrittmacher in Ausprägung (Dominanz), Stabilität und Frequenz auswertbar. Damit bietet diese Methode eine ganz neue und außergewöhnliche Anwendung, um die Effektivität von Schrittmachergenen zur Schrittmachergenerierung im Zellverbund prüfen zu können. Bisherige Forschungen zur Schrittmachergenerierung konzentrierten sich hauptsächlich auf Untersuchungen an Einzelzellen oder auf Tierversuche. Langzeitmessungen an Einzelzellen sind nicht durchführbar und auch bei *in vivo* Untersuchungen sind Aussagen über die Stabilität sowie genauere Analysen der generierten Schrittmacher über lange Zeit nur schwer möglich. *In vivo* ist eine Übernahme des Ersatzschrittmachers häufig erst nach Ablation des Vorhofs erkennbar und mit der Tötung des Tieres verbunden (Bucchi et al., 2006; Cai et al., 2007; Qu et al., 2003). Somit bietet die hier beschriebene Methode eine neue und vielversprechende Alternative, um die Effizienz von potentiellen Schrittmachergenen zukünftig im Zellverbund *in vitro* und über einen längeren Zeitraum zu testen.

Eine Möglichkeit zur Schrittmachergenerierung wurde von Miake et al. vorgestellt, indem durch Expression eines dominant negativen Kanals zur Inhibition des I_{K1} -Strom in einzelnen ventrikulären Kardiomyozyten eine erhöhte Schrittmacheraktivität generiert werden konnte (Miake et al., 2002, 2003). Eine Expression dieses Kir2.1AAA-Kanals in HL-1 Einzelzellen lieferte im Vergleich zu Kontrollzellen einen signifikant höheren Anteil

an Zellen mit spontaner Aktivität in Verbindung mit einer erhöhten Eigenfrequenz (Abbildung 26). In Übereinstimmung wurde eine gesteigerte Schrittmacheraktivität ebenso in isolierten Kardiomyozyten beobachtet, die aus einer transgenen Maus mit ubiquitärer Expression des Kir2.1AAA-Kanals isoliert wurden (McLerie and Lopatin, 2003).

Die Verwendung dieses Kir2.1AAA-Kanals in lokalen Transduktionsversuchen mit geringer SO-Mag5 Menge (0,1 µg Eisen/mm²; 0,22 µg Eisen/Versuch) generierte einen alternativen Ersatzschrittmacher mit erhöhter Schrittmacheraktivität (Abbildung 32). Langzeituntersuchungen der Schrittmacheraktivität ergaben einen signifikanten Anstieg der Schrittmacherereignisse nach 5 bis 6 Tagen aus der transduzierten Region. Jedoch war die generierte Schrittmacheraktivität bei Betrachtung der Einzelversuche in keinem Fall über einen längeren Zeitraum stabil. Mögliche Gründe können in einer zu niedrigen oder auch wechselnden Schrittmacherfrequenz liegen, so dass die generierte Schrittmacheraktivität mit nativer Schrittmacheraktivität der nicht transduzierten HL-1 Zellen konkurrierte. Dennoch bestätigten diese Versuche das Prinzip einer erfolgreichen Schrittmachergenerierung aufgrund einer lokalen Expression von Schrittmachergenen. Miake et al. konnte nach ventrikulärer Expression des Kir2.1AAA-Kanals in 40% der Versuchstiere eine geänderte Schrittmacheraktivität von der Injektionsstelle des Ventrikel ausgehend messen. Allerdings sind keine Hinweise zur Langzeitstabilität gegeben (Miake et al., 2002). Bei Untersuchungen intakter Herzen von transgenen Mäusen mit ubiquitärer Expression des mutierten Kir2.1AAA-Kanals konnte hingegen keine ektopische Aktivität beobachtet werden (McLerie and Lopatin, 2003). Das verdeutlicht, dass eine lokale Expression des Kir2.1AAA-Kanals die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Schrittmachergenerierung erhöht.

Demgegenüber wird zur Schrittmachergenerierung viel häufiger eine Überexpression der klassischen Schrittmacherkanäle (HCN-Kanäle) gewählt (Qu et al., 2003; Cai et al., 2007; Plotnikov et al., 2004, 2008). In der hier vorliegenden Arbeit wurden deswegen sowohl HCN4 sowie HCN2(E324A) in HL-1 Zellen getestet, wobei native HL-1 Zellen HCN2 aber kein HCN4 besitzen (Sartiani et al., 2002). Eine Überexpression von HCN4 in HL-1 Einzelzellen führte zu einem signifikanten Anstieg des I_f-Stroms im Vergleich zu nativen HL-1 Zellen. Dies konnte ebenso bei isolierten ventrikulären Kardiomyozyten gemessen werden, die zuvor mit einem HCN4 Virus transduziert wurden (Cai et al., 2007). Eine Expression des HCN2(E324A)-Kanals in HL-1 Zellen erhöhte den Anteil an Einzelzellen mit spontaner Schrittmacheraktivität auf ca. 60%, wohingegen native HL-1 Zellen nur bis zu einem Anteil von 30% spontan aktiv sind (Sartiani et al., 2002).

Für eine *in vitro* Schrittmachergenerierung im Zellverbund wurde die lokale Transduktion von HCN4 oder HCN2(E324A) verwendet. Durchgeführte Langzeitanalysen zur Erregungsausbreitung konnten jedoch in keinem einzigen Fall eine erfolgreiche

Generierung eines Schrittmachers im Zellverbund identifizieren. Dies kann im Zusammenhang mit dem Einsatz einer hohen Menge SO-Mag5 stehen ($\sim 0,8 \mu\text{g}$ Eisen/ mm^2 ; $\sim 1,8 \mu\text{g}$ Eisen/Versuch), was Störungen in der Erregungsfortleitung verursachen kann (siehe Kapitel 5.1). *In vivo* Versuche, in denen Viren zur HCN4 bzw. zur HCN2(E324A)-Expression in den Ventrikel injiziert wurden, zeigten nach einigen Tagen eine erhöhte Schrittmacheraktivität im Ventrikel (Bucchi et al., 2006; Cai et al., 2007). Jedoch konnte dies nur beobachtet werden, wenn der Primärrhythmus des Sinusknotens unterbrochen wurde. Bezogen auf die lokalen Transduktionsversuche kann das bedeuten, dass die spontane Schrittmacheraktivität nativer HL-1 Zellen in ihrer Frequenz höher war und infolgedessen eine Schrittmacherübernahme durch den transduzierten Zellbereich nicht erfolgen konnte. Generell sind Versuche zur Schrittmachergenerierung durch Überexpression verschiedener HCN-Subtypen bisher wenig erfolgreich. Neben einer niedrigen Stabilität liegt die generierte Schrittmacherfrequenz oft unterhalb der physiologischen Herzfrequenz (Qu et al., 2003; Plotnikov et al., 2004; Bucchi et al., 2006). So zeigten *in vivo* Experimente erst nach Sinusknotenablation eine erhöhte Anzahl an Schrittmachererregungen aus dem Bereich der Injektionsstelle des Herzens. Außerdem reagierten die Ersatzschrittmacher nur unzureichend auf sympathische oder parasymphatische Einflüsse.

Neuere Daten weisen darauf hin, dass zur erfolgreichen Schrittmachergenerierung auf ein enges Zusammenspiel verschiedener Ionenkanäle geachtet werden soll. In dieser Hinsicht berichtete Lieu et al., dass eine übermäßige HCN-Expression sogar eine Schrittmacheraktivität unterdrücken kann (Lieu et al., 2008; Nattel, 2008). Viel wichtiger scheint etwa das Verhältnis aus I_f/I_{K1} zu sein (Li, 2012). Dies bestätigten Versuche mit transfizierten Kardiomyozyten, bei denen eine stabilere Schrittmacheraktivität durch Koexpression von HCN-Kanälen mit Kir2.1-Kanälen erreicht wurde (Chan et al., 2009). Ebenso konnte durch eine Koexpression von HCN-Kanälen und Na^+ -Kanälen (SkM1) in Kardiomyozyten ein stabilerer Schrittmacher erzeugt werden (Boink et al., 2013). Selbst die Zusammensetzung der HCN-Kanäle aus unterschiedlichen HCN-Subtypen kann einen positiven Einfluss auf die Depolarisation der Zellen haben (Ye and Nerbonne, 2009; Zhang et al., 2009).

Allgemein scheint die Ursache für native Schrittmacheraktivität von Schrittmacherzellen nicht allein an einzelne Ionenkanäle, wie die HCN-Kanäle, gekoppelt zu sein. Vielmehr besteht darüber hinaus ein enges Zusammenspiel aus *Membrane Clock* und *Calcium Clock* (Chen et al., 2010; Lakatta et al., 2010; Lakatta and Maltsev, 2013). So kann die Schrittmacheraktivität durch spezifische I_f -Blocker wie Ivabradine nie vollständig inhibiert werden (Brown et al., 1982; Thollon et al., 2007). Außerdem zeigen verschiedene Publikationen, dass insbesondere im Embryonalstadium intrazelluläre Kalzium-

oszillationen an der Schrittmacheraktivität beteiligt sind (Lakatta et al., 2006; Sasse et al., 2007). Ein detailliertes Zusammenspiel der beiden Systeme muss noch weiter erforscht werden. Dennoch scheint eine Manipulation der *Membrane Clock* nicht zwingend ausreichend, um eine stabile Schrittmacheraktivität zu erzeugen. Die gleichzeitige Manipulation der *Calcium Clock* könnte hierbei zu einem Erfolg der Schrittmachergenerierung beitragen.

