

**Analyse des therapeutischen Potentials von Cx43-exprimierenden
Skelettmuskelzellen zur Prävention spontaner Arrhythmien
nach Herzinfarkt**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Torsten Stefan Becker

aus Koblenz

2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. K. Fleischmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. J. W. Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.10.2015

Aus dem Institut für Physiologie I

Direktor: Univ. Professor Dr. med. (I) Fleischmann

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	9
1.1	Der Myokardinfarkt	9
1.1.1	Verminderte Pumpfunktion nach einem Herzinfarkt	10
1.1.2	Erhöhte Arrhythmieneigung	11
1.2	Nachweis von Arrhythmien	12
1.3	EKG des Menschen und der Maus im Vergleich	13
1.4	Kardiale Zelltherapie	14
1.4.1	Aus dem Knochenmark gewonnene Zellen	15
1.4.2	Embryonale Stammzellen und daraus abgeleitete Kardiomyozyten	17
1.4.3	Embryonale Kardiomyozyten	18
1.4.4	Skelettmuskelzellen	18
1.5	Verminderung von Arrhythmien durch Zelltherapie	19
1.5.1	Zellbiologischer Vergleich von Skelett- zu Herzmuskel	20
1.5.2	Kopplung in Skelettmuskelzellen	22
1.5.3	Nachweis von funktioneller Kopplung über Connexine	23
1.5.4	Weitere Zellquellen als Vorarbeit zum Großtiermodell	23
1.6	Fragestellung und Zielsetzung	24
2.	Material und Methoden	25
2.1	Medien und Chemikalien	25
2.2	Reagenziensätze und Verbrauchsmaterialien	26
2.3	Zellbiologische Materialien	27
2.3.1	Zusammensetzung der Zellkulturmedien	27
2.4	Tierexperimentelle Arbeiten	29
2.5	Immunzytochemische Materialien	29
2.5.1	Puffer und Lösungen für immunzytochemische Färbungen	29
2.5.2	Antikörper	30
2.6	Geräte und Software	31
2.6.1	Etablierte Geräte und Software	31
2.7	Methoden	32
2.7.1	Zellbiologische Methoden	32

2.7.2	Immunhistochemische Methoden	36
2.7.3	Elektroporations-Experimente	38
2.7.4	Herstellung von Zelllysaten für Immunoblotanalysen	38
2.7.5	EKG-Messungen an Mäusen	39
2.7.6	Statistische Verfahren	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Isolation und genetische Modifikation von Skelettmuskelzellen	43
3.1.1	Kultivierung embryonaler Skelettmuskelzellen	43
3.1.2	Kultivierung adulter Skelettmuskelzellen	44
3.1.3	Genetische Modifikation von Skelettmuskelzellen	44
3.1.4	Nachweis der erfolgreichen Transduktion von Skelettmuskelzellen	47
3.2	Kopplungsnachweis <i>in vitro</i>	51
3.2.1	Prinzip und Anwendung der lokalen Einzelzellelektroporation	51
3.2.2	Kopplungsnachweis <i>in vitro</i> mittels lokaler Einzelzellelektroporation	53
3.2.3	Anwendung der lokalen Einzelzellelektroporation zum Gentransfer	57
3.3	Verwendungen von Zellen aus anderen Spezies als Grundlage zum Großtiermodell	58
3.3.1	Skelettmuskelzellen aus Schweinen	58
3.3.2	Skelettmuskelzellen aus Hunden	59
3.4	Oberflächen- und Langzeit-EKG Messungen an Mäusen zur Evaluation von spontanen Arrhythmien	61
3.4.1	Oberflächen-EKG Messungen in der "EKG-Röhre"	61
3.4.2	Semiautomatische Analyse der Langzeit-EKG-Daten	67
3.4.3	Ergebnisse der Langzeit-EKG Messungen	75
4.	Diskussion	87
4.1	Lentivirale Modifikation von Zellen <i>in vitro</i> zur Zelltherapie	87
4.2	Die neue Methode der lokalen Einzelzellelektroporation	90
4.3	EKG-Messungen an Mäusen	91
4.4	Die Entwicklung einer semiautomatischen Analyse-Software für Langzeit-EKG- Messungen an Mäusen	94
4.5	Bewertung des arrhythmogenen Potentials mit Hilfe des selbstentwickelten „Systole“ Programms	97

4.6	Verringerung spontaner Arrhythmien nach einem Herzinfarkt durch Implantation von Skelettmuskelzellen mit lentiviral eingebrachtem Cx43 in der Maus	99
5.	Zusammenfassung	103
6.	Literaturverzeichnis	105
7.	Danksagung	113
8.	Wissenschaftliche Beiträge	114

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AAV	Adeno-assoziierte Viren
α MHC	<i>Alpha-myosin heavy chain</i> , Alpha-Myosin Schwere Kette
aSKM	Adulte Skelettmuskelzellen
ATP	Adenosin-Triphosphat
AV	Atrioventrikular
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BPM	Schläge pro Minute
CAG	Beta-Aktin Promotor des Huhns mit Cytomegalie-Virus Verstärker
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CMV	Cytomegalie-Virus
cPPT	<i>central polypurine tract</i>
Cx	Connexin
Cx43	Connexin 43
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyriboneukleinsäure
E	Tag der Embryonalentwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EKG	Elektrokardiogramm
eKM	Embryonale Kardiomyozyten
eSKM	Embryonale Skelettmuskelzellen
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gewichtskraft der Erde (9,81 m/s ²)

Gb	Gigabyte
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Gy	Gray
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i> , humane embryonale Nierenzelllinie
HF	Herzfrequenz
IgG	Immunglobulin G
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRES	Intraribosomale-Eintrittsstelle
KHK	Koronare Herzerkrankung
Ktr	Kontrolle
MEM	nicht essentielle Aminosäuren
MI	Myokardinfarkt
Min.	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
Myo D	myogene Differenzierung 1
n	Anzahl
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
Pax7	<i>paired box gene 7</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
QRS	Kammerkomplex
SCID	Schwerer kombinierter Immundefekt
SCN5a	Gen eines kardialen Natrium-Kanals
Sek.	Sekunden

SEM	<i>Standard error of the mean,</i> Standardfehler
Std.	Stunden
TRITC	Tetramethylrhodamin
VES	Ventrikuläre Extrasystole
vs.	versus
VT	Ventrikuläre Tachykardie
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis Virus Posttran-</i> <i>scriptional Regulatory Element</i>
Wt	Wildtyp
Ψ	Virales Verpackungssignal

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in der westlichen Welt. Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes von 2014 waren in Deutschland im Jahr 2012 43,3 % der Todesfälle auf die Folgen von Herz-/Kreislaufkrankungen zurückzuführen. Die ischämische Herzkrankheit (128171 Sterbefälle) stellt dabei die größte, spezifische Todesursachengruppe dar (Statistisches Jahrbuch 2014 des Statistischen Bundesamtes).

Ein Herzinfarkt resultiert meist aus einer koronaren Herzerkrankung (KHK). Hauptrisikofaktoren für diese Erkrankung der Koronargefäße sind Nikotinkonsum, Diabetes mellitus, Bluthochdruck sowie eine familiäre Belastung oder eine erworbene beziehungsweise ererbte Störung des Fettstoffwechsels (Herold, 2010). Unabhängig von der Ursache ist ein Herzinfarkt definiert als der Untergang von Kardiomyozyten in Folge einer Minderversorgung mit Sauerstoff. Pathophysiologisch liegt solch einer Ischämie häufig die Ruptur einer sogenannten vulnerablen Plaque in der Wand eines Koronargefäßes zugrunde. Strukturell ist eine solche Plaque durch eine dünne, fibrinöse Kappe, geringen Kollagengehalt, hohen Gehalt an Lipiden, Monozyten sowie Makrophagen, Lymphozyten und wenige glatte Muskelzellen gekennzeichnet. Diese Faktoren, sowie eine mögliche Endotheldysfunktion und mechanische Belastungen können zu einer Ruptur der Plaque und anschließender Thrombusbildung führen (Schwarz, 2007). Dadurch kommt es zu einem partiellen oder vollständigen Verschluss einer Koronararterie und zu einer Minderdurchblutung des Herzgewebes.

Als seltenere Ursachen eines Herzinfarktes kommen lang anhaltende Gefäßspasmen, Embolien ausgehend von Thrombenbildung an anderen Orten des Gefäßsystems, wie zum Beispiel bei einer Endokarditis, oder massive Störungen des Gerinnungssystems, wie bei der disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC), in Frage. Auch der Einriss der Gefäßinnenwand (Intima) bei der Aortendissektion, Blutungen oder seltene Tumoren des Herzens können ursächlich für den Verschluss eines Koronargefäßes sein (Herold, 2010).

Eine Minderperfusion hat nach einer Ischämiezeit von 15-30 Min. eine Fehlfunktion der Kardiomyozyten zur Folge (Cheng et al., 1996). Nach 2 - 4 Std. kommt es zur Nekrose

im ischämischen Areal mit irreversibler Gewebeschädigung. Der Verlust der Kardiomyozyten kann, aufgrund des geringen Regenerationspotentials dieser Zellen (Bergmann et al., 2009), nur durch die Ausbildung einer fibrotischen Narbe ersetzt werden. Dieser narbige Heilungsprozess ist bei komplikationslosem Verlauf nach 5 - 6 Wochen abgeschlossen (Thygesen et al., 2012).

Zu Beginn der Umbauvorgänge ist neben der Gefahr von Herzrhythmusstörungen die mechanische Belastung des ischämischen Areals problematisch und es kann zu einer Aneurysmabildung und sogar zur lebensgefährlichen Ruptur der Herzwand kommen. Im weiteren Verlauf nimmt die Stabilität der Narbe zu und die verminderte Pumpfunktion, sowie die erhöhte Arrhythmieeigung stehen im Vordergrund der klinischen Symptomatik. (Herold, 2010).

1.1.1 Verminderte Pumpfunktion nach einem Herzinfarkt

Durch einen Infarkt kommt es im ischämischen Areal des Herzens zu einem Verlust vitaler Kardiomyozyten und der Ausbildung einer fibrotischen Narbe. Das durch Fibroblasten gebildete Narbengewebe hat keinerlei kontraktile Funktion mehr, so dass die Pumpleistung des Herzens beeinträchtigt wird. Eine verringerte Pumpleistung führt zu einer inadäquaten Versorgung der peripheren Organe und den Symptomen einer Herzinsuffizienz. Diese werden in der Regel umso ausgeprägter, je schlechter die Pumpfunktion und je höher der periphere Bedarf ist, also zum Beispiel unter Belastung (Herold, 2010). Durch die stärkere Belastung des umgebenden Myokards kann dieses kompensatorisch hypertrophieren, um die nötige Pumpleistung zur Versorgung der Peripherie aufrechtzuerhalten. Dazu nehmen die verbleibenden Kardiomyozyten an Größe zu, um den Verlust an vitalen, kontraktile Zellen auszugleichen. An diese kompensatorische Hypertrophie kann sich, durch die erhöhte mechanische Belastung, eine sekundäre Dilatation anschließen. Diese Umbauprozesse, die zu einer Veränderung der Größe, Form und Funktion des Ventrikels führen, werden als ventrikuläres Remodeling bezeichnet (Sutton und Sharpe, 2000).

Wird die Kompensationsfähigkeit über einen längeren Zeitraum überschritten, kommt es zur symptomatischen Herzinsuffizienz, die mit einer hohen Letalität einhergeht. Als kausale Therapie einer höhergradigen Herzinsuffizienz steht aktuell nur die Herztransplantation zur Verfügung. Neben dem großen Problem der Organknappheit aufgrund weni-

ger Spender, ist diese Therapie mit gravierenden Nebenwirkungen und Komplikationen wie Abstoßungsreaktionen, Infektionen und Transplantatversagen verbunden (Fraund et al., 1999).

1.1.2 Erhöhte Arrhythmieineigung

Zusätzlich zu der beschriebenen verminderten Pumpfunktion kann das infarzierte Areal und das umgebende Gewebe der Ursprung von teils lebensbedrohlichen ventrikulären Arrhythmien sein (de Bakker et al., 1993). Nach Infarkt treten in 95-100 % der Fälle Herzrhythmusstörungen auf. Das Spektrum dieser Rhythmusstörungen reicht von einzelnen ventrikulären Extrasystolen bis zu ventrikulären Tachykardien und Kammerflimmern mit kardiozirkulatorischem Stillstand. Der Tod als Folge einer akut auftretenden, anhaltenden, ventrikulären Arrhythmie wird als plötzlicher Herztod bezeichnet. In mehr als 70% der Fälle des plötzlichen Herztodes ist ein Herzinfarkt vorausgegangen und kann als Ursache angesehen werden (Gorgels et al., 2003).

Pathophysiologische Grundlage der ventrikulären Post-Infarkt-Arrhythmie ist die sogenannte Grenzzone (*border-zone*) zwischen Infarkt und vitalem Myokard (de Bakker et al., 1988). In diesem Bereich sind die vorhandenen Kardiomyozyten durch die Ischämie nicht untergegangen, es finden sich aber strukturelle Veränderungen wie zum Beispiel eine Änderung in der Verteilung von Kopplungsproteinen (*Gap junctions*) entlang der Zellmembran Peters et al., 1997) und vermehrte extrazelluläre Kollagenmatrix (Ursell et al., 1985). Diese Umbauvorgänge führen zu einer verlangsamten elektrischen Erregungsausbreitung.