Insgesamt deuten alle Daten darauf hin, dass zur Generierung eines Ersatzschrittmachers in Zukunft mehrere Gene manipuliert werden müssen. Einen interessanten Ansatz in diese Richtung geben Tbx-Transkriptionsfaktoren, welche bei der Herz- und Sinusknotenentwicklung eine wichtige Rolle einnehmen (Wiese et al., 2009; Greulich et al., 2011). Kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl Tbx3 als auch Tbx18 durch Überexpression in adulten Herzmuskelzellen zu einer Reprogrammierung in Schrittmacher-ähnliche Zellen führten. (Bakker et al., 2012; Kapoor et al., 2011, 2012). Allerdings konnte in der hier vorliegenden Arbeit eine Überexpression von Tbx18 keine Schrittmacheraktivität in HL-1 Zellen und in embryonalen Kardiomyozyten auslösen (Abbildung 28). Vermutlich hatte eine Tbx18-Überexpression einen geringeren Einfluss auf atriale Zellen (wie z.B. die HL-1 Zelllinie) im Vergleich zu ventrikulären Zellen. Außerdem kann es sein, dass eine Tbx18-Überexpression zu keiner verstärkten Schrittmacheraktivität bei embryonalen Kardiomyozyten führt, da diese selber spontan aktiv sind (Maltsev et al., 1994; Sasse et al., 2007). Trotz alledem verspricht die Reprogrammierung von Kardiomyozyten in Schrittmacher-ähnliche Zellen hohes Potential, um in Zukunft mögliche biologische Schrittmacher zu generieren (Lakatta and Maltsev, 2013).

5.6 Verhältnis zwischen Schrittmacherquelle und Erregungswahrscheinlichkeit (*source-sink mismatch*)

Der Sinusknoten als primärer Schrittmacher besitzt einen besonderen strukturellen Aufbau, der zusätzlich zu den zellulären Eigenschaften der Schrittmacherzellen erheblich dazu beiträgt, eine regelmäßige Erregung zu initialisieren und an die Umgebung stabil weiterzuleiten. So ist der Sinusknoten strukturell von Arterien, Fett und fibrösem Gewebe umgeben, was als elektrische Barriere dient und den Sinusknoten vor hyperpolarisierenden Einflüssen des Atriums schützt (Boyett et al., 2000; Fedorov et al., 2009). Innerhalb des Sinusknotens gibt es für eine Erregungsförderung sogar spezielle Weiterleitungswege (*exit pathways*) (Fedorov et al., 2009). Weiterhin ist der Aufbau des Sinusknotens selber sehr heterogen gestaltet, was sich an unterschiedlichen genetischen Expressionsmustern im zentralen und peripheren Sinusknoten widerspiegelt (Tellez et al.,

2006). Dies zeigt sich beispielsweise an unterschiedlich ausgeprägten intrazellulären Kalzium-Transienten (Lancaster et al., 2004) oder an verschiedenen Entstehungsorten der Schrittmacherimpulse innerhalb des Sinusknotens (Boineau et al., 1984; Efimov et al., 2010; Fedorov et al., 2010). Interessant ist die Erkenntnis eines schwächeren Zell-Zellkontakts im Sinusknoten aufgrund einer verminderten Cx43 Expression (Verheijck et al., 2001; Fedorov et al., 2012). In dieser Hinsicht bestätigten *in vitro* Versuche eine verbesserte Schrittmacherfunktionalität, wenn ein verminderter Zellkontakt durch fehlende Expression von Cx43 vorlag (Fahrenbach et al., 2008). Das zeigt, dass eine Vielzahl an Faktoren Einfluss auf eine stabile und rhythmische Schrittmacheraktivität nehmen.

Grundsätzlich muss für eine erfolgreiche Schrittmacheraktivität erstens eine Erregung gebildet und zweitens eine Fortleitung an das umliegende Gewebe gewährleistet werden können. Ausschlaggebend ist die Fähigkeit einer Schrittmacherquelle (*source*) selber zu depolarisieren und ein initiales Aktionspotential auszulösen, ohne dass der Strom zuvor an die Umgebung abfließt (*sink*). Dafür muss eine minimale elektrische Barriere vorhanden sein. Jedoch darf diese Barriere nicht zu groß sein, da das ausgelöste Aktionspotential schließlich an das umliegende Gewebe weitergegeben werden muss, wo es in ausreichendem Maße bis zum Schwellenpotential depolarisieren und ein weiterleitendes Aktionspotential auslösen soll (Rohr, 1997; Wang et al., 2000; Auerbach et al., 2011). Die genauen Voraussetzungen für ein richtiges Verhältnis zwischen *source* und *sink* sind bisher nicht verstanden, um eine stabile Erregung zu generieren. Experimentell sind diese Daten sowohl *in vitro* also auch *in vivo* schwierig zu überprüfen, da eine lokalisierte Genexpression innerhalb eines Zellverbunds nicht möglich war. *In vitro* Daten belegen bisher, dass ventrikuläre Kardiomyozyten nur innerhalb eines 2-Zell Synzytiums durch eine modifizierte Schrittmacherzelle stabil erregt werden können, wenn beide Zelltypen Cx43 exprimieren und daher eine gute Kopplung durch *gap junctions* aufweisen (Valiunas et al., 2009). Die hier vorgestellten *in vitro* Versuche beleuchten zum ersten Mal auf 2-dimensionaler Ebene, dass bereits eine kleine Fläche ($< 2 \text{ mm}^2$) mit ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten ausreicht, um die umliegenden Zellen zu erregen und damit eine stabile Schrittmacheraktivität zu übernehmen (Abbildung 19). Bei der lokalen Transduktion mit ChR2 befanden sich im Transduktionsbereich mit einem Radius von $750 \mu\text{m}$ ungefähr 4.000 HL-1 Zellen (Durchmesser HL-1 Zelle: $\sim 25 \mu\text{m}$). In den Experimenten zur magnetischen Positionierung waren weniger als 10.000 ChR2-exprimierende Kardiomyozyten nötig, um ein HL-1-Synzytium stabil zu erregen. Beide Ansätze, sowohl Zelltransduktion als auch -positionierung, ermöglichten eine stabile Erregungsbildung und -weiterleitung mit wenigen tausend Zellen. Damit geben die experimentellen Versuche eine Zellzahl und somit eine Größenordnung, die für eine erfolgreiche Erregung im 2-dimensionalen Raum erforderlich ist. Hinweise gaben bislang

nur mathematische Modelle, welche Aktionspotentialweiterleitungen im Gewebe unter Einbeziehung von verschiedenen Bedingungen simulieren und berechnen konnten (Joyner and van Capelle, 1986; Podziemski and Żebrowski, 2013; Xie et al., 2010). Dazu lieferte Xie et al. eine quantitative Annäherung, indem durch Computersimulationen die minimal nötige Anzahl an Zellen berechnet wurde, um die umgebenden Zellen in einem ausreichendem Maße zu erregen. Unter der Annahme einer guten Kopplung zwischen den Zellen sind für eine erfolgreiche Weiterleitung eines Aktionspotentials auf 2-dimensionaler Ebene ~7.000 Kardiomyozyten erforderlich (Xie et al., 2010). Beide Versuche, lokale Transduktion sowie Zellpositionierung, bestätigen experimentell die mittels Simulation berechneten Zahlenwerte von Xie et al. in einem 2-dimensionalen Zellverbund.

Zum besseren Verständnis der Schrittmachergenerierung *in vivo* sollte darauf aufbauend das *source-sink* Verhältnis im 3-dimensionalen Gewebe betrachtet werden. Hilfreiche Erkenntnisse liefern mathematische Berechnungen. So konnte Xie et al. anhand von Computersimulationen eine Anzahl von ~700.000 Kardiomyozyten für eine erfolgreiche Erregung im 3-dimensionalen Raum prognostizieren (Xie et al., 2010). Experimentelle Einblicke sind durch *in vivo* Versuche zur Schrittmachergenerierung möglich. Hierbei werden sowohl gen- als auch zelltherapeutische Ansätze verfolgt. In gentherapeutischen Ansätzen konnten mittels ventrikulärer Injektion viraler Vektoren verstärkt ektopische Erregungen nachgewiesen werden (Bucchi et al., 2006; Miake et al., 2002; Plotnikov et al., 2008; Qu et al., 2003). Trotzdem sind virale Injektionen im Herzen von Diffusion und Transduktionseffizienz abhängig, so dass eine regional begrenzte Genexpression der Injektionsstelle prinzipiell eingeschränkt ist. Außerdem ist die Anzahl an transduzierten Zellen im Bereich der Injektionsstelle nur schwer abzuschätzen und genaue Zahlen sind nicht dokumentiert.

Hingegen kann bei zelltherapeutischen Ansätzen eine Anzahl der transplantierten Zellen angegeben werden, wobei jedoch nur ein Teil der Zellen anwachsen kann. So injizierte Plotnikov et al. 700.000 hMSCs in Ventrikel von Hunden, wobei 40% der Zellen HCN2 exprimierten. Diese Anzahl war ausreichend, um nach Sinusknotenablation eine Schrittmacheraktivität im Herzen von Hunden zu übernehmen (Plotnikov et al., 2007). Darauf aufbauend isolierte Zhang et al. 400.000 Zellen aus dem Sinusknoten des Hundes und implantierte diese wiederum im Ventrikel von Hunden. Die transplantierten Sinusknotenzellen konnten ebenfalls vermehrt Schrittmacheraktivität übernehmen (Zhang et al., 2011). Interessanterweise spiegeln die eingesetzten Zellzahlen von ca. 400.000 bis 700.000 Zellen eine Größenordnung wider, die mit Berechnungen aus Computersimulationen von Xie et al. übereinstimmen (siehe oben) (Xie et al., 2010). Weiterführend muss jedoch auch betont werden, dass durch Zelltransplantationen kein

stabiler und physiologischer Ersatzschrittmacher generiert werden konnte. Mögliche Probleme der fokalen Zellinjektion liegen in einer hohen Zellsterblichkeit und einer Begrenzung der Zelllokalisierung bei der Injektionsstelle. Dessen ungeachtet verdeutlichen die Injektionsversuche von isolierten Schrittmacherzellen in den Ventrikel die Bedeutung der anatomischen und strukturellen Eigenschaften des Sinusknotens, die durch eine Implantation nicht wiederhergestellt werden konnten (Zhang et al., 2011).

Zusammenfassend konnte in den *in vivo* Versuchen zur Schrittmachergenerierung sowohl gen- als auch zelltherapeutisch kein stabiler Schrittmacher generiert werden. Eine durch Injektion erfolgte Lokalisation scheint nicht ausreichend zu sein. Die Verwendung von MNPs und Magneten könnte einen entscheidenden Vorteil bieten, um eine Lokalisation deutlich zu erhöhen und eine stärkere Abgrenzung zum umliegenden Gewebe zu schaffen. Cheng et al. konnte bereits zeigen, dass magnetisierte Zellen nach intramyokardialer Injektion mit Hilfe eines Magneten besser zurückgehalten werden und dadurch deutlich besser anwachsen konnten (Cheng et al., 2012, 2010). Eine gesteigerte Lokalisation mit starker regionaler Begrenzung könnte dazu beitragen die *source-sink* Problematik *in vivo* zu überwinden und einen stabileren Schrittmacher zu generieren.

6 Fazit / Ausblick

Elektrische Herzschrittmacher haben in den letzten Jahrzehnten eine enorme technische Entwicklung genommen und werden seit Jahrzehnten in der Klinik regelmäßig eingesetzt. Trotzdem besteht ein Interesse nach alternativen Möglichkeiten wie der Einsatz von biologischen Ersatzschrittmachern. Neben den bereits erwähnten Problemen von elektrischen Herzschrittmachern hat Rosen et al. die Vorzüge eines biologischen Schrittmachers dargelegt (Rosen et al., 2008). So wird ein Ersatz insbesondere unter folgenden Voraussetzungen interessant:

- bei gleicher Effektivität wie ein elektrischer Herzschrittmacher
- wenn es einen lebenslangen Ersatz bietet mit einer stabilen physiologischen Herzfrequenz, die zudem auf das autonome Nervensystem reagieren kann
- wenn die Stelle des Ersatzes zu einer verbesserten kardialen Aktivierung führt
- wenn der Ersatz keinen schädigenden Effekt hervorruft (z.B. Arrhythmien, Inflammation, Infektionen oder Neoplasien)

In dieser Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung von biologischen Schrittmachern im Zellverbund untersucht, wobei ein überaus wichtiger Aspekt hierbei in der lokalisierten und regional begrenzten Generierung lag. So konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Lokalität für eine Schrittmachergenerierung von entscheidender Bedeutung ist. Als Beweis dienten lokale Transduktionsversuche von ChR2 sowie lokale Zellpositionierungen von ChR2-exprimierenden Kardiomyozyten. In beiden Fällen konnte durch Lichtstimulation die Schrittmacheraktivität über den gesamten Kardiomyozytenrasen übernommen werden. Somit sollte in Zukunft der Aspekt der Lokalität bei Untersuchungen zur biologischen Schrittmacheraktivität deutlich mehr Beachtung finden. Ein Einsatz der in dieser Arbeit etablierten Methoden, die sich der MNPs und Magneten bedienen, sollte dafür weiterhin ausgebaut werden.

Die Generierung eines biologischen und physiologischen Ersatzschrittmachers scheint mit der bisherig verwendeten Möglichkeit einer Überexpression einzelner Ionenkanäle nicht möglich. So fehlt es entweder an zufriedenstellender stabiler Schrittmacheraktivität oder die Schrittmacheraktivität war mit den physiologischen Eigenschaften eines nativen Schrittmachers nicht vergleichbar. Bessere Ergebnisse zur Schrittmachergenerierung lieferten Koexpressionen verschiedener Gene, wie z.B. HCN und Kir2.1 (Chan et al., 2009). Einen relativ neuen und innovativen Lösungsansatz verspricht die Verwendung von Transkriptionsfaktoren (z.B. durch Tbx18). Erste Publikationen zeigten damit eine direkte Reprogrammierung von Kardiomyozyten in Schrittmacher-ähnliche Zellen (Bakker et al., 2012; Kapoor et al., 2012). Eine lokalisierte Konversion eines Zellareals in

Schrittmacher-ähnliche Zellen mit Hilfe von MNPs hat sicherlich mehr Potential, um eine regional übergreifende Schrittmacheraktivität erzeugen zu können. Dies könnte in Kombination mit weiteren Kanalproteinen (wie z.B. HCN) geschehen, um zusätzlich den I_f -Strom zu erhöhen. Somit wäre es möglich, einen stabileren und physiologischen Schrittmacher zu generieren.

Ähnliche Konzepte werden bei der Zellersatztherapie verfolgt. Dabei liegt die Hoffnung in der *in vitro* Differenzierung oder Modifikation von humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPS) bzw. von humanen embryonalen Stammzellen (hESCs) zu Schrittmacher-ähnlichen Zellen, welche schließlich ins Gewebe transplantiert werden und Schrittmacheraktivität übernehmen sollen (Potapova, 2004; Shiba et al., 2009). Hierbei kann der Einsatz von MNPs und Magneten ebenso bei einer besseren Lokalisation sowie einem besseren Anwachsen der implantierten Zellen helfen. Beim derzeitigen Stand der Wissenschaft liefern beide Ansätze, sowohl Gentherapie als auch Zellersatztherapie, mit der (Re-)Programmierung in Schrittmacherzellen oder Schrittmacher-ähnliche Zellen die erfolgversprechendsten Möglichkeiten einer physiologischen Schrittmachergenerierung.

Im direkten Vergleich lieferten die optischen Schrittmacher in dieser Arbeit die besseren Ergebnisse zur Schrittmachergenerierung. Jedoch müssen für *in vivo* Anwendungen zusätzlich die technischen Voraussetzungen für eine optische Stimulation gegeben sein, was natürlich eine weitere Entwicklung erfordert. Außerdem müssen Langzeitstudien belegen, dass optische Schrittmacher über einen längeren Zeitraum ohne Fehlfunktion als Ersatzschrittmacher operieren können. Daneben besitzen optische Schrittmacher den Vorteil, dass sie zudem als optische Defibrillatoren eingesetzt werden könnten und bei atrialen oder ventrikulären Arrhythmien wieder einen normalen Herzrhythmus herstellen können (Sasse, 2011).

Ein Interesse an alternativen biologischen Schrittmachern bleibt weiterhin bestehen, da diese für eine Funktionalität keine technischen Hilfsmittel benötigen und bestenfalls sogar im Stande sind auf eine autonome Regulation zu reagieren und die Herzfrequenz entsprechend anpassen können.

7 Zusammenfassung

Herzrhythmusstörungen sind Unregelmäßigkeiten der Herzfrequenz, welche für die erkrankten Patienten eine vitale Gefährdung darstellen und sogar tödlich verlaufen können. Ursachen liegen häufig in Störungen des Erregungsbildungs- sowie Weiterleitungssystems und haben oftmals die Implantation eines elektrischen Herzschrittmachers zur Folge. Aufgrund einiger Limitationen der elektrischen Schrittmacher existiert ein fortwährendes Interesse zur Generierung eines alternativen biologischen Ersatzschrittmachers. Jedoch waren die durch Gen- und Zelltherapie generierten Schrittmacher entweder instabil oder nicht mit den Eigenschaften eines nativen Schrittmachers vergleichbar.

Ziel dieser Arbeit war es, mit dem Einsatz von MNPs und angewendeten Magnetfeldern eine räumlich begrenzte Transduktion oder Zellpositionierung innerhalb eines Zellverbunds zu bewirken und dadurch einen lokalen Ersatzschrittmacher zu generieren. Dazu wurde in einem ersten Schritt eine Methode zur Durchführung einer lokalen Transduktion *in vitro* etabliert, welche sich die physikalischen Eigenschaften von MNPs und eines spezifischen Magnetfeldes mittels speziell konstruierter Magnetspitzen zunutze macht. Die Methode erlaubt bei globaler Applikation der MNP/LV-Komplexe innerhalb von 30 Minuten einen kleinen Zellbereich von 1-2 mm² erfolgreich zu transduzieren. Als Beweis zur Schrittmachergenerierung wurde mit dieser Methode eine lokale Expression von ChR2 auf einem Zellrasen aus HL-1 Kardiomyozyten erzeugt. Die transduzierten Kardiomyozyten konnten optisch erfolgreich stimuliert werden und als örtlicher Ersatzschrittmacher für den gesamten HL-1 Zellverbund agieren. Für eine Langzeitanalyse von biologischen Schrittmachern auf 2-dimensionaler Ebene wurde eine neue Analyseverfahren entwickelt, die eine Schrittmacherauswertung jeden Schlages über mehrere Tage erlaubt. Damit konnten Aussagen über Stabilität, Ausprägung und Frequenz der Schrittmacher eingeholt werden. Die Technik diente zur Bewertung der Schrittmacheraktivität des lokal exprimierten, dominant negativen Kir2.1AAA-Kanals, welcher trotz auftretender Instabilität eine signifikant erhöhte Schrittmacheraktivität zeigte. Generell konnte jedoch die Generierung eines biologischen Ersatzschrittmachers durch lokale Expression einzelner Schrittmachergene, wie die HCN-Kanäle oder Kir2.1AAA-Kanal, nicht in stabiler Form etabliert werden. In diesem Zusammenhang wurde auch ein Einfluss der MNPs aufgedeckt. Entsprechend der eingesetzten Eisenmenge wurden entweder Zelltoxizität oder Beeinträchtigungen der elektrophysiologischen Zeleigenschaften beobachtet.