Das Herzgewebe ist nach einer Erregung nicht mehr refraktär und kann von der verlangsamten elektrischen Ausbreitungsfront wieder erregt werden, so dass eine autonome kreisende Erregung entsteht, die unabhängig vom physiologischen Herzrhythmus ist. Wenn aus diesem lokalen Areal das gesamte Herz erregt wird, kommt es zu Herzrhythmusstörungen (de Bakker et al., 1993). Bei dauerhafter, schneller Erregung aus dem Grenzgebiet der Infarktnarbe spricht man von ventrikulären Tachykardien, die zu einem Kreislaufstillstand führen können. Die kausale Therapie von Post-Infarkt-Arrhythmien ist bislang nicht möglich. Der Einsatz von Antiarrhythmika oder implantierbaren, automatischen Defibrillatoren ist lediglich symptomatisch und mit teils gravierenden Risiken und Nebenwirkungen (proarrhythmogener Effekt von Antiarrhyth-

mika, Geräte-Fehlfunktion, Infektion) behaftet. Die erhöhte Arrhythmieeigung nach einem Herzinfarkt stellt daher therapeutisch eine Herausforderung dar, die die Entwicklung von neuen Therapieformen nötig macht.

1.2 Nachweis von Arrhythmien

Die beschriebene erhöhte Arrhythmieeigung stellt sich symptomatisch unterschiedlich dar und wird diagnostisch auf verschiedene Arten untersucht. In Extremitäten- bzw. Oberflächen-EKGs können spontane Arrhythmien bei gehäuftem Auftreten schon in einer Aufzeichnung von wenigen Sekunden identifiziert werden. Ein Langzeit-EKG wird meist über einen Zeitraum von 24 Std., evtl. auch bis zu 72 Std. abgeleitet, um die Herzaktion über einen größeren Zeitraum beurteilen zu können. Bei einem Belastungs-EKG wird während einer definierten Belastungssituation (zum Beispiel Fahrradergometer oder Laufband) eine kontinuierliche EKG-Messung vorgenommen, um die Belastbarkeit des Patienten zu evaluieren oder belastungsabhängige, spontane Rhythmusstörungen aufzudecken. Diese Aufnahmemöglichkeiten sind nicht invasiv und technisch nicht sehr aufwendig. Sollen Herzrhythmusstörungen genau differenziert werden oder die Ausbreitung der elektrischen Erregung im Herzen präzise kartiert werden, besteht die Möglichkeit der invasiven elektrophysiologischen Untersuchung. Über einen venösen Zugang wird ein Katheter ins Herz vorgeschoben. Dadurch können die elektrischen Signale des Herzens direkt am Endokard gemessen werden. Außerdem ist es möglich, das Herz direkt elektrisch zu stimulieren und so die Vulnerabilität gegenüber induzierten Arrhythmien zu testen.

Um an den präklinischen Tiermodellen Maus und Ratte Arrhythmien nachzuweisen und mögliche Therapieoptionen zu erforschen, bedient man sich ebenfalls unterschiedlicher Arten der EKG-Ableitung. Das Oberflächen-EKG mit den Standardableitungen nach Einthoven wurde schon früh zur Analyse verschiedener Mausstämmen genutzt (Lombard, 1952). 1968 nahmen Goldbarg et al. EKG-Aufzeichnungen mit sechs Ableitungen an narkotisierten Mäusen verschiedener Stämme vor (Goldbarg et al., 1968). 30 Jahre später entwickelten Berul et al. die Technik weiter und nahmen 6- und 12-Kanal EKGs über subkutane Nadelelektroden auf (Berul et al., 1997). Seit dieser Zeit wird das 6-Kanal-EKG, mit den Ableitungen nach Einthoven und Goldberger, an narkotisierten Mäusen und Ratten, durchgeführt (Wang et al., 2000). Allerdings ist bekannt, dass sowohl volati-

le Inhalationsanästhetika als auch Injektionshypnotika, die zur Narkose der Tiere verwendet werden, Einfluss auf die kardiale Aktivität haben. Die Herzfrequenz wird gesenkt und es kann zu Bradykardien kommen; auch ein Absinken des Blutdruckes ist möglich und die autonome Regulation der Herzfrequenz wird unterdrückt (Mitchell et al., 1998; Chu et al., 2001). Neben solchen externen Elektroden werden immer kleinere implantierbare Transmitter entwickelt, wodurch Langzeit-EKG-Aufnahmen an Nagern möglich sind (Kramer et al., 2003). Dabei werden Daten von nicht-narkotisierten, sich frei bewegenden Tieren aufgezeichnet. Diese Konditionen spiegeln am ehesten physiologische Bedingungen wieder. Trotz dieser Vorteile stellt die Implantation von EKG-Transmittern einen invasiven Eingriff dar und ist mit entsprechenden Risiken verbunden. Daher wurden auch nicht-invasive Methoden weiterentwickelt. Chu et al. zeichneten 2001 das EKG von wachen Mäusen auf, die sie mit den Pfoten auf EKG-Elektroden setzten. Dadurch war die Aufnahmezeit auf wenige QRS-Komplexe beschränkt und erlaubte keine Aussage über das Auftreten von Arrhythmien (Chu et al., 2001).

Wang et al. nutzten ein Verfahren, das einschränkender für die Versuchstiere war. Diese wurden in Röhren platziert, wobei das EKG ebenfalls von den Pfoten abgeleitet wurde, die aus dafür vorgesehenen Löchern ragten (Wang et al., 2000). Hamlin et al. leiteten das EKG bipolar von transthorakal ab, indem Hamster zwischen zwei Kupferplatten fixiert wurden (Hamlin et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden EKG-Messungen an Mäusen mit zwei unterschiedlichen Methoden etabliert und durchgeführt: akute Aufzeichnungen über Oberflächenelektroden und Langzeitmessungen mit einem implantierbaren System.

1.3 EKG des Menschen und der Maus im Vergleich

Die Analyse des Elektrokardiogramms ist ein wichtiges Werkzeug der klinischen Medizin und der medizinischen Forschung. Am Menschen wurde es 1903 als klinisches Diagnoseverfahren von Willem Einthoven eingeführt.

Das humane Ruhe-EKG ist durch folgenden Verlauf charakterisiert: Die P-Welle ist der elektrische Summationsvektor der Erregungsausbreitung über die Vorhöfe. Der QRS-Komplex (Dauer: < 100 ms) korrespondiert zur Erregungsausbreitung in den Ventrikeln. Die ST-Strecke entspricht der isoelektrischen Linie während der der gesamte Ventrikel

depolarisiert ist und die T-Welle stellt die ventrikuläre Erregungsrückbildung dar (Abbildung 1).

Die erste EKG-Messung am murinen Modell ist 1929 beschrieben (Agduhr und Stenström, 1930). In späteren Publikationen wurde die elektrische Aktivität des Herzens kleiner Säuger genauer untersucht (Lombard et al., 1952; Richards et al., 1953).

Der Ablauf der elektrischen Erregung des murinen Herzens beginnt ebenfalls mit der P-Welle gefolgt von einem QRS-Komplex (Dauer: ca. 20 ms). Ein isoelektrisches ST-Segment oder eine deutlich vom QRS-Komplex abgesetzte T-Welle fehlen, da die Repolarisation in Teilen des Ventrikels simultan zur Depolarisation in anderen Arealen stattfindet. Daher korrespondiert der QRS-Komplex des murinen EKGs nicht nur mit der Ausbreitung der elektrischen Aktivität, sondern partiell auch mit der Erregungsrückbildung (Abbildung 1) (London, 2001). Aufgrund einer Herzfrequenz, die um das zehnfache höher liegt als die des Menschen, weist das EKG von Mäusen einen kürzeren P-R-Abstand und kleinere QRS-Intervalle auf. Trotz der strukturellen und elektrophysiologischen Unterschiede zwischen Maus- und Menschenherz ermöglichen Studien an murinen Modellen ein erweitertes Verständnis der menschlichen Pathophysiologie und können als Grundlage zur Etablierung neuer Therapien für die klinische Anwendung dienen.

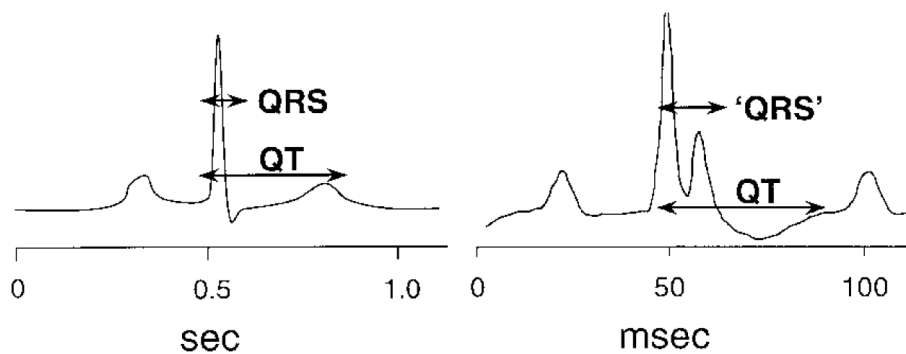


Abbildung 1: Vergleich des humanen mit dem murinen EKG

Der Vergleich des humanen (links) mit dem murinen (rechts) EKG zeigt eine um das 10fache schnellere Herzfrequenz. Der QRS-Komplex der Maus umfasst die Depolarisation und die frühe Repolarisation des Ventrikels. (modifiziert aus London, 2001)

1.4 Kardiale Zelltherapie

Die bisherigen Therapieoptionen des Herzinfarktes haben gewisse Limitationen. So lässt sich die verminderte Pumpfunktion des Herzens, abgesehen von einer Herztransplantation, nicht kausal therapieren und eine Behandlung ist nicht immer ausreichend

möglich. Auch das deutlich erhöhte Arrhythmierisiko kann medikamentös nur symptomatisch behandelt werden und bleibt die häufigste Todesursache nach einem Herzinfarkt. Daher besteht Bedarf an neuen, verbesserten Therapiemethoden. Neben pharmakologischen und transplantations-chirurgischen Behandlungsmöglichkeiten rückt die zelluläre Ersatztherapie in den Blickpunkt. Da Kardiomyozyten nur ein unzureichendes regeneratives Potential besitzen (Bergmann et al., 2009), müssen andere Gewebe als Zellquelle erschlossen werden.

In Anlehnung an die verminderte Pumpfunktion und das erhöhte Arrhythmierisiko sollten die Zellen für die Zelltherapie des Herzens einige Kriterien erfüllen (Reinecke et al., 2004):

1. Kontraktilität
um die Pumpleistung des erkrankten Herzens wieder herzustellen
2. Fähigkeit der elektrischen Kopplung mit dem nativem Myokard
um die Ausbreitung der elektrischen Erregung zu verbessern und das Auftreten von Arrhythmien zu verhindern

Die Sicherheit und Durchführbarkeit einer solchen Therapie ist an weitere Voraussetzungen geknüpft, die an die zu transplantierenden Zellen gestellt werden:

1. Immunkompatibilität
2. Unbedenklichkeit im Hinblick auf Onko- oder Teratogenität
3. Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Zellen
4. Ethische Unbedenklichkeit

In den bisherigen experimentellen und klinischen Studien zur Zelltherapie wurden diese Kriterien nur teilweise erfüllt. Im Folgenden soll auf einige Hauptvertreter von Zellquellen zur Transplantation in den Herzinfarkt eingegangen werden.

1.4.1 Aus dem Knochenmark gewonnene Zellen

Eine mögliche Zellquelle zur Therapie des Herzinfarktes sind Zellen aus dem Knochenmark. Allerdings werden die Auswirkungen einer Implantation dieser Zellen in das Infarktareal kontrovers diskutiert: Ein Vorteil von Zellen aus dem Knochenmark ist die relativ gute Verfügbarkeit. Durch eine Knochenmarkspunktion, ein in der Klinik häufig angewendetes und risikoarmes Verfahren, können große Mengen an Zellmasse (bis zu 500 ml) gewonnen werden, die, nach einer Aufreinigung, für die Therapie zur Verfügung ste-

hen. Ein weiterer positiver Aspekt ist die autologe Verwendungsmöglichkeit von Knochenmarkszellen. Dadurch werden Reaktionen des Immunsystems verhindert und ethische Fragen, die sich zum Beispiel bei der Organtransplantation oder der Verwendung von Stammzellen stellen, umgangen.

In Transplantationsexperimenten mit Knochenmarkszellen an Mäusen fanden einige Autoren nicht nur Hinweise auf eine Verbesserung der Pumpleistung, gemessen an der Ejektionsfraktion des Herzens, und auf eine Verkleinerung der Infarkt Narbe, sondern sogar auf eine durch die Knochenmarkszellen getriebene Regeneration der Kardiomyozyten (Orlic et al., 2003). In anderen Publikationen gab es hingegen kaum Zeichen von Regeneration durch Knochenmarkszellen (Laflamme et al., 2007). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchliche Datenlage könnten Fusionsereignisse von transplantierten Zellen mit vorhandenen Kardiomyozyten sein, die als Zeichen von Regeneration missverstanden werden könnten (Terada et al., 2002; Nygren et al., 2004).

Zu den Nachteilen der Implantation von Knochenmarkszellen in den Herzinfarkt zählt die fehlende Kontraktilität. Sie können daher nicht aktiv zur Verbesserung der Pumpfunktion des Herzens beitragen. Außerdem sind sie nicht in der Lage elektrisch mit dem gesunden Myokard in Verbindung zu treten, wodurch die Gefahr der Herzrhythmusstörungen nach einem Herzinfarkt nicht gesenkt wird (Kolossoff et al., 2006). Mehrere Gruppen konnten in Studien an Mäusen oder Ratten ausschließen, dass in den Infarkt implantierte Knochenmarkszellen zu Kardiomyozyten transdifferenzieren und so zu einer Heilung der Infarkt Narbe beitragen (Kolossoff et al., 2006; Murry et al., 2004; Carr et al., 2008). In anderen Publikationen finden sich neben dem fehlenden therapeutischen Effekt der Implantation von Knochenmarkszellen in den Herzinfarkt sogar Anzeichen für Nebenwirkungen, wie Verknöcherungen im Herzen (Breitbach et al., 2007).