Der Einsatz von MNPs und Magneten wurde zudem erfolgreich zur Zellpositionierung verwendet. So wurden mit MNP-beladene und ChR2-exprimierende Kardiomyozyten auf einen HL-1 Zellrasen lokalisiert und konnten unter Lichtstimulation Schrittmacheraktivität über den gesamten HL-1 Zellverbund übernehmen.

Zusammenfassend zeigten die optischen Schrittmacher in dieser Arbeit die stabileren Ergebnisse bezüglich einer generierten Schrittmacheraktivität, jedoch muss eine Funktionalität in Langzeitversuchen noch bewiesen werden.

Generell ermöglicht der Einsatz von MNPs und Magnetfeldern eine gute Lokalisation *in vitro* für die Gen- und Zelltherapie. Damit verspricht es zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für *in vivo* Applikationen, in denen es zu einer lokalen Positionierung oder Anreicherung von Genen, Zellen und Wirkstoffen beitragen kann. Trotz des Potentials der MNPs darf die potentielle Toxizität oder ein physiologischer Effekt der MNPs auf die Zellen nicht unbeachtet bleiben und muss in Zukunft deutlich stärker in den Fokus rücken.

8 Literaturverzeichnis

- Akiyama, H., Ito, A., Sato, M., Kawabe, Y., Kamihira, M., 2010. Construction of Cardiac Tissue Rings Using a Magnetic Tissue Fabrication Technique. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 2910–2920. doi:10.3390/ijms11082910
- Al-Deen, F.N., Ho, J., Selomulya, C., Ma, C., Coppel, R., 2011. Superparamagnetic nanoparticles for effective delivery of malaria DNA vaccine. *Langmuir* 27, 3703–3712. doi:10.1021/la104479c
- Alexiou, C., Jurgons, R., Schmid, R.J., Bergemann, C., Henke, J., Erhardt, W., Huenges, E., Parak, F., 2003. Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* 11, 139–149. doi:10.1080/1061186031000150791
- Arrenberg, A.B., Stainier, D.Y.R., Baier, H., Huisken, J., 2010. Optogenetic control of cardiac function. *Science* 330, 971–974. doi:10.1126/science.1195929
- Arsianti, M., Lim, M., Marquis, C.P., Amal, R., 2010. Polyethylenimine Based Magnetic Iron-Oxide Vector: The Effect of Vector Component Assembly on Cellular Entry Mechanism, Intracellular Localization, and Cellular Viability. *Biomacromolecules* 11, 2521–2531. doi:10.1021/bm100748p
- Auerbach, D.S., Grzda, K.R., Furspan, P.B., Sato, P.Y., Mironov, S., Jalife, J., 2011. Structural heterogeneity promotes triggered activity, reflection and arrhythmogenesis in cardiomyocyte monolayers. *The Journal of Physiology* 589, 2363–2381. doi:10.1113/jphysiol.2010.200576
- Bakker, M.L., Boink, G.J.J., Boukens, B.J., Verkerk, A.O., van den Boogaard, M., den Haan, A.D., Hoogaars, W.M.H., Buermans, H.P., de Bakker, J.M.T., Seppen, J., 2012. T-box transcription factor TBX3 reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovascular research* 94, 439–449.
- Baruscotti, M., Bucchi, A., Difrancesco, D., 2005. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker (“funny”) current. *Pharmacol. Ther.* 107, 59–79. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.01.005
- Bellin, M.-F., 2006. MR contrast agents, the old and the new. *Eur J Radiol* 60, 314–323. doi:10.1016/j.ejrad.2006.06.021
- Binggeli, C., Duru, F., Corti, R., Sudano, I., Spieker, L.E., Turina, A., Westermann, P., Ostermeier, M., Rahn, M., Lüscher, T.F., Noll, G., Candinas, R., 2000. Autonomic nervous system-controlled cardiac pacing: a comparison between intracardiac impedance signal and muscle sympathetic nerve activity. *Pacing Clin Electrophysiol* 23, 1632–1637.

- BMBF 2011: „Nanotechnologie Aktionsplan 2015“, Bonn, Berlin 2011, n.d.
- Bogdanov, K.Y., Maltsev, V.A., Vinogradova, T.M., Lyashkov, A.E., Spurgeon, H.A., Stern, M.D., Lakatta, E.G., 2006. Membrane Potential Fluctuations Resulting From Submembrane Ca²⁺ Releases in Rabbit Sinoatrial Nodal Cells Impart an Exponential Phase to the Late Diastolic Depolarization That Controls Their Chronotropic State. *Circulation Research* 99, 979–987. doi:10.1161/01.RES.0000247933.66532.0b
- Bogdanov, K.Y., Vinogradova, T.M., Lakatta, E.G., 2001. Sinoatrial Nodal Cell Ryanodine Receptor and Na⁺-Ca²⁺ Exchanger: Molecular Partners in Pacemaker Regulation. *Circulation Research* 88, 1254–1258. doi:10.1161/hh1201.092095
- Boineau, J.P., Miller, C.B., Schuessler, R.B., Roeske, W.R., Autry, L.J., Wylds, A.C., Hill, D.A., 1984. Activation sequence and potential distribution maps demonstrating multicentric atrial impulse origin in dogs. *Circulation Research* 54, 332–347. doi:10.1161/01.RES.54.3.332
- Boink, G.J.J., Duan, L., Nearing, B.D., Shlapakova, I.N., Sosunov, E.A., Anyukhovskiy, E.P., Bobkov, E., Kryukova, Y., Ozgen, N., Danilo, P., Cohen, I.S., Verrier, R.L., Robinson, R.B., Rosen, M.R., 2013. HCN2/SkM1 Gene Transfer Into Canine Left Bundle Branch Induces Stable, Autonomically Responsive Biological Pacing at Physiological Heart Rates. *Journal of the American College of Cardiology* 61, 1192–1201. doi:10.1016/j.jacc.2012.12.031
- Boyett, Honjo, H., Kodama, I., 2000. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc. Res.* 47, 658–687.
- Boyett, M.R., Honjo, H., Kodama, I., 2000. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular research* 47, 658–687.
- Brignole, M., 2002. Sick sinus syndrome. *Clin. Geriatr. Med.* 18, 211–227.
- Bromberg, B.I., Hand, D.E., Schuessler, R.B., Boineau, J.P., 1995. Primary negativity does not predict dominant pacemaker location: implications for sinoatrial conduction. *Am. J. Physiol.* 269, H877–887.
- Brown, H.F., DiFrancesco, D., Noble, S.J., 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280, 235–236.
- Bruegmann, T., Malan, D., Hesse, M., Beiert, T., Fuegemann, C.J., Fleischmann, B.K., Sasse, P., 2010. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nature Methods* 7, 897–900. doi:10.1038/nmeth.1512
- Bucchi, A., Plotnikov, A.N., Shlapakova, I., Danilo Jr, P., Kryukova, Y., Qu, J., Lu, Z., Liu, H., Pan, Z., Potapova, I., 2006. Wild-type and mutant HCN channels in a tandem biological-electronic cardiac pacemaker. *Circulation* 114, 992–999.

- Cai, J., Yi, F.F., Li, Y.H., Yang, X.C., Song, J., Jiang, X.J., Jiang, H., Lin, G.S., Wang, W., 2007. Adenoviral gene transfer of HCN4 creates a genetic pacemaker in pigs with complete atrioventricular block. *Life sciences* 80, 1746–1753.
- Calarco, A., Bosetti, M., Margarucci, S., Fusaro, L., Nicoli, E., Petillo, O., Cannas, M., Galderisi, U., Peluso, G., 2013. The genotoxicity of PEI-based nanoparticles is reduced by acetylation of polyethylenimine amines in human primary cells. *Toxicol. Lett.* 218, 10–17. doi:10.1016/j.toxlet.2012.12.019
- Chan, Y.A.U.C.H.I., SIU, C.W.A.H., LAU, Y.E.E.M.A.N., LAU, C.H.U.P.A.K., LI, R.A., TSE, H.F.A.T., 2009. Synergistic effects of inward rectifier (IK1) and pacemaker (If) currents on the induction of bioengineered cardiac automaticity. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 20, 1048–1054.
- Chandler, N.J., Greener, I.D., Tellez, J.O., Inada, S., Musa, H., Molenaar, P., DiFrancesco, D., Baruscotti, M., Longhi, R., Anderson, R.H., Billeter, R., Sharma, V., Sigg, D.C., Boyett, M.R., Dobrzynski, H., 2009. Molecular Architecture of the Human Sinus Node: Insights Into the Function of the Cardiac Pacemaker. *Circulation* 119, 1562–1575. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.804369
- Chanteau, B., Fresnais, J., Berret, J.-F., 2009. Electrosteric enhanced stability of functional sub-10 nm cerium and iron oxide particles in cell culture medium. *Langmuir* 25, 9064–9070. doi:10.1021/la900833v
- Chen, P.-S., Joung, B., Shinohara, T., Das, M., Chen, Z., Lin, S.-F., 2010. The initiation of the heart beat. *Circ. J.* 74, 221–225.
- Cheng, K., Li, T.S., Malliaras, K., Davis, D.R., Zhang, Y., Marbán, E., 2010. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circulation research* 106, 1570–1581.
- Cheng, K., Malliaras, K., Li, T.S., Sun, B., Houde, C., Galang, G., Smith, J., Matsushita, N., Marban, E., 2012. Magnetic Enhancement of Cell Retention, Engraftment, and Functional Benefit After Intracoronary Delivery of Cardiac-Derived Stem Cells in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion. *Cell transplantation* 21, 1121–1135.
- Chorny, M., Fishbein, I., Yellen, B.B., Alferiev, I.S., Bakay, M., Ganta, S., Adamo, R., Amiji, M., Friedman, G., Levy, R.J., 2010. Targeting stents with local delivery of paclitaxel-loaded magnetic nanoparticles using uniform fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 8346–8351. doi:10.1073/pnas.0909506107
- Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., Izzo, N.J., 1998. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 2979–2984.

- Colombo, M., Carregal-Romero, S., Casula, M.F., Gutiérrez, L., Morales, M.P., Böhm, I.B., Heverhagen, J.T., Prosperi, D., Parak, W.J., 2012. Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chemical Society Reviews* 41, 4306. doi:10.1039/c2cs15337h
- Duan, J., Yu, Y., Li, Y., Yu, Y., Sun, Z., 2013. Cardiovascular toxicity evaluation of silica nanoparticles in endothelial cells and zebrafish model. *Biomaterials* 34, 5853–5862. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.032
- Efimov, I.R., Fedorov, V.V., Joung, B., Lin, S.-F., 2010. Mapping Cardiac Pacemaker Circuits: Methodological Puzzles of the Sinoatrial Node Optical Mapping. *Circulation Research* 106, 255–271. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.209841
- Fahrenbach, J.P., Ai, X., Banach, K., 2008. Decreased intercellular coupling improves the function of cardiac pacemakers derived from mouse embryonic stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45, 642–649. doi:10.1016/j.yjmcc.2008.08.013
- Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., Chang, R., 2012. Conduction barriers and pathways of the sinoatrial pacemaker complex: their role in normal rhythm and atrial arrhythmias. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302, H1773–H1783.
- Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., Chang, R., KostECKI, G., Aferol, H., Hucker, W.J., Wuskell, J., Loew, L.M., Schuessler, R.B., Moazami, N., Efimov, I.R., 2010. Optical mapping of the isolated coronary-perfused human sinus node. *J Am Coll Cardiol* 56, 1386–1394. doi:10.1016/j.jacc.2010.03.098
- Fedorov, V.V., Schuessler, R.B., Hemphill, M., Ambrosi, C.M., Chang, R., Voloshina, A.S., Brown, K., Hucker, W.J., Efimov, I.R., 2009. Structural and Functional Evidence for Discrete Exit Pathways That Connect the Canine Sinoatrial Node and Atria. *Circulation Research* 104, 915–923. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.193193
- Fee, C.J., 2007. Size comparison between proteins PEGylated with branched and linear poly(ethylene glycol) molecules. *Biotechnol. Bioeng.* 98, 725–731. doi:10.1002/bit.21482
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T., 2003. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121–1131.
- Golenhofen, K., 2006. *Basislehrbuch Physiologie mit StudentConsult-Zugang: Lehrbuch, Kompendium, Fragen und Antworten*, 4th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Greulich, F., Rudat, C., Kispert, A., 2011. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc. Res.* 91, 212–222. doi:10.1093/cvr/cvr112

- Haim, H., Steiner, I., Panet, A., 2004. Synchronized Infection of Cell Cultures by Magnetically Controlled Virus. *Journal of Virology* 79, 622–625. doi:10.1128/JVI.79.1.622-625.2005
- Halbach, M.D., Egert, U., Hescheler, J., Banach, K., 2003. Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures. *Cellular Physiology and Biochemistry* 13, 271–284.
- Hofmann, A., Wenzel, D., Becher, U.M., Freitag, D.F., Klein, A.M., Eberbeck, D., Schulte, M., Zimmermann, K., Bergemann, C., Gleich, B., 2009. Combined targeting of lentiviral vectors and positioning of transduced cells by magnetic nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 44–49.
- Honjo, H., 2003. Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release Is Not a Dominating Factor in Sinoatrial Node Pacemaker Activity. *Circulation Research* 92, 41e–44. doi:10.1161/01.RES.0000055904.21974.BE
- Hoskins, C., Cuschieri, A., Wang, L., 2012. Cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. *J Nanobiotechnol* 10, 15.
- Hülser, T., 2003. Strukturelle und magnetische eigenschaften von eisenkarbid-und eisenoxid-nanopartikeln. Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Duisburg-Essen, Duisburg-Essen.
- Huth, S., Lausier, J., Gersting, S.W., Rudolph, C., Plank, C., Welsch, U., Rosenecker, J., 2004. Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med* 6, 923–936. doi:10.1002/jgm.577
- Ito, A., Kamihira, M., 2011. Tissue engineering using magnetite nanoparticles. *Prog Mol Biol Transl Sci* 104, 355–395. doi:10.1016/B978-0-12-416020-0.00009-7
- Jia, Z., Valiunas, V., Lu, Z., Bien, H., Liu, H., Wang, H.-Z., Rosati, B., Brink, P.R., Cohen, I.S., Entcheva, E., 2011. Stimulating Cardiac Muscle by Light: Cardiac Optogenetics by Cell Delivery. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4, 753–760. doi:10.1161/CIRCEP.111.964247
- Jordan, A., Wust, P., Fähling, H., John, W., Hinz, A., Felix, R., 2009. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. 1993. *Int J Hyperthermia* 25, 499–511. doi:10.3109/02656730903287790
- Joyner, R.W., van Capelle, F.J., 1986. Propagation through electrically coupled cells. How a small SA node drives a large atrium. *Biophys. J.* 50, 1157–1164. doi:10.1016/S0006-3495(86)83559-7

- Ju, Y.-K., Allen, D.G., 1999. How does β -adrenergic stimulation increase the heart rate? The role of intracellular Ca^{2+} release in amphibian pacemaker cells. *The Journal of physiology* 516, 793–804.
- Kapoor, N., Galang, G., Marbán, E., Cho, H.C., 2011. Transcriptional suppression of Connexin43 by Tbx18 undermines cell-cell electrical coupling in postnatal cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 286, 14073–14079.
- Kapoor, N., Liang, W., Marbán, E., Cho, H.C., 2012. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of Tbx18. *Nature Biotechnology* 31, 54–62. doi:10.1038/nbt.2465
- Kedziorek, D.A., Muja, N., Walczak, P., Ruiz-Cabello, J., Gilad, A.A., Jie, C.C., Bulte, J.W.M., 2010. Gene expression profiling reveals early cellular responses to intracellular magnetic labeling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine* 63, 1031–1043. doi:10.1002/mrm.22290
- Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J., Gepstein, L., 2004. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 22, 1282–1289. doi:10.1038/nbt1014
- Keith, A., Flack, M., 1907. The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *J Anat Physiol* 41, 172–189.
- Kilgus, C., Heidsieck, A., Ottersbach, A., Roell, W., Trueck, C., Fleischmann, B.K., Gleich, B., Sasse, P., 2012. Local Gene Targeting and Cell Positioning Using Magnetic Nanoparticles and Magnetic Tips: Comparison of Mathematical Simulations with Experiments. *Pharmaceutical research* 1–12.
- Kindermann, M., 2001. Sport bei Patienten mit Herzschrittmacher. *DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN* 52.
- Kindermann, M., Schwaab, B., Berg, M., Fröhlig, G., 2001. Longevity of dual chamber pacemakers: device and patient related determinants. *Pacing Clin Electrophysiol* 24, 810–815.
- Klinke, R., Silbernagl, S., 2005. *Lehrbuch der Physiologie*, 4., korr. A. ed. Thieme, Stuttgart.
- Kolossov, E., Bostani, T., Roell, W., Breitbach, M., Pillekamp, F., Nygren, J.M., Sasse, P., Rubenchik, O., Fries, J.W.U., Wenzel, D., Geisen, C., Xia, Y., Lu, Z., Duan, Y., Kettenhofen, R., Jovinge, S., Bloch, W., Bohlen, H., Welz, A., Hescheler, J., Jacobsen, S.E., Fleischmann, B.K., 2006. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *Journal of Experimental Medicine* 203, 2315–2327. doi:10.1084/jem.20061469