Trotz der teils widersprüchlichen Lage werden Knochenmarkszellen in klinischen Studien eingesetzt, wobei auch hier die Ergebnisse bisher nicht konsistent waren. In einigen Studien konnten positive Effekte gezeigt werden (Schächinger et al., 2006), wohingegen in anderen keine statistisch signifikante Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe eintrat (Wöhrle et al., 2010). In der BOOST-Studie (*BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration*), einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Untersuchung, war 18 Monate nach der Implantation von Knochenmarkszellen in den Herzinfarkt keine Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe nachweisbar (Meyer et al.,

2006). Auch 5 Jahre nach der Therapie konnten in dieser Studie keine Langzeiteffekte der Implantation von Knochenmarkszellen bezogen auf die Herzfunktion gezeigt werden (Meyer et al., 2009). Metaanalysen von klinischen Studien mit einer Laufzeit von mindestens einem Jahr konnten bis jetzt keinen klaren Vorteil der Implantation von Knochenmarkszellen in das infarzierte Herz zeigen. So wurde weder die Pumpfunktion des infarzierten Herzens dauerhaft signifikant verbessert, noch das Arrhythmierisiko deutlich gesenkt (Lipinski et al., 2007; Tongers et al., 2011).

1.4.2 Embryonale Stammzellen und daraus abgeleitete Kardiomyozyten

Embryonale Stammzellen besitzen viele Eigenschaften, die sie zu einer attraktiven Zellquelle für die Zelltherapie des Herzinfarktes machen könnten: sie sind pluripotent, das heißt, sie können alle Gewebearten des menschlichen Körpers, auch Herzmuskelgewebe, bilden (Rajasingh et al., 2007). Weiterhin lassen sie sich außerhalb des Körpers vermehren, um eine ausreichende Menge an Zellen für die Therapie zu gewinnen. In tierexperimentellen Studien an Mäusen ließen sich aus den embryonalen Stammzellen Kardiomyozyten differenzieren, die dann in das Infarktareal implantiert wurden. Durch das Anwachsen der Zellen im Infarkt kam es zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Pumpfunktion, verglichen mit Tieren die keine Zelltherapie erhielten (Kolossov et al., 2006, Laflamme et al., 2007). Ob das erhöhte Arrhythmierisiko nach einem Herzinfarkt durch die Therapie mit embryonalen Stammzellen und daraus abgeleiteten Kardiomyozyten gesenkt werden kann, ist nicht vollständig untersucht. In *in vitro* Studien an Herzmuskelzellen, die aus menschlichen embryonalen Stammzellen differenziert wurden, konnte gezeigt werden, dass diese Zellen die elektrische Erregungsausbreitung verbessern, was für einen antiarrhythmischen Effekt spricht (Thompson et al., 2012). Auf der anderen Seite gibt es massive ethische Bedenken, die einem therapeutischen Nutzen von embryonalen Stammzellen und daraus abgeleiteten Kardiomyozyten im Weg stehen. Die begrenzte Verfügbarkeit und die Entstehung von Tumorgewebe aus noch undifferenzierten Stammzellen (Cao et al., 2006) sind ebenfalls Hindernisse, die eine klinische Anwendung limitieren.

1.4.3 Embryonale Kardiomyozyten

Eine weitere Zellquelle zur Therapie des Herzinfarktes stellen embryonale Kardiomyozyten dar. Sie haben ähnliche positive Eigenschaften wie aus embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten, können bei der Implantation in den Herzinfarkt aber keine Tumoren bilden, da die Zellen nicht mehr pluripotent sind. In Studien an Mäusen führte die Injektion von embryonalen Kardiomyozyten in den Herzinfarkt zu einer niedrigeren Mortalität, verglichen mit Tieren, die keine Zelltherapie erhielten. Die Pumpfunktion des Herzens verbesserte sich durch die kontraktile Zellen. Über Connexine konnten die implantierten embryonalen Kardiomyozyten aus dem vitalen Myokard elektrisch erregt werden und so die Vulnerabilität gegenüber induzierten Arrhythmien auf das Niveau von gesunden Mäusen senken (Roell et al., 2007).

Damit erwiesen sich embryonale Kardiomyozyten in tierexperimentellen Studien als ideales Material zur Zelltherapie des Herzinfarktes. Allerdings könnten sie aus ethischen Gründen in der Klinik nicht am Menschen eingesetzt werden. Um sie zu isolieren, ist es notwendig einen Embryo zu opfern und die Zellen aus dem Herzen zu gewinnen. Daher ist eine alternative Zellquelle nötig, die die positiven Eigenschaften von embryonalen Kardiomyozyten besitzt aber einfach, in ausreichender Menge und ethisch unbedenklich zur Verfügung steht.

1.4.4 Skelettmuskelzellen

Skelettmuskelzellen erfüllen die in Abschnitt 1.4 genannten Kriterien zumindest teilweise und wurden daher, als einer der ersten Zelltypen, zur Zelltherapie von Herzerkrankungen verwendet (Murry et al., 1996):

1. Sie sind als endogene Stammzellen autolog von jedem Patienten individuell durch eine Muskelbiopsie zu gewinnen und daher immunologisch unbedenklich.
2. Durch ihr Proliferationspotential können sie *in vitro* vermehrt werden.
3. Sie sind verhältnismäßig resistent gegen ischämische Bedingungen, wie sie im Infarktareal herrschen.
4. Skelettmuskelzellen sind kontraktile Zellen, die elektrisch erregbar sind.

Aufgrund dieser Charakteristika wurden Myoblasten in mehreren klinischen Studien verwendet (Murry et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass sie in großer Zahl aus geringen Mengen autologen Skelettmuskelgewebes gewonnen und *in vitro* vermehrt werden können. Weiterhin ließen sich die Zellen nach Transplantation im Infarkt nachweisen. Funktionell resultierte die Therapie in einer Verbesserung der Kontraktilität des Herzens (Menasché et al., 2001).

In den Therapieversuchen am Menschen zeigte sich allerdings, dass die Implantation von Skelettmuskelzellen in einigen Fällen zum vermehrten Auftreten von Herzrhythmusstörungen führte, die es nötig machten, die Patienten mit einem implantierbaren Defibrillator zu versorgen (Menasché et al., 2008). Die Begründung für den proarrhythmogenen Effekt von Skelettmuskelzellen im Herzinfarkt ist, dass ausgereifte Skelettmuskelzellen keine Adhäsions- oder Kopplungsproteine bilden, um miteinander oder mit dem vitalen Myokard elektromechanisch zu synchronisieren.

Vor allem das Kopplungsprotein Connexin ist für die elektrische Erregungsausbreitung essentiell.

Um also die positiven Eigenschaften von Skelettmuskelzellen zu nutzen, ohne das Risiko für Arrhythmien zu erhöhen, ist es notwendig die implantierten Zellen mit dem vitalen Myokard elektrisch zu koppeln, um die Erregungsausbreitung im Herzen zu normalisieren. 2007 wurden von Roell et al. Skelettmuskelzellen aus genetisch veränderten Mäusen, die das Kopplungsprotein Connexin 43 in der Skelettmuskulatur überexprimierten, für die Implantation in den Herzinfarkt verwendet. Dadurch verbesserte sich die elektrische Erregungsausbreitung im Infarkt und die Vulnerabilität gegenüber induzierten Arrhythmien konnte auf das Niveau von gesunden Tieren gesenkt werden (Roell et al., 2007).

Da in der reifen Skelettmuskulatur des Menschen keine Connexine exprimiert werden, ist eine genetische Veränderung *in vitro* notwendig, um Skelettmuskelzellen in der klinischen Therapie des Infarktes zu verwenden. Diese Therapiemöglichkeit wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.5 Verminderung von Arrhythmien durch Zelltherapie

Abschnitt 1.1.2 beschreibt als pathophysiologisches Substrat der Arrhythmien die Ischämiezone bei einem akuten Herzinfarkt bzw. die Randzone einer Infarktnarbe. In

diesen inadäquat perfundierten Bereichen kann die Erregungsleitung nur verzögert stattfinden. Trifft die Ausbreitungsfront der elektrischen Erregung auf Myokardgewebe, das wieder erregbar ist, kann eine, vom eigentlichen Herzrhythmus autonome, kreisende Erregung entstehen. Wird aus dieser kreisenden Erregung heraus nun das ganze Herz aktiviert, entsteht eine Arrhythmie. Besonders gefährlich sind sogenannte ventrikuläre Tachykardien, mit einer hochfrequenten (> 100 Schläge pro Min.), autonomen Erregung der Ventrikel (Schwarz, 2007). Je nach Dauer der Arrhythmie, sowie Funktionszustand des Herzens variieren die Symptome von Herzrasen über stärkste Brustschmerzen (Angina pectoris) bis hin zum kardiogenen Schock mit Todesfolge (Herold, 2010).

Durch diagnostische Mittel wie ein Elektrokardiogramm und die intrakardiale, elektro-physiologische Untersuchung lassen sich Arrhythmien identifizieren und prophylaktische Maßnahmen ergreifen, wie die pharmakologische Therapie mit Antiarrhythmika oder die Implantation von Schrittmachern und automatischen Defibrillatoren. Allerdings fehlt auch heute noch eine ursächliche Therapie von Herzrhythmusstörungen.

Die elektrische Überbrückung der Infarkt Narbe durch Zellen, die das Kopplungsprotein Cx43 exprimieren, stellt eine mögliche Therapieoption dar.

1.5.1 Zellbiologischer Vergleich von Skelett- zu Herzmuskel

Der Skelettmuskel ist aus vielkernigen Muskelfasern mit einem Durchmesser von 10-100 µm und einer Länge von bis zu mehreren Zentimetern aufgebaut. Während der Entwicklung fusionieren einkernige Myoblasten zu vielkernigen Myotuben. Sogenannte Satellitenzellen ermöglichen als somatische Stammzellen die Neubildung und Regeneration der Skelettmuskulatur. Die lichtmikroskopisch zu beobachtende Querstreifung der Muskelzelle entspricht der regelmäßigen Anordnung von dicken und dünnen Myofilamenten. Die Muskelkontraktion beruht auf der zyklischen Wechselwirkung von Myosinköpfchen mit Aktinfilamenten unter Hydrolyse von ATP und wird Querbrückenzyklus genannt (Baucher und Klinke, 2005).

Unter dem Begriff der elektromechanischen Kopplung werden die Prozesse zwischen der elektrischen Erregung der Zellmembran des Skelettmuskels (Sarkolemm) und dem Ablauf des Querbrückenzyklus bezeichnet. Der Mechanismus der elektromechanischen Kopplung ist zwischen Skelettmuskulatur und Herzmuskelzellen unterschiedlich. Die Erregung des Skelettmuskels erfolgt durch nervale Impulse. Über die neuromuskulären

Endplatten der Nervenfasern wird ein Aktionspotential durch den Neurotransmitter Acetylcholin auf die Muskelfaser übertragen und löst dort ein neues Aktionspotential aus.

Im Skelettmuskel führt ein Aktionspotential zu einer Interaktion von Dihydropyridin-Rezeptoren im Sarkolemm und den daran gekoppelten Ryanodin-Rezeptoren in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums. Dies führt zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums, das überwiegend aus dem zelleigenen Kalzium-Speicher, dem sarkoplasmatischen Retikulum, stammt. Ein direkter Kalzium-Einstrom während des Aktionspotentials über Ionenkanäle des Sarkolemm ist beim Skelettmuskel von untergeordneter Bedeutung. Kalzium bindet an Troponin C, was zu einer Umlagerung von Tropomyosin und der Freigabe hochaffiner Myosinbindungsstellen am Aktinfilament und damit dem Beginn des Querbrückenzyklus führt. Da Skelettmuskelzellen im menschlichen Körper nicht in der Lage sind, ein autonomes Aktionspotential zu generieren, sind sie zur Kontraktion auf eine nervale Stimulation angewiesen. Skelettmuskelzellen sind elektrisch nicht miteinander gekoppelt, daher kann keine Erregungsausbreitung zwischen ihnen stattfinden.

Die morphologische Organisation des Herzmuskels ähnelt der des Skelettmuskels, wobei die Strukturproteine häufig in Organ-spezifischen Isoformen vorliegen. Ein wichtiges morphologisches Charakteristikum von Herzmuskelzellen und ein entscheidender funktioneller Unterschied zu Skelettmuskelzellen ist die interzelluläre Kopplung. Zwischen Herzmuskelzellen bilden sich charakteristische Zellgrenzen, die mikroskopisch als Glanzstreifen imponieren. In diesen Bereichen gibt es nicht nur eine besonders enge mechanische, sondern auch eine elektrische Kopplung der Kardiomyozyten untereinander, die im Skelettmuskel nicht zu finden ist. Diese elektrische Kopplung erfolgt über Proteinkomplexe, sogenannte Connexone, die in die gegenüberliegenden Zellmembranen eingelagert sind und je aus sechs Untereinheiten, den Connexinen, bestehen. Durch Aneinanderlagerung von zwei Connexonen wird ein Kanal zwischen zwei Zellen geschaffen, über den Ionen und kleine Moleküle (bis ca. 1 kDa) ausgetauscht werden können. Ladungsverschiebungen in Form von Ionenströmen können sich über diese sogenannten *Gap Junctions* praktisch ohne Zeitverzögerung über Zellverbände ausbreiten, so dass man von einem funktionellen Synzytium spricht (Hescheler, 2008).

Mehrere Subtypen von Connexinen sind beschrieben, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden. Im Myokard finden sich vor allem die Typen

Cx43, Cx40 und Cx45, wobei sich die Expressionslevel der Connexine im Herzen regional unterscheiden. Während im Arbeitsmyokard des Ventrikels hauptsächlich Cx43 gefunden wird, ist Cx40 nur in wesentlich geringerem Umfang nachweisbar. Vorhofmyokard und Erregungsleitungssystem enthalten vor allem Cx40 und Cx45 nebeneinander, das Reizleitungssystem jedoch in deutlich höheren Konzentrationen (Davis et al., 1995). Im Sinusknoten wird überwiegend Cx45 gefunden (Boyett et al., 2000). In den langsamer leitenden Regionen des Atrioventrikularknotens finden sich, in Übereinstimmung mit der Funktion, insgesamt nur wenige Gap Junction Plaques (Davis et al., 1995). Die Erregung des Herzmuskels erfolgt autonom über intrinsische Schrittmacher. Eine Aktivierung durch nervale Impulse wie beim Skelettmuskel findet nicht statt, sondern lediglich eine neurogene Modulation über Neurotransmitter.