- Laaksonen, T., Santos, H., Vihola, H., Salonen, J., Riikonen, J., Heikkilä, T., Peltonen, L., Kumar, N., Murzin, D.Y., Lehto, V.-P., Hirvonen, J., 2007. Failure of MTT as a Toxicity Testing Agent for Mesoporous Silicon Microparticles. *Chemical Research in Toxicology* 20, 1913–1918. doi:10.1021/tx700326b
- Lakatta, E.G., Maltsev, V.A., 2013. Reprogramming paces the heart. *Nat. Biotechnol.* 31, 31–32. doi:10.1038/nbt.2480
- Lakatta, E.G., Maltsev, V.A., Vinogradova, T.M., 2010. A Coupled SYSTEM of Intracellular Ca²⁺ Clocks and Surface Membrane Voltage Clocks Controls the Timekeeping Mechanism of the Heart's Pacemaker. *Circulation Research* 106, 659–673. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206078
- Lakatta, E.G., Vinogradova, T.M., Maltsev, V.A., 2008. The missing link in the mystery of normal automaticity of cardiac pacemaker cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1123, 41–57. doi:10.1196/annals.1420.006
- Lancaster, M.K., Jones, S.A., Harrison, S.M., Boyett, M.R., 2004. Intracellular Ca²⁺ and pacemaking within the rabbit sinoatrial node: heterogeneity of role and control. *J. Physiol. (Lond.)* 556, 481–494. doi:10.1113/jphysiol.2003.057372
- Lévy, M., Lagarde, F., Maraloiu, V.-A., Blanchin, M.-G., Gendron, F., Wilhelm, C., Gazeau, F., 2010. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology* 21, 395103. doi:10.1088/0957-4484/21/39/395103
- Lewis, T., 1910. Galvanometric curves yielded by acrdiac beats generated in various areas of the auricular musculature: Pacemaker of the heart. *Heart* 2, 23–46.
- Li, R.A., 2012. Gene-and cell-based bio-artificial pacemaker: what basic and translational lessons have we learned&quest. *Gene therapy* 19, 588–595.
- Lieu, D.K., Chan, Y.C., Lau, C.P., Tse, H.F., Siu, C.W., Li, R.A., 2008. Overexpression of HCN-encoded pacemaker current silences bioartificial pacemakers. *Heart Rhythm* 5, 1310–1317. doi:10.1016/j.hrthm.2008.05.010
- Lipka, J., Semmler-Behnke, M., Sperling, R.A., Wenk, A., Takenaka, S., Schleh, C., Kissel, T., Parak, W.J., Kreyling, W.G., 2010. Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection. *Biomaterials* 31, 6574–6581. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.009
- Lu, C.-W., Hung, Y., Hsiao, J.-K., Yao, M., Chung, T.-H., Lin, Y.-S., Wu, S.-H., Hsu, S.-C., Liu, H.-M., Mou, C.-Y., Yang, C.-S., Huang, D.-M., Chen, Y.-C., 2007. Bifunctional magnetic silica nanoparticles for highly efficient human stem cell labeling. *Nano Lett.* 7, 149–154. doi:10.1021/nl0624263
- Lübbe, A.S., Alexiou, C., Bergemann, C., 2001. Clinical applications of magnetic drug targeting. *J. Surg. Res.* 95, 200–206. doi:10.1006/jsre.2000.6030

- Lunov, O., Syrovets, T., Röcker, C., Tron, K., Ulrich Nienhaus, G., Rasche, V., Mailänder, V., Landfester, K., Simmet, T., 2010. Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes. *Biomaterials* 31, 9015–9022. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.003
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., Jordan, A., 2010. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology* 103, 317–324. doi:10.1007/s11060-010-0389-0
- Maltsev, V.A., Wobus, A.M., Rohwedel, J., Bader, M., Hescheler, J., 1994. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circulation Research* 75, 233–244. doi:10.1161/01.RES.75.2.233
- McBain, S.C., Yiu, H.H., Dobson, J., 2008. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *Int J Nanomedicine* 3, 169–180.
- McLerie, M., Lopatin, A.N., 2003. Dominant-negative suppression of I(K1) in the mouse heart leads to altered cardiac excitability. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 367–378.
- Miake, J., Marbán, E., Nuss, H.B., 2002. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 419, 132–133. doi:10.1038/419132b
- Miake, J., Marbán, E., Nuss, H.B., 2003. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2. 1 overexpression and dominant-negative suppression. *Journal of Clinical Investigation* 111, 1529–1536.
- Monfredi, O., Dobrzynski, H., Mondal, T., Boyett, M.R., Morris, G.M., 2010. The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review. *Pacing Clin Electrophysiol* 33, 1392–1406. doi:10.1111/j.1540-8159.2010.02838.x
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155, 335–350.
- Mykhaylyk, O., Antequera, Y.S., Vlaskou, D., Plank, C., 2007. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nature Protocols* 2, 2391–2411. doi:10.1038/nprot.2007.352
- Mykhaylyk, O., Sánchez-Antequera, Y., Vlaskou, D., Hammerschmid, E., Anton, M., Zelphati, O., Plank, C., 2010. Liposomal magnetofection. *Methods Mol. Biol.* 605, 487–525. doi:10.1007/978-1-60327-360-2_34
- Mykhaylyk, O., Sobisch, T., Almstätter, I., Sanchez-Antequera, Y., Brandt, S., Anton, M., Döblinger, M., Eberbeck, D., Settles, M., Braren, R., Lerche, D., Plank, C., 2012. Silica-Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Modified for Gene Delivery: A Search for

- Optimum and Quantitative Criteria. *Pharmaceutical Research* 29, 1344–1365. doi:10.1007/s11095-011-0661-9
- Mykhaylyk, O., Zelphati, O., Rosenecker, J., Plank, C., 2008. siRNA delivery by magnetofection. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 10, 493–505.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., Bamberg, E., 2003. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 13940–13945.
- Nam, J.-M., Thaxton, C.S., Mirkin, C.A., 2003. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 301, 1884–1886. doi:10.1126/science.1088755
- Nathans, D., Smith, H.O., 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 273–293. doi:10.1146/annurev.bi.44.070175.001421
- Nattel, S., 2008. Inward rectifier-funny current balance and spontaneous automaticity: cautionary notes for biologic pacemaker development. *Heart Rhythm* 5, 1318–1319. doi:10.1016/j.hrthm.2008.06.014
- Nelson, G.D., 1993. A brief history of cardiac pacing. *Texas Heart Institute Journal* 20, 12.
- Paul, F., Melville, D., Roath, S., Warhurst, D., 1981. A bench top magnetic separator for malarial parasite concentration. *IEEE Transactions on Magnetics* 17, 2822–2824. doi:10.1109/TMAG.1981.1061711
- Perea, H., Aigner, J., Heverhagen, J.T., Hopfner, U., Wintermantel, E., 2007. Vascular tissue engineering with magnetic nanoparticles: seeing deeper. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 318–321. doi:10.1002/term.32
- Pfeifer, A., Hofmann, A., 2009. Lentiviral transgenesis. *Methods Mol. Biol.* 530, 391–405. doi:10.1007/978-1-59745-471-1_21
- Pisanic, T.R., Blackwell, J.D., Shubayev, V.I., Fiñones, R.R., Jin, S., 2007. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials* 28, 2572–2581. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.043
- Pislaru, S.V., Harbuzariu, A., Gulati, R., Witt, T., Sandhu, N.P., Simari, R.D., Sandhu, G.S., 2006. Magnetically Targeted Endothelial Cell Localization in Stented Vessels. *Journal of the American College of Cardiology* 48, 1839–1845. doi:10.1016/j.jacc.2006.06.069
- Plank, C., Schillinger, U., Scherer, F., Bergemann, C., Rémy, J.-S., Krötz, F., Anton, M., Lausier, J., Rosenecker, J., 2003. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol. Chem.* 384, 737–747. doi:10.1515/BC.2003.082

- Plotnikov, A.N., Bucchi, A., Shlapakova, I., Danilo, P., Jr, Brink, P.R., Robinson, R.B., Cohen, I.S., Rosen, M.R., 2008. HCN212-channel biological pacemakers manifesting ventricular tachyarrhythmias are responsive to treatment with I(f) blockade. *Heart Rhythm* 5, 282–288. doi:10.1016/j.hrthm.2007.09.028
- Plotnikov, A.N., Shlapakova, I., Szabolcs, M.J., Danilo, P., Jr, Lorell, B.H., Potapova, I.A., Lu, Z., Rosen, A.B., Mathias, R.T., Brink, P.R., Robinson, R.B., Cohen, I.S., Rosen, M.R., 2007. Xenografted adult human mesenchymal stem cells provide a platform for sustained biological pacemaker function in canine heart. *Circulation* 116, 706–713. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.703231
- Plotnikov, A.N., Sosunov, E.A., Qu, J., Shlapakova, I.N., Anyukhovskiy, E.P., Liu, L., Janse, M.J., Brink, P.R., Cohen, I.S., Robinson, R.B., 2004. Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 109, 506–512.
- Podziemski, P., Żebrowski, J.J., 2013. A simple model of the right atrium of the human heart with the sinoatrial and atrioventricular nodes included. *Journal of Clinical Monitoring and Computing* 27, 481–498. doi:10.1007/s10877-013-9429-6
- Potapova, I., 2004. Human Mesenchymal Stem Cells as a Gene Delivery System to Create Cardiac Pacemakers. *Circulation Research* 94, 952–959. doi:10.1161/01.RES.0000123827.60210.72
- Puertas, S., Batalla, P., Moros, M., Polo, E., Del Pino, P., Guisan, J.M., Grazú, V., de la Fuente, J.M., 2011. Taking advantage of unspecific interactions to produce highly active magnetic nanoparticle-antibody conjugates. *ACS Nano* 5, 4521–4528. doi:10.1021/nn200019s
- Qu, J., Plotnikov, A.N., Danilo Jr, P., Shlapakova, I., Cohen, I.S., Robinson, R.B., Rosen, M.R., 2003. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 107, 1106–1109.
- Riegler, J., Wells, J.A., Kyrtatos, P.G., Price, A.N., Pankhurst, Q.A., Lythgoe, M.F., 2010. Targeted magnetic delivery and tracking of cells using a magnetic resonance imaging system. *Biomaterials* 31, 5366–5371. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.032
- Rohr, S., 1997. Paradoxical Improvement of Impulse Conduction in Cardiac Tissue by Partial Cellular Uncoupling. *Science* 275, 841–844. doi:10.1126/science.275.5301.841
- Rosen, M.R., 2005. 15th annual Gordon K. Moe Lecture. Biological pacemaking: in our lifetime? *Heart Rhythm* 2, 418–428. doi:10.1016/j.hrthm.2004.12.016
- Rosen, M.R., Brink, P.R., Cohen, I.S., Robinson, R.B., 2004. Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovascular research* 64, 12–23.