Die elektromechanische Kopplung erfolgt im Herzmuskel über eine Kalzium-induzierte Kalzium-Freisetzung. Der initiale Kalzium-Einstrom erfolgt durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle in der Zellmembran, der Anstieg der Kalziumkonzentration im Sarkolemm ist aber auch im Herzmuskel überwiegend auf eine Ryanodin-Rezeptor-vermittelte Kalziumausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zurückzuführen. Der Querbrückenzyklus verläuft analog zur Skelettmuskulatur.

1.5.2 Kopplung in Skelettmuskelzellen

Hinsichtlich der Therapie des Herzinfarkts mangelt es Skelettmuskelzellen an der Fähigkeit zur Kopplung mit dem vitalen Myokard (vgl. Abschnitt 1.5.1). Skelettmuskelzellen exprimieren Cx43 nur im Myoblasten-Stadium, während sie noch zur Replikation fähig sind. Die Expression wird herunter reguliert wenn die Myoblasten fusionieren und zu Myotuben differenzieren (Schmalbruch, 1982; Balogh et al., 1993). Daher sind differenzierte, reife Myotuben elektrisch isoliert und können einzeln durch Motoneurone feinstmotorisch aktiviert werden. Reinecke et al. konnten 2000 zeigen, dass künstlich eingebrachtes Cx43 zu elektromechanischer Kopplung zwischen Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten *in vitro* führt (Reinecke et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Technik des lentiviralen Gentransfers genutzt, um auch in ausgereiften Skelettmuskelzellen das beschriebene Kopplungsprotein Cx43 stabil und dauerhaft zu exprimieren. Der Gentransfer durch Lentiviren *ex vivo* stellt eine sichere Möglichkeit dar, Zell- und Gentherapie zu kombinieren.

1.5.3 Nachweis von funktioneller Kopplung über Connexine

Für die antiarrhythmische Wirkung der Zelltherapie des Herzinfarktes ist die elektrische Kopplung von transplantierten Zellen zum vitalen Myokard essentiell.

Experimentell werden verschiedene Vorgehensweisen angewendet, um eine funktionelle Kopplung über Connexine nachzuweisen. Die Diffusion eines oder mehrerer Farbstoffe durch Connexin-Kanäle wird als Beweis einer funktionellen Kopplung angesehen. Das Einbringen des Farbstoffes in die Zelle stellt einen wichtigen Unterschied zwischen den Methoden dar: die gezielte Mikroinjektion und das Einbringen von Farbstoff durch Druck oder Iontophorese in eine Zelle (Reinecke et al., 2000; Reinecke et al., 2004), Laden einer Zelle mittels Patch-Clamp (Roell et al., 2007) oder unselektives „Scrape-loading“ von vielen Zellen (Stagg et al., 2006). Bei allen Verfahren tolerieren die Zellen die Belastung mit einem Farbstoff, die Zellmembran wird allerdings durch das Einbringen des Farbstoffes stark belastet, so dass nach kurzer Zeit der Zelltod die Folge ist.

Zum Nachweis von funktioneller Kopplung zwischen Skelettmuskelzellen durch lentiviral eingebrachtes Cx43 *in vitro* wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit ein neues Verfahren der lokalen Einzelzellektroporation etabliert, welches das Überleben der Zellen und sogar eine weitere Kultivierung ermöglicht.

1.5.4 Weitere Zellquellen als Vorarbeit zum Großtiermodell

Zur Anwendung eines experimentellen Verfahrens in der klinischen Praxis sind viele Schritte nötig. Die erfolgreiche Etablierung einer Therapie im Mausmodell stellt einen wichtigen Grundstein dar. Ein weiterer Schritt ist die Durchführung von Experimenten am Großtiermodell.

Das Großtiermodell eignet sich für die medizinische Grundlagenforschung, da Organe und Gewebe in Größe und Funktion denen des Menschen stark ähneln. 1995 verwendeten Van Meter et al. Schweine als Modell zur Zelltherapie des Herzinfarktes und transplantierten Myoblasten in den Ventrikel (Van Meter et al., 1995). Auch an Hunden wurden Versuche zur Zelltherapie des Herzinfarktes mit genetisch unveränderten Skelettmuskelzellen bereits durchgeführt und zeigten, ohne Cx43, keinen positiven Einfluss der Zellen auf die elektrische Erregungsausbreitung im Herzen (Fouts et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit der porcinen und caninen Skelettmuskelzellkultur evaluiert.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Die therapeutischen Möglichkeiten nach einem Herzinfarkt sind begrenzt und häufig nicht kausal, was die Suche nach neuen Therapiekonzepten erforderlich macht. Ein möglicher Ansatz ist die Verwendung von Skelettmuskelzellen für die Zelltherapie des Herzinfarktes zu nutzen. Die elektrische Kopplung dieser Zellen sollte hier durch lentiviralen Gentransfer von Cx43 erreicht werden, so dass eine Erregungsübertragung vom vitalen Myokard möglich ist, um Herzrhythmusstörungen nach einem Infarkt zu verhindern.

Die Zellen wurden *ex vivo* lentiviral transduziert und immunhistologisch und elektrophysiologisch untersucht. Nach Transplantation in den Herzinfarkt wurde die Effektivität dieser experimentellen Herzinfarkttherapie *in vivo* untersucht, wobei die antiarrhythmische Protektion dieser Zellen im Fokus lag.

Folgende Fragestellungen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit bearbeitet:

1. Kann die Präparation und Kultivierung adulter und embryonaler Skelettmuskelzellen der Maus weiter optimiert werden und ist ein ähnliches Vorgehen am Großtiermodell möglich?
2. Ist eine genetische Modifikation der Zellen *in vitro* mit lentiviralen Konstrukten zur Expression von Cx43 möglich?
3. Lässt sich Cx43 Expression *in vitro* nachweisen? Immunhistologisch sollte gezeigt werden, dass Cx43 stabil in die Zellen eingebracht wurde und in der Zellmembran lokalisiert war.
4. Kann funktionelle Kopplung durch Cx43 mittels der lokalen Einzelzellelektroporation und Farbstofftransfer nachgewiesen werden?
5. Lässt sich die Protektion vor spontanen Arrhythmien durch Cx43-exprimierende Skelettmuskelzellen mit Hilfe zweier verschiedener EKG-Aufzeichnungssysteme zeigen? Ein Programm für die semiautomatische Computer-gestützte Analyse der EKG-Daten wurde dazu im Rahmen dieser Arbeit entwickelt, um spontane Arrhythmien sicher automatisch detektieren zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Medien und Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Medien und Chemikalien

Substanz	Lieferant
Alexa350	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Alexa546-Dextran	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Ampuwa Reinstwasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor, Tabletten	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) High Glucose	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Eserserum	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Fibronektin (0,1 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FLUKA-Eindeckmedium	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FKS) A04305-0461	PAN-Biotech, Aidenbach
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glukose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hoechst 33342 (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumaspartat	Sigma-Aldrich, Steinheim

Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagenase B	Roche, Mannheim
L-Glutamin	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Magnesium-ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumzitat	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyruvat	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
Nicht essentielle Aminosäuren, MEM	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mitomycin C	Medac, Hamburg
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Pferdeserum	Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Taurin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA 0,05 % (w/v) 100x	Gibco/Life Technologies, Darmstadt
Ultroser G, Serum Replacement	Pall GmbH, Dreieich

2.2 Reagenziensätze und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Material	Lieferant
Thoma-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Plastikware für die Zellkultur	Falcon, Gräfeling-Lochnam
	Greiner bio-one, Frickenhausen

	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
	Sarstedt, Nümbrecht
Nylon Zellfilter (Cell Strainer)	Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien
Probenbehältern aus Plastik	Vitlab, Großostheim
Kryoröhrchen	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Objektträger Super Frost	Menzel-Gläser, Braunschweig
Glaskapillaren GB150F-10	Science Products, Hofheim
Immersionöl TM 518F	Carl Zeiss, Jena
Karaya Pad	Ormed, Freiburg

2.3 Zellbiologische Materialien

2.3.1 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Kultivierung primärer muriner Skelettmuskelzellen

20 % *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) 77,9 % IMDM
 20 % FKS
 1 % MEM
 1 % Penicillin/Streptomycin
 0,1 % β -Merkaptoethanol
 0,5 ng/ml bFGF

Kultivierung primärer muriner Kardiomyozyten

20 % *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) 76,9 % IMDM
 20 % FKS
 1 % Penicillin/Streptomycin
 1 % MEM
 1 % L-Glutamin
 0,1 % β -Merkaptoethanol

Kultivierung primärer porciner Skelettmuskelzellen

20 % *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 76 % DMEM
 20 % FKS
 2 % Ultrosor G
 1 % Penicillin/Streptomycin
 1 % MEM
 1 g/l Glukose

Kultivierung primärer caniner Skelettmuskelzellen

20 % *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 78 % DMEM High Glukose
20 % FKS
1 % Penicillin/Streptomycin

Differenzierung primärer caniner Skelettmuskelzellen

20 % *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) 96 % DMEM High Glukose
2 % Pferdeserum
1 % Penicillin/Streptomycin

Weitere Medien und Lösungen

Einfriermedium	80 % FKS 20 % DMSO
0,001 % Fibronectin-Lösung	Fibronectin-Stammlösung (0,1 %) in PBS
0,1 % Gelatine-Lösung	100 mg Gelatine 100 ml PBS
Kollagenase B-Lösung	10 mg/ml Kollagenase B 10 mM CaCl ₂ in Niedrig-Kalzium-Lösung
25 x Complete-Stammlösung	1 Tablette Complete™ in 2 ml Ampuwa Reinstwasser lösen
Niedrig-Kalzium-Lösung	120 mM Natriumchlorid 5,4 mM Kaliumchlorid 5 mM Magnesiumsulfat 5 mM Natriumpyruvat 20 mM Taurin 10 mM Hepes 20 mM Glukose pH 6,9 mit Natriumhydroxid
Intrazellulär-Lösung	40 mM Kaliumchlorid 90 mM Kaliumaspartat 10 mM Natriumchlorid 3 mM Magnesium-ATP 1 mM Magnesiumchlorid 10 mM Hepes pH 7,4 mit Kaliumhydroxid

Extrazellulär-Lösung	142 mM Natriumchlorid 5,4 mM Kaliumchlorid 2 mM Magnesiumchlorid 10 mM Glukose 10 mM Hepes 1,8 mM Kalziumchlorid pH 7,4 mit Natriumhydroxid
----------------------	---

2.4 Tierexperimentelle Arbeiten

Die CD1 Mauslinie wurde für die tierexperimentellen Arbeiten an genetisch unveränderten Mäusen verwendet. Für die *in vivo* Versuche wurden weibliche Tiere im Alter von 6 Wochen bis 6 Monaten genutzt.

Mäuse mit einer heterozygoten Mutation im Gen für den kardialen SCN5A Natriumkanal (Deletion der Aminosäuren 1505-1507) wurden ebenfalls für Experimente verwendet. Diese autosomal-dominante Mutation führt zu einer Verlängerung des QT-Intervalls (langes QT-Syndrom) und die Tiere zeigen spontane, polymorphe, ventrikuläre Arrhythmien (Nuyens et al., 2001). Die genetisch veränderten Tiere wurden vom *Center for Transgene Technology and Gene Therapy* (Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, KU Leuven, Leuven, Belgium) unter der Leitung von Professor P. Carmeliet zur Verfügung gestellt. Sie werden als SCN5aD-Tiere bezeichnet.

Tierversuchsantrag genehmigt unter Aktenzeichen: 84-02.04.2011.A292 des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV).

2.5 Immunzytochemische Materialien

2.5.1 Puffer und Lösungen für immunzytochemische Färbungen

0,2 % Triton-X-100-Lösung	100 µl Triton-X-100 49 ml PBS
4 % Paraformaldehyd	4 g PFA 100 ml Reinstwasser NaOH + Wärme zum Lösen HCl zum Neutralisieren Sterilfiltrieren
Hoechst-Lösung	1 ml Hoechst 33342 999 ml PBS

2.5.2 Antikörper

Folgende primäre und sekundäre Antikörper für immunzytochemische Färbungen wurden in den angegebenen Verdünnungen benutzt:

Tabelle 3: Primäre Antikörper zur immunzytochemischen Zellcharakterisierung

Primärer Antikörper	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Alpha-Aktinin EA-53	Maus IgG1	1:400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cx43	Kaninchen IgG	1:400	Alpha Diagnostics, San Antonio, Texas, USA
Desmin	Maus IgG	1:200	Sigma-Aldrich, Steinheim
MyoD	Maus IgG	1:50	Dako, Hamburg
Ki-67 (TEC-3)	Ratte IgG 2a	1:200	Dako, Hamburg
Myogenin	Maus IgG	1:500	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pax7	Maus IgG	1:400	DSHB, Iowa City, USA
Titin	Maus IgG	1:100	Institut für Zellbiologie, Universität Bonn
Vimentin	Huhn IgY	1:1000	Chemicon, Millipore, Schwalbach

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper zur Visualisierung von Primärantikörpern

Sekundärer Antikörper	Fluorochrom	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Kaninchen IgG	Cy5	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Maus IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien
Maus IgG	Alexa 647	Ziege	1:400	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Maus IgG	Cy5	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien

2.6 Geräte und Software

2.6.1 Etablierte Geräte und Software

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
ApoTome	Carl Zeiss, Jena
AxioCam MRm	Carl Zeiss, Jena
Canon Powershot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld
DMZ-Universal Puller	Zeitz-Instruments, München
Fluoreszenz Filter	AHF Analysetechnik, Tübingen
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikromanipulator Mini 25 SM5	Luigs & Neumann, Ratingen
Mikroskop Axiovert 40CFL	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Fluar Mikroskop-Objektive	Carl Zeiss, Jena
Pipetten	Gilson, Villiers Le Bel, Fankreich
Pipettierhilfe	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Platteninkubator B15	Heraeus, Hanau
Polychrome V Monochromator	TILL Photonics, Gräfelfing
Puls-Stimulator, 2100; 220 V, 50 Hz	A-M Systems, Sequim, USA
RS 2000 X-ray, Biological Irradiator	Rad Source Tech., Alpharetta, USA
Schüttelrührer	VWR International, Darmstadt
Sterilbank HERAsafe	Heraeus, Hanau
Telemetrie Data Exchange Matrix	DSI, Valley View, USA
Telemetrie Receiver RPC-1	DSI, Valley View, USA
Telemetrie Transmitter TA10EA-F20	DSI, Valley View, USA
Thermoschüttler MHR 23	HLC/ Ditabis, Pforzheim
TILL Imago QE Kamera	TILL Photonics, Gräfelfing
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Tischzentrifuge Centrifuge 5402	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Ultraschallbad	VWR International, Darmstadt
Verstärker BA-03X	NPI electronic, Tamm
Waage 440-45	KERN, Balingen
Zentrifuge Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Stuttgart
Zellinkubator HERAcell 240	Heraeus, Hanau

Tabelle 6: Verwendete Software

Software	Hersteller
Axiovision	Carl Zeiss, Jena
Excel	Microsoft, Redmond, USA
Graph Pad Prism	Graph Pad Software, Inc., La Jolla USA
LabChart	ADInstruments, Sydney, Australia
Labview	National Instruments, Austin, USA
PONEMAH Physiology Platform	DSI, Valley View, USA
TILL Vision, Version 4.5.53	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing

2.7 Methoden

2.7.1 Zellbiologische Methoden

2.7.1.1 Skelettmuskelzellen von embryonalen Mäusen

Um embryonale Skelettmuskelzellen zu isolieren, wurden weibliche CD1 Mäuse über 24-72 Stunden mit männlichen CD1-Tieren verpaart. An Tag 17,5 - 18,5 *post conceptionem* (bestimmt anhand des Verpaarungsdatums und Vorliegen eines Vaginalplugs) erfolgte die Tötung schwangerer Mäuse, unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen, mittels zervikaler Dislokation. Nach Desinfektion der Bauchdecke des Muttertieres mit 70 % Ethanol-Lösung (30 Sek. Einwirkzeit) wurde der Uterus mitsamt der Embryonen (in der Regel 10-15) entnommen, in eiskaltes PBS überführt, die Embryonen zügig freigelegt und dekapitiert. Die Isolation von Myoblasten erfolgte aus der Hinterbeinmuskulatur und dem Diaphragma der Embryonen. Die Hinterbeine der Tiere wurden rumpfnah abgetrennt und die Haut entfernt, sodass das Muskelgewebe vom Knochen abgezupft werden konnte. Nach Durchtrennung des gesamten Rumpfes und

Entfernung der Leber konnte das Diaphragma aus der unteren Thoraxapertur gelöst werden. Das Muskelgewebe wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in kaltem PBS gesammelt.

In 750 µl Kollagenase B (1 mg/ml) fand der Verdau des Gewebes für 45 Min. bei 37 °C statt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 µl Pipette, alle 15 Min., wurde die Suspension durchmischt. Anschließend wurden 250 µl Trypsin-EDTA-Lösung hinzugefügt und weitere 15 Min. bei 37 °C inkubiert. Diese Suspension wurde über einen Nylon Zellfilter mit einer Maschenweite von 100 µm gegeben und mit 9 ml IMDM Medium nachgespült. Der Rückstand im Filter wurde entsorgt. Nach Zentrifugation des Filtrats (5 Min., 210 x g) konnten die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert werden. Die Bestimmung der Zellzahl geschah anhand von 10 µl dieser Zellsuspension 1 zu 10 verdünnt mit 90 µl IMDM Medium in einer Thoma-Zählkammer. Die Kultivierung erfolgte mit einer Zellkonzentration von 125 000 Zellen pro cm² auf mit Fibronectin (0,001 %) beschichteten Glasplättchen und regelmäßigem Wechsel des Mediums alle 2 Tage. Sollten die Zellen über mehr als 3 Tage kultiviert werden erfolgte am 3. Tag nach Isolation eine radioaktive Bestrahlung mit γ-Strahlen (15 Gy; 6 MeV Photonen für 6 Min. und 45 s, RS 2000 X-ray), um das Wachstumspotential der kontaminierenden Fibroblasten zu hemmen. Diese Bestrahlung hatte auch einen positiven Effekt auf die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben (Becher et al., 2009).

2.7.1.2 Skelettmuskelzellen von adulten Mäusen

Zur Isolation von Skelettmuskelzellen von adulten Mäusen (6-10 Wochen alt) wurden die Tiere durch zervikale Dislokation, entsprechend der Tierschutzbestimmungen, getötet. Eine Hautdesinfektion erfolgte mit 70 % Ethanol-Lösung (30 Sek. Einwirkzeit). Als Zellquelle dienten Hinterbeinmuskulatur und Diaphragma. Nach Inzision der Bauchdecke wurden die Bauchorgane nach kaudal verlagert um das Diaphragma darzustellen. Dieses wurde von den Rippen und der Wirbelsäule abpräpariert, von überschüssigem Gewebe befreit und in eiskaltes PBS überführt.

Die Präparation der Hinterbeinmuskulatur erfolgte nach dem Entfernen der Haut und Freipräparieren der Achillessehne. Diese wurde durchtrennt, die Streckmuskeln am Ursprung vom Knochen gelöst und ebenfalls in kaltes PBS überführt, wo Sehnen und anderes nicht-Muskelgewebe entfernt wurden.

Die gesammelten Muskeln wurden in eiskaltem PBS mit einer feinen Schere mechanisch möglichst fein zerkleinert. Das Gewebe wurde dann enzymatisch in Kollagenase B (1 mg/ml) für 60 Min. bei 37 °C verdaut (2100 µl für die Unterschenkel, 750 µl für das Diaphragma). Alle 15 Min. erfolgte durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer gekürzten 1000 µl Pipettenspitze eine Resuspendierung. Dabei wurde die Pipettenspitze immer weniger gekürzt, sodass die Öffnung und damit die Muskelstücke immer kleiner wurden. Abschließend wurde Trypsin-EDTA für 20 Min. bei 37 °C zugegeben (500 µl für die Hinterbeinmuskeln, 250 µl für das Diaphragma) und erneut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann über einen Nylon Zellfilter mit einer Maschenweite von 40 µm gegeben und mit IMDM Medium nachgespült um 10 ml Suspension zu erhalten. Nach Entsorgen des Rückstandes wurde das Filtrat zentrifugiert (5 Min., 210 x g), der Überstand entfernt und die Zellen in 1 ml IMDM Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl konnten die Zellen in einer Konzentration von 125 000 Zellen pro cm² auf Gelatine-beschichteten (0,1 %) Glasplättchen ausgesät und mit 1 ml IMDM Medium versorgt werden, dass alle 2 Tage gewechselt wurde. Um bei längerer Kultivierung (> 8 Tage) ein Überwachsen der Skelettmuskelzellen durch stärker proliferierende Fibroblasten zu verhindern, wurde an Tag 8 nach Isolation eine Behandlung mit Mitomycin C (10 µg/ml) für 2 Std., zur Hemmung der Proliferation, durchgeführt.

2.7.1.3 Präparation von Kardiomyozyten von embryonalen Mäusen

Um embryonale Kardiomyozyten zu isolieren, wurden hoch schwangere Muttertiere (Tag 16,5 – 17,5 *post conceptionem*) durch zervikale Dislokation getötet. Nach Desinfektion der Bauchdecke mit 70 % Ethanol-Lösung (30 Sek. Einwirkzeit) wurde diese eröffnet und der Uterus samt Embryonen entnommen, in eiskaltes PBS überführt und die Embryonen dekapitiert. Um die Herzen zu präparieren, wurde der Rumpf der Embryonen unter dem Rippenbogen durchtrennt, das Diaphragma entfernt, das Herz mit einer feinen Pinzette entnommen und in eiskaltes PBS in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Herzen wurden mit Pinzetten mechanisch zerkleinert, in 750 µl Kollagenase B (1 mg/ml) pro 6 Herzen überführt und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kollagenase abgesaugt, der Verdau durch Zugabe von 600 µl IMDM Medium gestoppt und das Reaktionsgefäß für 20 Min. in einem Becherglas mittels einem Rührfisch auf einem Magnetrührer bewegt. Durch anschließendes vorsichtiges resuspendieren

wurde eine homogene Zellsuspension erzeugt. Diese konnte auf 0,1 % Gelatine beschichteten Glasplättchen ausgesät und kultiviert werden. Ein Mediumwechsel fand alle 2 Tage statt.

2.7.1.4 Isolation von Skelettmuskelzellen von Schweinen

Die Isolation von Myoblasten aus Muskelbiopsien vom Schwein wurde entsprechend eines modifizierten Protokolls nach Holzer et al. 2005 durchgeführt. Verwendet wurden 1cm³ große Muskelbiopsien aus Deutsche Landrasse Schweinen (30-35 kg, Alter: 6-7 Monate) die aus dem Haus für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung standen. Zunächst fand eine mechanische Zerkleinerung des Gewebestückes statt, gefolgt von einer enzymatischen Dissoziation in 3 ml Kollagenase B (1 mg/ml) bei 37 °C über 60 Min. mit 15-minütiger Resuspendierung durch Auf- und Abpipettieren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA und weitere Inkubation bei 37 °C für 20 Min. Die Zellsuspension wurde dann über einen Nylon Zellfilter mit einer Maschenweite von 40 µm gegeben und mit DMEM Medium auf 15 ml Volumen aufgefüllt. Durch Zentrifugation (10 Min., 210 x g) wurden die Zellen pelletiert und konnten nach Verwerfen des Überstandes in 1 ml DMEM Medium resuspendiert und die Zellzahl mit der Thoma-Zählkammer bestimmt werden. Die Kultivierung wurde mit einer Zellkonzentration von 125 000 Zellen pro cm² auf mit 1 % Gelatine beschichteten Glasplättchen durchgeführt und das Medium alle zwei Tage gewechselt.

2.7.1.5 Kultur von Myoblasten von Hunden

Gefrorene, canine Myoblasten wurden von der Abteilung für Pathologie und Labormedizin der Universität von North Carolina-Chapel Hill von D. A. Detwiler zur Verfügung gestellt und bei -80 °C gelagert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den dort etablierten Protokollen.

Zum Auftauen wurden die Zellen in 5 ml 37 °C warmem PBS resuspendiert und für 1 Min. inkubiert um das Einfriermedium zu verdünnen. Anschließend wurden 300 000 Zellen pro 10 cm Kultur-Schale in DMEM-*high Glucose* Kulturmedium ausgesät. Die Passage der Zellen wurde bei einer Konfluenz von ca. 80 % durchgeführt. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. 200 µl Trypsin-EDTA-Lösung wurde zugegeben und für 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Der enzymatische Schritt

wurde mit 700 µl Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation (3 Min., 210 x g) wurden die Zellen pelletiert und konnten in 1 ml DMEM-*high Glucose* Kulturmedium resuspendiert und erneut mit 300 000 Zellen pro 10 cm Kultur-Schale ausgesät werden. Die Zellen mussten so ca. alle 3 Tage passagiert werden. Um die Myoblasten-Kultur in Myotuben zu differenzieren, wurde das Kulturmedium gegen DMEM Differenzierungsmedium ausgetauscht.

2.7.1.6 Lentiviraler Gentransfer

Die verwendeten lentiviralen Konstrukte beinhalteten sämtlich den ubiquitär-aktiven Zytomegalievirus-Promotor (CMV), weiterhin das Verpackungssignal Ψ und ein cPPT-Element zur Steigerung der nukleären Translokation und ein WPRE-Element, um die mRNA-Stabilität zu erhöhen (Abbildung 4, A). Das Kontrollkonstrukt kodierte nur das grüne Fluoreszenzprotein eGFP. Ein weiteres Konstrukt beinhaltete Cx43 ohne Fluoreszenzprotein. In den weiteren Experimenten wurde hauptsächlich ein Konstrukt verwendet, das Cx43 und über eine Intraribosomale-Eintrittsstelle (IRES) eGFP als Fluoreszenzmarker kodiert. Die Konstrukte wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Bonn von A. Hofmann unter der Leitung von A. Pfeifer generiert. Die Transfektion von HEK-Zellen zur Austestung der Konstrukte fand ebenfalls im Institut für Pharmakologie und Toxikologie statt.

2.7.2 Immunhistochemische Methoden

2.7.2.1 Fixieren von Zellen

Um die Autolyse von Zellen zu verhindern und zelluläre Strukturen zu stabilisieren, müssen Zellen vor immunhistochemischen Färbungen fixiert werden. In dieser Arbeit wurde 4 % PFA gelöst in PBS verwendet, das als quervernetzendes Fixationsagens Eiweiße miteinander verbindet. Vor der Fixierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA-Lösung überschichtet die 30 Min. einwirken konnte. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und für Färbungen verwendet. Durch diese Art der Fixierung wurde die native eGFP-Fluoreszenz der Zellen nicht beeinträchtigt und es konnten immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Gefärbte und ungefärbte Präparate wurden bei -80 °C gelagert.