- Rosen, M.R., Brink, P.R., Cohen, I.S., Robinson, R.B., 2007. Biological pacemakers based on I(f). *Med Biol Eng Comput* 45, 157–166. doi:10.1007/s11517-006-0060-2
- Rosen, M.R., Brink, P.R., Cohen, I.S., Robinson, R.B., 2008. Cardiac Pacing From Biological to Electronic... to Biological? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 54–61.
- Rosen, M.R., Robinson, R.B., Brink, P.R., Cohen, I.S., 2011. The road to biological pacing. *Nature Reviews Cardiology* 8, 656–666.
- Rosenecker, J., 2010. The long and winding road to clinical success in gene therapy. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12, 507–508.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.
- Sapet, C., Pellegrino, C., Laurent, N., Sicard, F., Zelphati, O., 2012. Magnetic nanoparticles enhance adenovirus transduction in vitro and in vivo. *Pharm. Res.* 29, 1203–1218. doi:10.1007/s11095-011-0629-9
- Sartiani, L., Bochet, P., Cerbai, E., Mugelli, A., Fischmeister, R., 2002. Functional expression of the hyperpolarization-activated, non-selective cation current I(f) in immortalized HL-1 cardiomyocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 545, 81–92.
- Sasse, P., 2011. Optical Pacing of the Heart The Long Way to Enlightenment. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4, 598–600.
- Sasse, P., Zhang, J., Cleemann, L., Morad, M., Hescheler, J., Fleischmann, B.K., 2007. Intracellular Ca²⁺ Oscillations, a Potential Pacemaking Mechanism in Early Embryonic Heart Cells. *The Journal of General Physiology* 130, 133–144. doi:10.1085/jgp.200609575
- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., Gansbacher, B., Plank, C., 2002. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene therapy* 9, 102–109.
- Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, Manfred, 2010. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbarem Repetitorium.* Springer-Medizin-Verl., Heidelberg.
- Schuessler, R.B., Boineau, J.P., Bromberg, B.I., 1996. Origin of the sinus impulse. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 7, 263–274.
- Scicchitano, P., Carbonara, S., Ricci, G., Mandurino, C., Locorotondo, M., Bulzis, G., Gesualdo, M., Zito, A., Carbonara, R., Dentamaro, I., 2012. HCN Channels and Heart Rate. *Molecules* 17, 4225–4235.

- Shi, W., Wymore, R., Yu, H., Wu, J., Wymore, R.T., Pan, Z., Robinson, R.B., Dixon, J.E., McKinnon, D., Cohen, I.S., 1999. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res.* 85, e1–6.
- Shiba, Y., Hauch, K.D., Laflamme, M.A., 2009. Cardiac applications for human pluripotent stem cells. *Curr. Pharm. Des.* 15, 2791–2806.
- Shimizu, K., Ito, A., Lee, J.-K., Yoshida, T., Miwa, K., Ishiguro, H., Numaguchi, Y., Murohara, T., Kodama, I., Honda, H., 2007. Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 803–809. doi:10.1002/bit.21094
- Soenen, S.J.H., Himmelreich, U., Nuytten, N., Pisanic, T.R., 2nd, Ferrari, A., De Cuyper, M., 2010. Intracellular nanoparticle coating stability determines nanoparticle diagnostics efficacy and cell functionality. *Small* 6, 2136–2145. doi:10.1002/sml.201000763
- Tellez, J.O., Dobrzynski, H., Greener, I.D., Graham, G.M., Laing, E., Honjo, H., Hubbard, S.J., Boyett, M.R., Billeter, R., 2006. Differential Expression of Ion Channel Transcripts in Atrial Muscle and Sinoatrial Node in Rabbit. *Circulation Research* 99, 1384–1393. doi:10.1161/01.RES.0000251717.98379.69
- Tipler, P.A., 1994. Physik. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.
- Tipler, P.A., Mosca, G., 2009. Physik: für Wissenschaftler und Ingenieure, 6. Aufl. 2009. ed. Spektrum Akademischer Verlag.
- Trappe, H.-J., Gummert, J., 2011. Aktuelle Schrittmacher-und Defibrillatortherapie. *Dtsch Ärztebl* 108, 372–379.
- Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Holm, P.S., Schillinger, U., Plank, C., Mykhaylyk, O., 2012. Effects of nanoparticle coatings on the activity of oncolytic adenovirus–magnetic nanoparticle complexes. *Biomaterials* 33, 256–269. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.028
- Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Mykhaylyk, O., Holm, P.S., Holzmüller, R., Anton, M., Thalhammer, S., Adigüzel, D., Döblinger, M., Plank, C., 2010. Boosting Oncolytic Adenovirus Potency with Magnetic Nanoparticles and Magnetic Force. *Molecular Pharmaceutics* 7, 1069–1089. doi:10.1021/mp100123t
- Trueck, C., Zimmermann, K., Mykhaylyk, O., Anton, M., Vosen, S., Wenzel, D., Fleischmann, B.K., Pfeifer, A., 2012. Optimization of Magnetic Nanoparticle-Assisted Lentiviral Gene Transfer. *Pharmaceutical research* 1–15.
- Tsien, R.Y., Rink, T.J., Poenie, M., 1985. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium* 6, 145–157.

- Valiunas, V., Kanaporis, G., Valiuniene, L., Gordon, C., Wang, H.Z., Li, L., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Cohen, I.S., Brink, P.R., 2009. Coupling an HCN2-expressing cell to a myocyte creates a two-cell pacing unit. *The Journal of Physiology* 587, 5211–5226.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., Pistello, M., 2013. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol.* 36, 1–22.
- Verheijck, E.E., van Kempen, M.J., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongsma, H.J., Bouman, L.N., 2001. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovascular research* 52, 40–50.
- Verma, I.M., Somia, N., 1997. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239–242. doi:10.1038/38410
- Vogler, J., Breithardt, G., Eckardt, L., 2012. Bradyarrhythmias and Conduction Blocks. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 65, 656–667.
- Wang, Y.G., Kumar, R., Wagner, M.B., Wilders, R., Golod, D.A., Goolsby, W.N., Joyner, R.W., 2000. Electrical interactions between a real ventricular cell and an anisotropic two-dimensional sheet of model cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H452–460.
- Wang, Y.-X.J., 2011. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. *Quant Imaging Med Surg* 1, 35–40. doi:10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03
- Waring, M.J., 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* 13, 269–282.
- Weber, W., Lienhart, C., Daoud-El Baba, M., Grass, R.N., Kohler, T., Müller, R., Stark, W.J., Fussenegger, M., 2009. Magnet-guided transduction of mammalian cells and mice using engineered magnetic lentiviral particles. *Journal of Biotechnology* 141, 118–122. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.023
- Wei, K.-C., Yang, H.-W., Hua, Liu, Huang, 2012. Potential of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanotechnology, Science and Applications* 73. doi:10.2147/NSA.S35506
- Weirich, W.L., Gott, V.L., Lillehei, C.W., 1957. The treatment of complete heart block by the combined use of a myocardial electrode and an artificial pacemaker. *Surg Forum* 8, 360–363.
- Weissleder, R., Stark, D.D., Engelstad, B.L., Bacon, B.R., Compton, C.C., White, D.L., Jacobs, P., Lewis, J., 1989. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* 152, 167–173. doi:10.2214/ajr.152.1.167
- Wenzel, D., Rieck, S., Vosen, S., Mykhaylyk, O., Trueck, C., Eberbeck, D., Trahms, L., Zimmermann, K., Pfeifer, A., Fleischmann, B.K., 2012. Identification of Magnetic

- Nanoparticles for Combined Positioning and Lentiviral Transduction of Endothelial Cells. *Pharmaceutical Research* 29, 1242–1254. doi:10.1007/s11095-011-0657-5
- Whitesides, G.M., 2003. The “right” size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* 21, 1161–1165. doi:10.1038/nbt872
- Wiese, C., Grieskamp, T., Airik, R., Mommersteeg, M.T.M., Gardiwal, A., de Gier-de Vries, C., Schuster-Gossler, K., Moorman, A.F.M., Kispert, A., Christoffels, V.M., 2009. Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circulation research* 104, 388–397.
- Wilhelm, C., Gazeau, F., 2008. Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles. *Biomaterials* 29, 3161–3174. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.016
- Wilson, M.W., Kerlan, R.K., Jr, Fidelman, N.A., Venook, A.P., LaBerge, J.M., Koda, J., Gordon, R.L., 2004. Hepatocellular carcinoma: regional therapy with a magnetic targeted carrier bound to doxorubicin in a dual MR imaging/ conventional angiography suite—initial experience with four patients. *Radiology* 230, 287–293. doi:10.1148/radiol.2301021493
- Wybaw, R., 1910. Sur le point d’origine de la systole cardiaque dans l’oreillette droite. *Arch Intern Physiol* 10, 78–89.
- Xie, Y., Sato, D., Garfinkel, A., Qu, Z., Weiss, J.N., 2010. So Little Source, So Much Sink: Requirements for Afterdepolarizations to Propagate in Tissue. *Biophysical Journal* 99, 1408–1415. doi:10.1016/j.bpj.2010.06.042
- Yakushenko, A., Gong, Z., Maybeck, V., Hofmann, B., Gu, E., Dawson, M., Offenhäusser, A., Wolfrum, B., 2013. On-chip optical stimulation and electrical recording from cells. *J Biomed Opt* 18, 111402. doi:10.1117/1.JBO.18.11.111402
- Ye, B., Nerbonne, J.M., 2009. Proteolytic processing of HCN2 and co-assembly with HCN4 in the generation of cardiac pacemaker channels. *Journal of Biological Chemistry* 284, 25553–25559.
- Zhang, H., Lau, D.H., Shlapakova, I.N., Zhao, X., Danilo, P., Robinson, R.B., Cohen, I.S., Qu, D., Xu, Z., Rosen, M.R., 2011. Implantation of Sinoatrial Node Cells Into Canine Right Ventricle: Biological Pacing Appears Limited by the Substrate. *Cell Transplantation* 20, 1907–1914. doi:10.3727/096368911X565038
- Zhang, Q., Huang, A., Lin, Y.C., Yu, H.G., 2009. Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and I(f) pacemaker current in myocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788, 1138–1147.
- Zhou, Z., Lipsius, S.L., 1993. Na (+)-Ca²⁺ exchange current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium. *The Journal of physiology* 466, 263–285.

9 Anhang

9.1 Origin Skript: Berechnung der Erregungsausbreitung (der MEA Langzeitmessungen)

```
// Ausgabe: Mittelwert (Ausbreitungsrichtung und SD)

// Umrechnung von Sekunden in Stunden, Ausgabe:
Col(F)=Col(A)/3600;

//Zeitaddition der einzelnen Aufnahmedateien (Eingabe: letzte
Zeilennummer der einzelnen importierten Dateien):

time1=      ;
time2=      ;
time3=      ;
time4=      ;
time5=      ;
time6=      ;
time7=      ;
time8=      ;

// Kontroll-Messung (Tag 0)
loop(ii,1,time1) {
Col(G)[ii]=Col(F)[ii];
};

// Transduktionsexperiment (Addition von 3h für Transduktion)
loop(ii,time1+1,time2) {
Col(G)[ii]=Col(F)[time1]+3+Col(F)[ii];
};

loop(ii,time2+1,time3) {
Col(G)[ii]=Col(G)[time2]+Col(F)[ii];
};

loop(ii,time3+1,time4) {
Col(G)[ii]=Col(G)[time3]+Col(F)[ii];
};

loop(ii,time4+1,time5) {
Col(G)[ii]=Col(G)[time4]+Col(F)[ii];
};

loop(ii,time5+1,time6) {
Col(G)[ii]=Col(G)[time5]+Col(F)[ii];
};

loop(ii,time6+1,time7) {
Col(G)[ii]=Col(G)[time6]+Col(F)[ii];
};
```

```

loop (ii,time7+1,time8) {
    Col(G)[ii]=Col(G)[time7]+Col(F)[ii];
};

// Festlegen auf Berechnung in Grad (NICHT Rad)
system.math.AngularUnits = 1;

// Berechnung der Schrittmacherausbreitung:
// Zeile für Zeile von 1 bis ii
loop (ii,1,time8) {

    // Berechnung Vektorgeschwindigkeit (1mm/Zeitdiffenz[s])
    aa=1/(Col(C)[ii]-Col(B)[ii]);
    bb=1/(Col(E)[ii]-Col(C)[ii]);
    cc=1/(Col(E)[ii]-Col(D)[ii]);
    dd=1/(Col(D)[ii]-Col(B)[ii]);

    // Berechnung Ausbreitungswinkel (von 0° bis 360° nach
    // eigener Definition)
    A= 90+ATAN(aa/bb);
    if ( (aa<0 && bb>0) || (aa<0 && bb<0) ) A=A+180;

    B= 90+ATAN(cc/bb);
    if ( (cc<0 && bb>0) || (cc<0 && bb<0) ) B=B+180;

    C= 90+ATAN(cc/dd);
    if ( (cc<0 && dd>0) || (cc<0 && dd<0) ) C=C+180;

    D= 90+ATAN(aa/dd);
    if ( (aa<0 && dd>0) || (aa<0 && dd<0) ) D=D+180;

    // Ausgabe der 4 berechneten Ausbreitungsrichtungen
    Col(I)[ii]=A;
    Col(J)[ii]=B;
    Col(K)[ii]=C;
    Col(L)[ii]=D;

    // Berechnung Mittelwert und Standardabweichung
    AVG=(A+B+C+D)/4;
    SD=SQRT( (AVG-A)^2+(AVG-B)^2+(AVG-C)^2+(AVG-D)^2 );

    // Sonderfall für Ausbreitungen in 0° Richtung
    if ( Max(A,B,C,D)>340 && Min(A,B,C,D)<20 )
    { sort A B C D;
      A=A+360;
      B=B+360;
      AVG=( (A+B+C+D)/4 )-360;
      SD=SQRT( (AVG+360-A)^2+(AVG+360-B)^2+(AVG+360-C)^2+(AVG+360-
D)^2 );
    };

    // (Ausgabe Mittelwert und Standardabweichung)
    Col(M)[ii]=AVG;
    Col(N)[ii]=SD;
};

```

```
// Filter: wenn Standardabweichung > 90° werden die Mittelwert
aussortiert;
loop (ii,1,time8) {
  if Col(N)[ii]<90 Col(P)[ii]=Col(M)[ii]; else Col(P)[ii]=-;
};

// Filter für stabile Schrittmacher: AverageDaten im Vergleich mit
25 vor- und nachliegenden Schlägen
window=25;
limit=2.5;

loop (ii,26,time8-25) {
  summe=0;
  loop (ll,0,2*window) {summe=summe+Col(P)[ii-window+ll]};
  AVG=summe/(2*window+1);
  Col(Q)[ii]=AVG;
  if (abs(Col(P)[ii]-AVG) <limit ) Col(O)[ii]=Col(P)[ii];
  if (Col(Q)[ii]==-) Col(O)[ii]=-;
};

// Frequenanalyse
Col(T)[1]=-;
loop (ii,2,time8) {
  Col(T)[ii]=1/(3600*(Col(G)[ii]-Col(G)[ii-1]));
};
```

10 Abkürzungsverzeichnis

4-AP	4-Aminopyridin
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
cDNA	komplementäre Desoxyriboneukleinsäure
ChR2	Channelrhodopsin 2
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i> , intestinale alkaline Phosphatase des Kalbs
CMV	Cytomegalie-Virus
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DD	diastolischen Depolarisation
DEPC	Diethylidicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1 α	Elongation Factor 1 α
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
ES-Zell	murine embryonale Stammzellen
eYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein
FKS	Fötale Kälberserum
HCN	<i>hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel</i> , hyperpolarisations-aktivierter, zyklisches Nukleotid bindender Kationenkanal
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nierenzelllinie
hESCs	humane embryonale Stammzellen
hiPS	humane induzierte pluripotente Stammzellen
hMSCs	humane mesenchymale Stammzellen
IgG	Immunglobulin G
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
IP	Viruspartikel, infektiöse Viruspartikel
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> , interne ribosomale Eintrittsstelle
Kb	Kilobase

Kir	<i>inward-rectifier potassium ion channel</i> , einwärtsgerichtete Kaliumkanäle
LV	lentivirale Vektoren
MEA	<i>Microelectrode Array</i> , Mikroelektroden Array
MEM	nicht essentielle Aminosäuren
MNP	magnetischer Nanopartikel
MNP/LV	magnetische Nanopartikel/Lentivirale Vektoren
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOB	<i>Super optimal broth</i> , komplexes Nährmedium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tbx	T-Box Transkriptionsfaktor
U	Unit
VP	Viruspartikel, physikalischer Viruspartikel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. K. Fleischmann für die Überlassung des Promotionsthemas, die Aufnahme an seinem Lehrstuhl und die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst danke ich für die Übernahme des Koreferats. Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken, Herrn Prof. Dr. J. Höfeld und Herrn Prof. Dr. K. Mohr.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Sasse bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft, die konstruktiven Anregungen und die Betreuung meiner Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich bei allen beteiligten Arbeitsgruppen der DFG-Forschergruppe 917 „Nanoparticle-based targeting of gene- and cell-based therapies“ für eine stets gute und produktive Zusammenarbeit. Hierbei danke ich vor allem Herrn Prof. Dr. A. Pfeifer und Frau Dr. K. Zimmermann vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn für die Herstellung der Lentiviren, Herrn Prof. Dr. B. Gleich und Frau A. Heidsieck vom Zentralinstitut für Medizintechnik (IMETUM) der Technischen Universität München für die Berechnung der Magnetspitzen und der Durchführung der Computersimulationen sowie Herrn Prof. Dr. C. Plank und Frau Dr. O. Mykhaylyk vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der TU München für die Synthese und Bereitstellung der verwendeten magnetischen Nanopartikel.

Bei den Mitgliedern der AG Fleischmann sowie ehemaligen Kollegen möchte ich mich für ein nettes Arbeitsklima und die fachliche Unterstützung bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. D. Malan für ihre Unterstützung bei den Patch-Clamp Experimenten.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank meinen Freunden, meinen WG-Bewohnern und meiner Freundin Sofia, die mich bei dieser Arbeit so tatkräftig unterstützt und immer wieder ermutigt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern, meiner Schwester Claudia und ihrer Familie, die mich in dieser langen Phase bei all meinen Entscheidungen bestärkt haben und mir in jeder Hinsicht beiseite standen. Vielen Dank, dass Ihr immer für mich da seid.