2.7.2.2 Immunhistologische Färbungen von Zellen

Zum Anfärben von zellulären Strukturen und Proteinen wurden in dieser Arbeit mono- und polyklonale Antikörper verwendet. Mit diesen wurden die Zellen in einer so genannten feuchten Kammer gefärbt, um das Austrocknen zu vermeiden. Vor dem eigentlichen Färben wurden die Zellen mit PBS für 5 Min. rehydriert. Der gewünschte Erstantikörper wurde entsprechend seiner Affinität zum Antigen (siehe Tabelle 3: Primäre Antikörper) in 0,2 % Triton-X 100 in PBS mit 5 % Serum verdünnt. Triton-X ist ein Detergenz, welches die Zellmembran permeabilisiert und intrazelluläre Strukturen für die Färbung besser zugänglich macht. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde Serum aus der gleichen Spezies verwendet, aus der auch der Zweitantikörper stammt. Der gelöste Erstantikörper wurde 2 Std. bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert, so dass sich die Antigen-Antikörper-Komplexe bilden konnten. Nach der Inkubationszeit folgten 3 Waschschriffe mit PBS von je 5 Min. Dauer und die Zugabe der fluoreszenten, lichtempfindlichen Zweitantikörper (siehe Tabelle 4: Sekundäre Antikörper). Diese wurden verdünnt in 1 µg/ml Hoechst 33342 in PBS, das als interkalierender DNA-Farbstoff die Zellkerne anfärbte. Die Zweitantikörper binden an Antigene der Spezies in der die verwendeten Erstantikörper generiert wurden und richten sich so gegen den Spezies-spezifischen konstanten Anteil der schweren Kette des Erstantikörpers (Fc). Bei gleichzeitiger Färbung von verschiedenen Antigenen dürfte es bei der Auswahl sowohl der Erstantikörper als auch der Zweitantikörper nicht zu Überschneidung der Spezies kommen. Außerdem mussten für die Markierung der verschiedenen Antigene unterschiedlich farbige Zweitantikörper verwendet werden. Die Zweitantikörperlösung wurde für 1 Std. bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal für je 5 Min. mit PBS gewaschen und mit Eindeckmedium auf Wasserbasis (FLUKA) eingedeckt. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei 4 °C in Dunkelheit.

Die Mikroskopie und Dokumentation der gefärbten Zellen erfolgte an einem Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop mit einem Apotom-Modul. Zur Quantifizierung beispielsweise der viralen Transduktionseffizienz wurden Aufnahmen von größeren Bereichen mit der MosaiX-Erweiterung der Axiovision Software gemacht und mit der automatischen Funktion der Software ausgewertet.

2.7.3 Elektroporations-Experimente

Die neue Methode der lokalen Einzelzellektroporation wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Eine genaue Beschreibung der Technik findet sich in Abschnitt 3.2. Um Versuche an Zellen durchführen zu können, mussten diese auf Glasplättchen kultiviert werden, die in einer temperierten Kammer eingespannt und mit Extrazellulär-Lösung überschichtet wurden.

Die Experimente fanden auf dem Mikroskoptisch eines schwingungsfrei-installierten, invertierten Axiovert 200 Mikroskops mit 10 x, 20 x oder 40 x Luft-Objektiven statt. Aufnahmen wurden mit einer gekühlten, digitalen CCD-Kamera (TILL Imago QE camera) und der Software TILL Vision gemacht. Fluoreszenzanregung fand mit monochromatischem Licht (Wellenlänge: Alexa350: 360 nm; Alexa546-Dextran: 544 nm, eGFP: 475 nm) statt, das von einem Computer-gesteuertem Monochromator (Polychrome V) generiert wurde. Die Emissionsfluoreszenz wurde mit verschiedenen Filtern, entsprechend der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe (A350: Emission 442 nm, DAPI-Filter; A546-Dextran: Emission 573 nm, TRITC-Filter; eGFP: Emission 509 nm, FITC-Filter), beobachtet.

Die lokale Einzelzellektroporation wurde mit scharfen Elektroden durchgeführt, die aus Glaskapillaren (GB150F-10) mit einem DMZ-Universal Puller gezogen wurden und einen Spitzenwiderstand von 80-90 M Ω hatten. Diese Kapillaren wurden mit Intrazellulär-Lösung gefüllt, in der die Farbstoffe gelöst waren, die in die Zelle eingebracht werden sollten. Für die Elektroporation wurde mit einem isolierten Puls-Stimulator (Model 2100) und einem modularen Verstärker (BA-03X) ein alternierendes Rechteckpuls mit einer Amplitude von +/-20 nA, einer Phasenlänge von 5 ms und einer Pulslänge von 2,5 ms (Frequenz: 200 Hz) generiert. Die Glaselektrode wurde mittels eines Mikromanipulators über einen Controller (Mini 25 mit Display SM5) gesteuert.

Alle Farbstofftransfermessungen an Skelettmuskelzellen fanden zwischen 7 und 15 Tagen nach Isolation der Zellen statt.

2.7.4 Herstellung von Zelllysaten für Immunoblotanalysen

Um die Expression des lentiviral eingebrachten Kopplungsproteins Cx43 auf Proteinebene zu überprüfen, wurde ein Lysat der transduzierten Zellen hergestellt. Dazu wur-

den die konfluenten Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und mit 200 µl 1 x Complete-Lösung pro 10 cm-Kulturschale behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und die zähflüssige Suspension konnte in einem Ultraschallbad bei 4 °C sonifiziert werden. Das Lysat war bei -70 °C lagerbar und wurde zur weiteren Aufarbeitung und Durchführung des Immunoblots nach den dortigen Protokollen in das Institut für Genetik unter der Leitung von Prof. Willecke überführt.

2.7.5 EKG-Messungen an Mäusen

2.7.5.1 EKG-Röhre

Zur akuten EKG-Messung an Mäusen wurde eine nach Literaturangaben selbstgebaute EKG-Röhre verwendet (Mongue-Din et al., 2007). Analog zu humanen Messungen wurden bipolare Ableitungen nach Einthoven aufgezeichnet. Zunächst wurden nur Ableitung I und III aufgezeichnet. Die EKG-Röhre wurde im Verlauf weiterentwickelt, so dass das Aufzeichnen von allen 3 Ableitungen nach Einthoven I, II und III möglich war (Abbildung 2). Die EKG Röhre wurde mehrmals umgebaut, um gute Signalqualität und einfache Bedienung zu gewährleisten. Die eigentliche Messvorrichtung in der die Maus fixiert war, wurde auf einem selbstgebauten Verstärker montiert, der die einzelnen Ableitungen direkt ausgibt (Abbildung 2, C).

Zur Messung des EKGs wurden die Tiere auf die Messplattform der EKG-Röhre gesetzt und mit einer Röhre aus Plexiglas atraumatisch fixiert. Nach dem Prinzip der EKG-Ableitung beim Menschen wurde das Signal über die Pfoten der Tiere abgeleitet. Um den elektrischen Widerstand der Haut zu verringern, wurden leitende Gelpads (Karaya Pad) und Elektroden-Gel mit 10% NaCl (Herstellung in der Apotheke des Universitätsklinikums Bonn) verwendet. Bei ausreichender Signalqualität wurde die Messung gestartet. Das EKG wurde über einen Zeitraum von bis zu 1 Stunde aufgezeichnet. Die Tiere wurden während der Messung anhand des EKGs überwacht. Eine ausführliche Analyse der Daten fand im Nachhinein statt. Das Aufzeichnen und die Analyse der Daten wurde mit der Software Lab Chart durchgeführt. Dabei fand die Beurteilung des EKGs geblindet statt, das heißt der Untersucher wusste zum Zeitpunkt der EKG-Analyse nicht, ob das Tier mit Zellen behandelt wurde oder zur Kontrollgruppe gehörte.

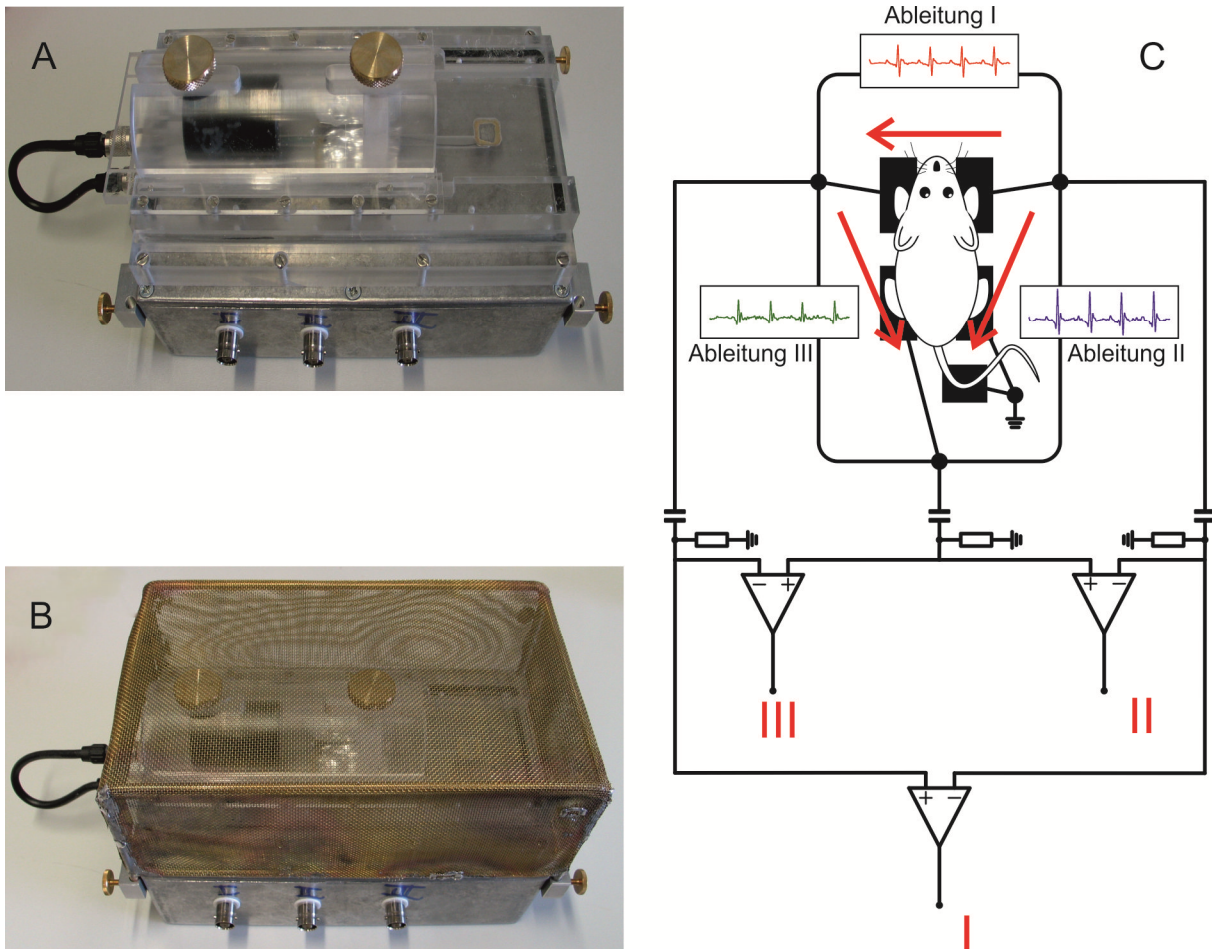


Abbildung 2: EKG-Röhre

Die wache Maus wird durch einen Plexiglastunnel atraumatisch fixiert und das elektrische Signal des Herzens mittels Fußelektroden abgeleitet (A). Zur Abschirmung gegen elektrisches Rauschen wurden die Messungen unter einem Faradayschen-Käfig aus Messing durchgeführt (B). Die aufgezeichneten Ableitungen entsprechen den Ableitungen I, II und III nach Einthoven. Sowohl das rechte Hinterbein als auch der Schwanz der Maus dienen als Erdung. Im vereinfachten Schema (C) ist die Verschaltung gezeigt. Ein RC-Glied aus einem Kondensator mit der Kapazität von $0,1 \mu\text{F}$ und einem Widerstand mit 1Ω bildete einen Hochpassfilter mit einer Grenzfrequenz von $1,6 \text{ Hz}$ um Gleichspannung herauszufiltern. Über einen Differenzverstärker mit einem Verstärkungsfaktor von 1000 wurden die Eingänge, wie im Schema dargestellt, verschaltet, um die Ableitungen I, II und III zu erhalten.

Ein Schwerpunkt bei der Auswertung der Daten war die Rhythmus- und Frequenzanalyse. Durch Messen des RR-Abstandes wurden die Abstände der einzelnen elektrischen Herzaktivitäten zueinander bestimmt. Die Form der einzelnen QRS-Komplexe wurde beurteilt und durch einen direkten Vergleich der einzelnen Ableitungen untereinander arrhythmische Ereignisse identifiziert und artifizielles Rauschen ausgeschlossen.

Um Arrhythmien nach einem Herzinfarkt und den Effekt von transplantierten Zellen zu zeigen, wurden EKG-Messungen an genetisch unveränderten Mäusen vorgenommen, bevor diese operiert wurden. Diese Messungen dienten als Kontrolle. Bei stark auffälligen EKG-Veränderungen wurden diese Tiere nicht für weitere Experimente verwendet. Die Tiere wurden erneut ca. 7 und 14 Tage nach Intervention gemessen.

Insgesamt wurden 174 Messungen durchgeführt; davon 47 Kontroll-Messungen an gesunden Tieren oder an infarzierten Tieren ohne Intervention. 62 Messungen wurden an Tieren durchgeführt, die mit embryonalen Kardiomyozyten nach einem Herzinfarkt behandelt wurden und 65 mit embryonalen Skelettmuskelzellen. Von diesen 65 gab es 27 Messungen an Tieren, denen Skelettmuskelzellen nur mit dem grünen Fluoreszenzprotein eGFP implantiert wurden. 38 Messungen wurden an Tieren vorgenommen, die mit Cx43 exprimierenden Skelettmuskelzellen (nach lentiviraler Transduktion) behandelt wurden.

2.7.5.2 Implantierbares Langzeit-EKG

Langzeit EKG-Messungen der Mäuse wurden mit einem kommerziell erhältlichen, radiotelemetrischen System der Firma DSI vorgenommen, das die Messwerte mit Hilfe von Funkwellen überträgt.

Telemetrische EKG-Transmitter (TA10EA-F20) wurden entweder subkutan auf dem Rücken der Maus oder intraperitoneal in die Bauchhöhle nach Anleitung des Herstellers implantiert, wobei eine Implantation auf dem Rücken eine bessere Aufnahmequalität des Signals gewährleistete. Die Implantation der EKG-Transmitter wurde von A. Klein, Institut für Physiologie I unter Anleitung von W. Röhl, Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Bonn, durchgeführt. Die Messdrähte des Transmitters wurden entsprechend Ableitung II nach Einthoven, fixiert.

Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten, die auf den Empfänger-Platten (RPC-1-Receiver) des Telemetrie-Systems standen. So konnte neben dem per Funkwellen übertragenen EKG auch die Bewegung der Maus im Käfig registriert und als Aktivitätskurve wiedergegeben werden. Die erfassten Signale wurden an eine Austauscher-Matrix (Data Exchange Matrix) weitergeleitet und von dort an einen PC gesendet, auf dem die EKG-Daten mit der Software PONEMAH Physiology Platform aufgezeichnet und gespeichert wurden. Die Aufzeichnung wurde alle 2 bis 3 Tage neugestartet, um die daraus resultie-

renden EKG-Dateien nicht zu groß werden zu lassen. Pro Maus und Tag betrug das Datenvolumen der Langzeit-EKG-Messung ca. 1 GB. Es wurden in der Regel 4 Tiere parallel gemessen, wodurch ungefähr 4 GB Rohdaten am Tag aufgezeichnet wurden. Die weitere Datenverarbeitung und Analyse erfolgte mit selbstentwickelter Software (Abschnitt 3.4.2). Ausschnitte der Messungen wurden auch mit Lab Chart untersucht. Nach Implantation wurde über einen Zeitraum von mindestens 2 Wochen das EKG aufgezeichnet, bevor die Tiere Kryoinfarziert wurden. Diese Aufzeichnungen dienten als interne Kontrolle zu den Aufzeichnungen nach Infarkt. Das Langzeit-EKG wurde dann mindestens über 2 Wochen nach Infarkt gemessen.

2.7.6 Statistische Verfahren

Für die statistische Analyse der Langzeit-EKG-Daten wurden diese in Microsoft Excel und Graph Pad Prism exportiert. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-test ermittelt. Entsprechend der verglichenen Gruppen wurde der gepaarte oder ungepaarte t-test gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Isolation und genetische Modifikation von Skelettmuskelzellen

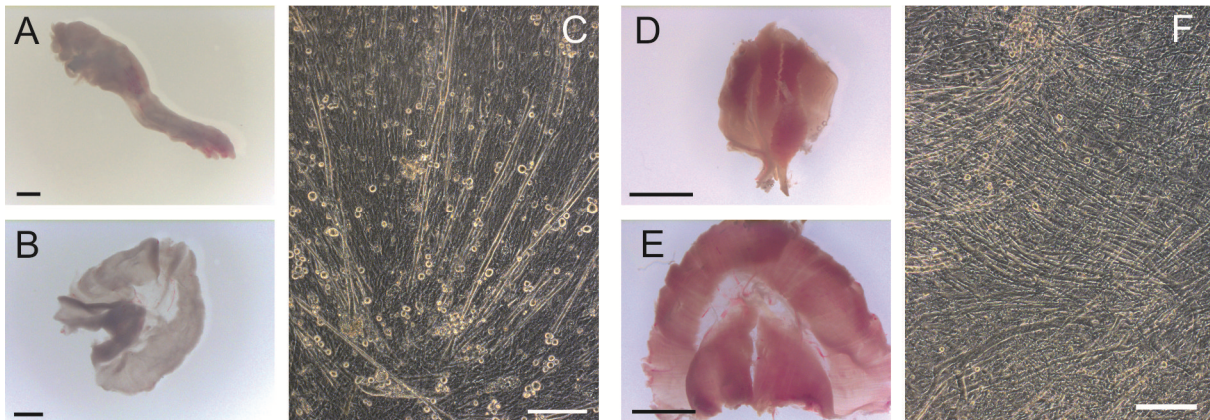


Abbildung 3: Isolation von Skelettmuskelzellen

Aus der Hinterbeinmuskulatur (**A**) und dem Diaphragma (**B**) von Mausembryonen (Entwicklungsstag E 18.5) wurden embryonale Myoblasten isoliert. (**C**) zeigt diese Zellen 7 Tage nach Isolation. Die Skelettmuskelzellen kontrahierten *in vitro* spontan. Skelettmuskelzellen aus adulten Mäusen wurden ebenfalls aus der Hinterbeinmuskulatur (**D**) und dem Diaphragma (**E**) gewonnen. Es bildeten sich morphologisch Myotuben, die ab Tag 5 – 6 nach Isolation spontan schlugen. (**F**) zeigt adulte Skelettmuskelzellen 11 Tage nach Isolation. Maßstabsbalken: 1 mm (A, B); 200 μ m (C, F); 5 mm (D, E).

3.1.1 Kultivierung embryonaler Skelettmuskelzellen

Für die Kultivierung embryonaler Skelettmuskelzellen (nach Becher et al., 2009) wurden das Diaphragma und die Hinterbeinmuskulatur aus Mäuseembryonen am spätembryonalen Entwicklungsstag E 18.5 präpariert, wie in Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben (Abbildung 3, A und B). Anschließend erfolgte die enzymatische Dissoziation und die Zellen wurden in 24-Lochplatten auf Fibronectin (0,001 %) beschichtete Glasplättchen ausgesät. Eine Zelldichte von 250 000 Zellen pro 1,9 cm^2 erwies sich als optimale Kulturbedingung, um nach 4-5 Tagen eine Differenzierung in kontrahierende Myotuben zu induzieren (Abbildung 3, C).

Bestrahlung der Zellen mit 15 Gy Gammastrahlung (6 MeV Photonen für 6 Min., 45 Sek.) an Tag 3 nach Isolation (wie von Becher et al., 2009 beschrieben) beschleunigte die Differenzierung zu Myotuben und verhinderte das Überwachsen mit den stärker proliferierenden Fibroblasten durch Inaktivierung. Dadurch konnten die Zellen über einen längeren Zeitraum (bis zu 30 Tage) kultiviert und analysiert werden.

3.1.2 Kultivierung adulter Skelettmuskelzellen

Ein Protokoll für die Kultivierung primärer Skelettmuskelzellen aus adulten Mäusen wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit (teilweise in Zusammenarbeit mit U. Becher) etabliert.

Aus 6 bis 10 Wochen alten Mäusen wurden das Diaphragma und die Hinterbeinmuskulatur entsprechend der Vorgehensweise in Kapitel 2.7.1.2 isoliert (Abbildung 3, D und E). Die Zellisolation und Kulturbedingungen waren partiell vergleichbar mit den Arbeitsschritten zur Isolation embryonaler Skelettmuskelzellen. Wichtige Änderungen der Methode waren:

1. Eine Verlängerung der enzymatischen Dissoziationsschritte aufgrund des festen Skelettmuskelgewebes adulter Tiere (Kollagenase B (1 mg/ml) für 60 Min. bei 37 °C, Trypsin-EDTA für 20 Min. bei 37 °C).
2. Die Entfernung von grobem Zell-Debris durch Filtern mit einem feineren Zellfilter mit 40 µm Porengröße.
3. Beschichtung der Glasplättchen mit 0,1 % Gelatine reichte aus, um einen konfluenten Zellrasen zu erhalten, der sich weniger leicht ablöste als embryonale Skelettmuskelzellen.
4. Das Anwachsen der adulten Zellen benötigte ca. 48 Std. (also 24 Std. länger als bei embryonalen Zellen).
5. Ein Überwachsen der Skelettmuskelzellen mit proliferierenden Fibroblasten verhinderte die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C (10 µg/ml für 2 Std.) an Tag 8 nach Isolation. In Kultur zeigten die Zellen nach dieser Behandlung eine schnellere Differenzierung zu elongierten Myotuben, die schon ab Tag 3 nach Isolation ausgebildet wurden und ab Tag 5 bis 6 zu schlagen begannen (Abbildung 3, F).

3.1.3 Genetische Modifikation von Skelettmuskelzellen

Skelettmuskelzellen können, da sie im differenzierten Zustand kein Cx exprimieren, nicht elektrisch miteinander koppeln (vgl. Abschnitt 1.5.1). Daher wurden die Zellen durch lentivirale Transduktion genetisch zur Expression von Cx43 modifiziert, um eine solche Kopplung zu ermöglichen.

Es wurden 2 verschiedene Konstrukte vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Bonn generiert (Abbildung 4, A).

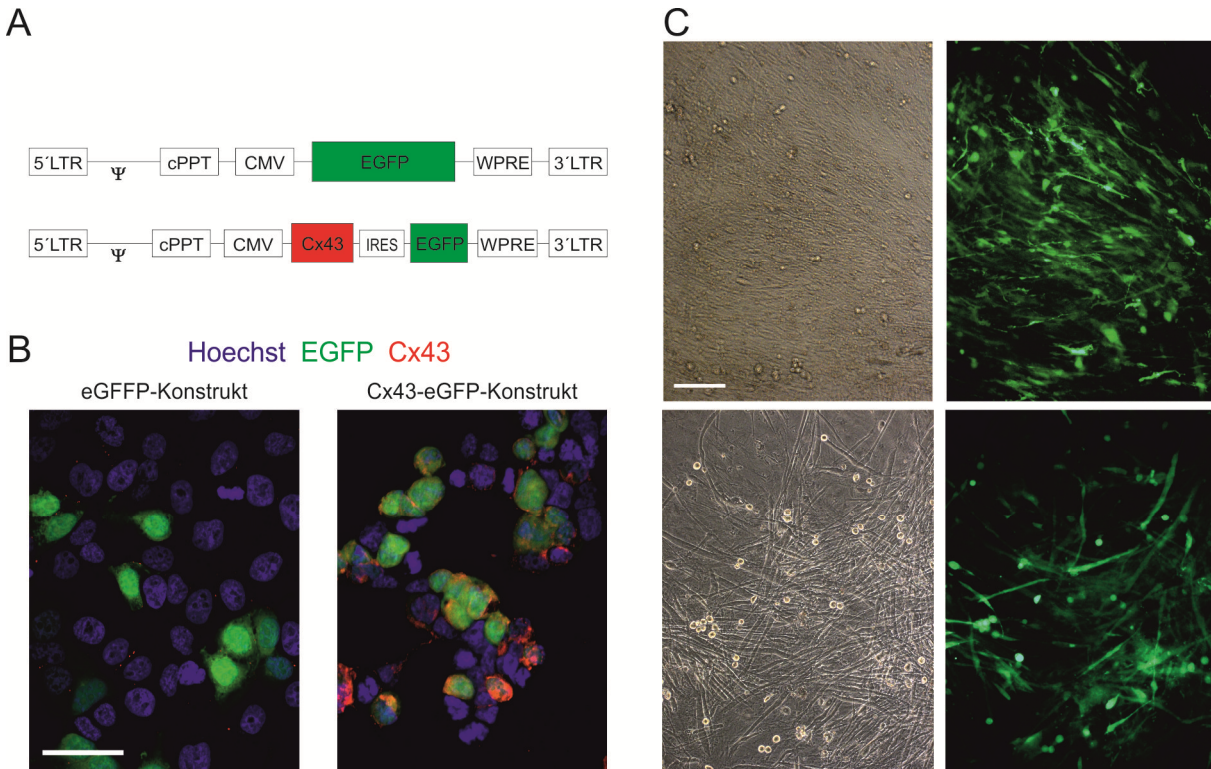


Abbildung 4: Etablierung und Test der lentiviralen Cx43-Konstrukte

(A) zeigt die verwendeten lentiviralen Konstrukte mit CMV-Promotor, Verpackungssignal Ψ , dem cPPT-Element zur Steigerung der nukleären Translokation und einem WPRE-Element, um die mRNA-Stabilität zu erhöhen. Das Kontrollkonstrukt (A, oben) kodiert nur das grüne Fluoreszenzprotein eGFP. Das zweite Konstrukt kodiert für Cx43 und über eine Intraribosomale-Eintrittsstelle (IRES) gekoppelt eGFP als Fluoreszenzmarker (A, unten). Immunfluoreszenzfärbungen in (B) zeigen HEK-Zellen, die mit den Konstrukten behandelt wurden. Der Kontrollvektor (links) führt zu deutlicher nativer eGFP-Fluoreszenz, ohne dass Cx43 nachweisbar war. Zellen die mit dem Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt behandelt wurden, exprimieren sowohl Cx43 als auch eGFP. Jede eGFP-positive Zelle war auch Cx43-positiv (rechts). Abbildung (C) zeigt Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von nicht fixierten Skelettmuskelzellen mit dem eGFP-Kontrollkonstrukt, mit deutlicher nativer Fluoreszenz. Obere Reihe: embryonale Zellen 7 Tage nach Isolation und Transduktion. Untere Reihe: adulte Zellen 14 Tage nach Gewinnung und viraler Behandlung. Maßstabsbalken: 50 μm (B); 200 μm (C).

Als Promotor diente in beiden Vektoren der ubiquitär-aktive Zytomegalievirus-Promotor (CMV). Das Kontrollkonstrukt (CMV-eGFP-Konstrukt) induzierte ausschließlich die Expression des grünen Fluoreszenzproteins eGFP und sollte zu keiner funktionellen Änderung der behandelten Zellen führen.

Durch das zweite Konstrukt (CMV-Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt) wurde das Kopplungsprotein Cx43 in Skelettmuskelzellen eingebracht, sowie über eine Intra-ribosomale Eintrittsstelle (IRES) das Fluoreszenzprotein eGFP. Diese Co-Expression des Kopplungsproteins mit dem Fluoreszenz-Marker erlaubte es, die erfolgreiche Transduktion an lebenden Zellen nachzuweisen.

Eine Austestung der oben genannten Konstrukte fand zunächst durch nicht-virale Transfektion von HEK-Zellen statt, die anschließend mittels Immunfärbungen analysiert wurden (Abbildung 4, B).

Das eGFP-Kontrollkonstrukt führte zu einer deutlichen Fluoreszenz der HEK-Zellen, ohne dass Cx43 exprimiert wurde. Die HEK-Zellen, die mit dem Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt behandelt wurden, waren Cx43- und eGFP-positiv. Zu beachten ist, dass jede eGFP-positve Zelle auch Cx43-positiv war (Abbildung 4, B). Allerdings zeigte nicht jede Cx43-positve Zelle eGFP-Fluoreszenz. Das erniedrigte Expressionsniveau von eGFP ist durch die Verwendung des IRES-Verbindungsstückes zu erklären, welches zu einer um den Faktor 2-3 x schwächeren Expression des zweiten, gekoppelten Genes (in diesem Fall eGFP) führt (Goedhart et al., 2011). Anschließend wurden Lentiviren generiert (Abbildung 4, A) und diese durch Transduktion in primäre, embryonale oder adulte Skelettmuskelzellen eingebracht. Hierfür wurden die Zellen direkt nach der Präparation mit den entsprechenden Viren über Nacht inkubiert. Der lentivirale Überstand wurde dann bei embryonalen Skelettmuskelzellen, nach 24 und bei adulten Skelettmuskelzellen nach 48 Std. entfernt. Die längere Behandlung der adulten Zellen ergab sich aus dem langsameren Anwachsen dieser Zellen in der Kulturschale (siehe Abschnitt 3.1.2). 48 Std. nach der viralen Behandlung war eine erfolgreiche Transduktion sowohl mit dem Kontroll-Konstrukt als auch mit dem Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt anhand der Expression des grünen Fluoreszenzproteins der nativen Zellen erkennbar.

Um eine effektive Transduktionsrate der Zellen zu erreichen, wurden verschiedene Viruskonzentrationen anhand der nativen eGFP-Fluoreszenz ausgewertet. Niedrige Viruskonzentrationen von 5 bzw. 10 infektiösen Partikeln pro Zelle (multiplicity of infection/MOI) resultierten in einer niedrigen Transduktionsrate. Hohe Konzentrationen von MOI = 50 und 100 führten zu Absterben und Ablösen der Zellen. Eine effektive Transduktion konnte mit einer Viruskonzentration von MOI = 25 erreicht werden (Abbildung 4, C). Die vitalen Zellen zeigten sich bei dieser MOI weder im Wachstum

noch in der Differenzierung beeinträchtigt. Auch morphologisch war kein Unterschied zu genetisch unveränderten Zellen zu erkennen. Mittels der beschriebenen lentiviralen Konstrukte ließen sich also sowohl embryonale als auch adulte Myoblasten erfolgreich transduzieren. Die grüne Fluoreszenz des eGFP blieb über die Differenzierung der Myoblasten zu Myotuben hin erhalten (Abbildung 4, C).

Die Effizienz der lentiviralen Transduktion mit den verwendeten Konstrukten wurde anhand von Fluoreszenz-Aufnahmen von embryonalen Skelettmuskelzellen 3 Tage nach viraler Behandlung mit Cx43-IRES-eGFP- bzw. eGFP-Kontrollkonstrukt und nicht transduzierten Zellen quantifiziert. Aus Übersichtsaufnahmen wurden 20 zufällig ausgewählte, gleichgroße Gesichtsfelder pro Gruppe geblindet analysiert und der prozentuale Anteil eGFP-positiver Zellen bestimmt. Für das Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt ergab sich ein Anteil transduzierter Zellen von 12 % (von 1080 analysierten Zellen). Von den Zellen die mit dem eGFP-Kontrollkonstrukt behandelt wurden, zeigten 20 % eGFP-Fluoreszenz (von 489 ausgezählten Zellen).

3.1.4 Nachweis der erfolgreichen Transduktion von Skelettmuskelzellen

Der Nachweis der erfolgreichen Transduktion sowohl von embryonalen als auch von adulten Skelettmuskelzellen erfolgte zunächst durch die native eGFP-Fluoreszenz der Zellen. Mittels Immunfluoreszenz-Färbungen, wie unter Abschnitt 2.7.2 beschrieben, konnte zusätzlich das lentiviral eingebrachte Cx43 nachgewiesen werden (Abbildung 5). In embryonalen Skelettmuskelzellen zeigte sich eine membranständige Cx43-Färbung, die mit der eGFP-Fluoreszenz kolokalisiert war (Abbildung 5, A). Jede Zelle mit eGFP-Fluoreszenz war positiv für Cx43, aber nicht bei jeder Cx43-exprimierenden Zelle ließ sich eGFP-Fluoreszenz finden. Eine Erklärung dafür ist das in Abschnitt 3.1.3 beschriebene, unterschiedliche Expressionsniveau der durch das IRES-Konstrukt gekoppelten Gene. Anhand der Morphologie und durch die unten beschriebenen Färbungen gegen skelettmuskelspezifische Antigene konnte ein Großteil der transduzierten Zellen eindeutig als Myozyten identifiziert werden.

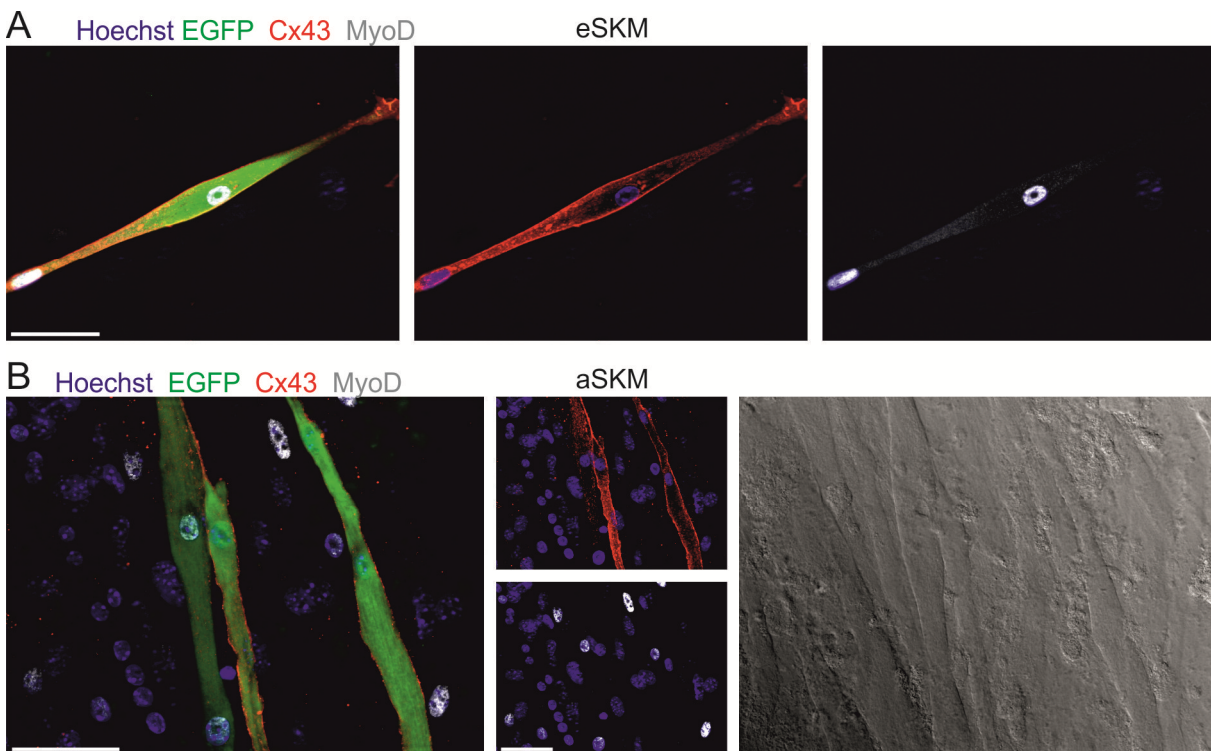


Abbildung 5: Immunfluoreszenzfärbungen von primären Skelettmuskelzellen
Viral transduzierte Skelettmuskelzellen aus embryonalen (A) und adulten (B) Tieren bilden elongierte Myotuben, erkennbar auch in Transmissionslichtaufnahmen (B rechtes Bild). Native eGFP-Fluoreszenz (grün) zeigt viral transduzierte Zellen an und korreliert mit Färbungen gegen Cx43 (rot). Immunhistologische Färbungen gegen den Muskelmarker MyoD (weiß) zeigen den Differenzierungsgrad der Zellen. Zellkerne sind mit Hoechst (blau) gefärbt. Färbungen an Tag 11 nach Isolation. Maßstabsbalken: 50 μ m.

In adulten Skelettmuskelzellen zeigten sich ähnliche Ergebnisse: Sämtliche eGFP-positiven Zellen wiesen eine membranständige Cx43-Färbung auf (Abbildung 5, B). Weiterhin fiel auf, dass die Intensität der eGFP-Fluoreszenz mit der Stärke der Cx43-Expression korrelierte, in stark eGFP-positiven Zellen ließ sich also auch eine deutlichere Cx43-Färbung nachweisen.

Über eine mögliche Kopplung der Zellen durch das lentiviral eingebrachte Cx43 ließ sich in Immunfluoreszenzfärbungen keine genaue Aussage treffen, allerdings suggerierte die Lage der beiden eGFP- und Cx43-positiven Myotuben in Abbildung 5, B eine Kopplung durch Gap Junctions miteinander.

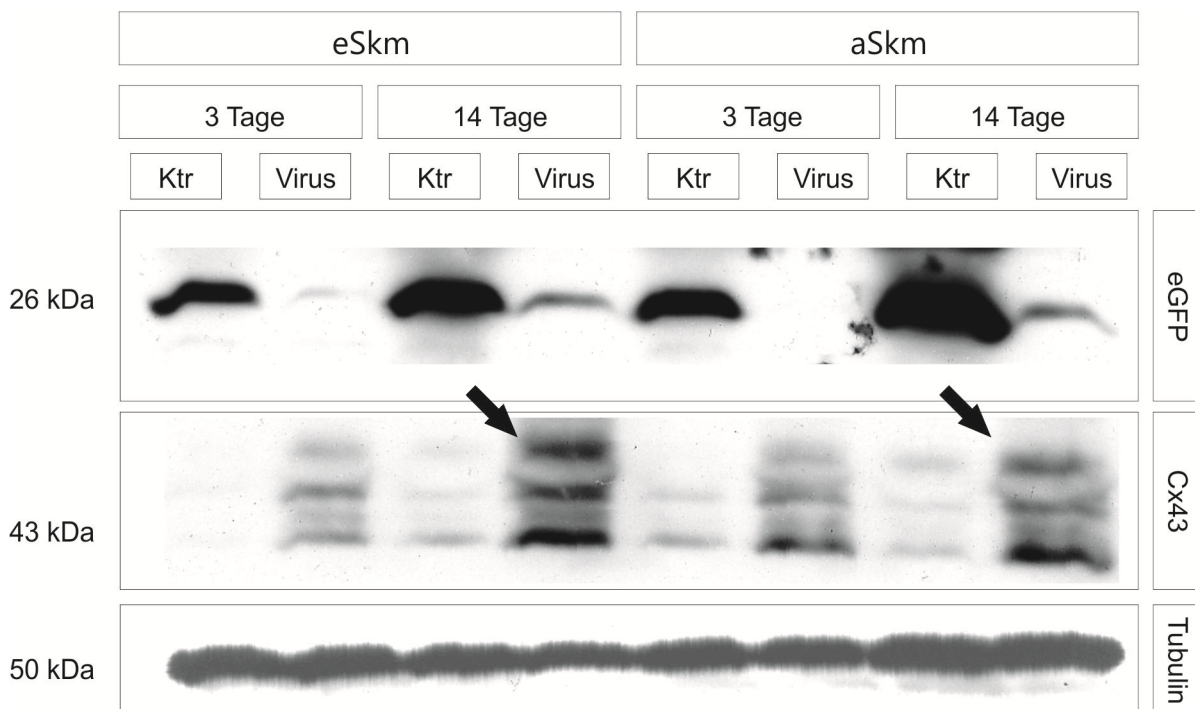


Abbildung 6: Immunoblot-Analyse lentiviral transduzierter Skelettmuskelzellen

Lysate von embryonalen (eSkM) und adulten (aSkM) Skelettmuskelzellen zu verschiedenen Zeitpunkten (3 und 14 Tage) nach lentiviraler Transduktion mit Cx43-IRES-eGFP-Virus (Virus). Kontrolle (Ktr): Skelettmuskelzellen, die mit dem eGFP-Virus transduziert wurden. Tubulin, ein Haushaltsgen, diente als interne Kontrolle. Pfeile markieren die phosphorylierten Banden P1, die für einen funktionellen Einbau des Cx43 in die Zellmembran stehen.

Zur weiteren Bewertung der Expression auf Protein-Ebene wurde eine Immunoblot-Analyse (Westernblot) von transduzierten Zellen aus embryonalen und aus adulten Tieren durchgeführt (Abbildung 6). Die Zellen wurden mit dem Cx43-IRES-eGFP Konstrukt transduziert. Als Kontrolle dienten Skelettmuskelzellen, die mit dem eGFP-Virus transduziert wurden. 3 und 14 Tage nach lentiviraler Transduktion wurden Proteinextrakte aus den transduzierten Zellen gewonnen. Diese wurden, wie unter Abschnitt 2.7.4 beschrieben, elektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mittels Antikörpern markiert. Die Immunoblot-Analyse wurde von Mitarbeitern des Instituts für Genetik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Im Westernblot zeigte sich bei den mit dem Cx43-Konstrukt behandelten Zellen eine deutliche, für das Kopplungsprotein charakteristische und namensgebende, Protein-Bande bei 43 kDa. Anhand der Banden ließen sich die verschiedenen Phosphorylierungsstadien des Cx43 identifizieren und somit funktionelle Protein-Synthese und Einbau des

Connexins in die Zellmembran belegen (Abbildung 6). Die Expression von eGFP war mit einer Protein-Bande bei 26 kDa ebenfalls durch Antikörper darstellbar. Sie war in den Kontroll-Zellen entsprechend der stärkeren Expression ohne IRES-Verbindungsstück des eGFP-Virus deutlich intensiver. Als interne Kontrolle diente das Haushaltsgen Tubulin. Diese Ergebnisse waren in embryonalen und in adulten Skelettmuskelzellen konsistent.

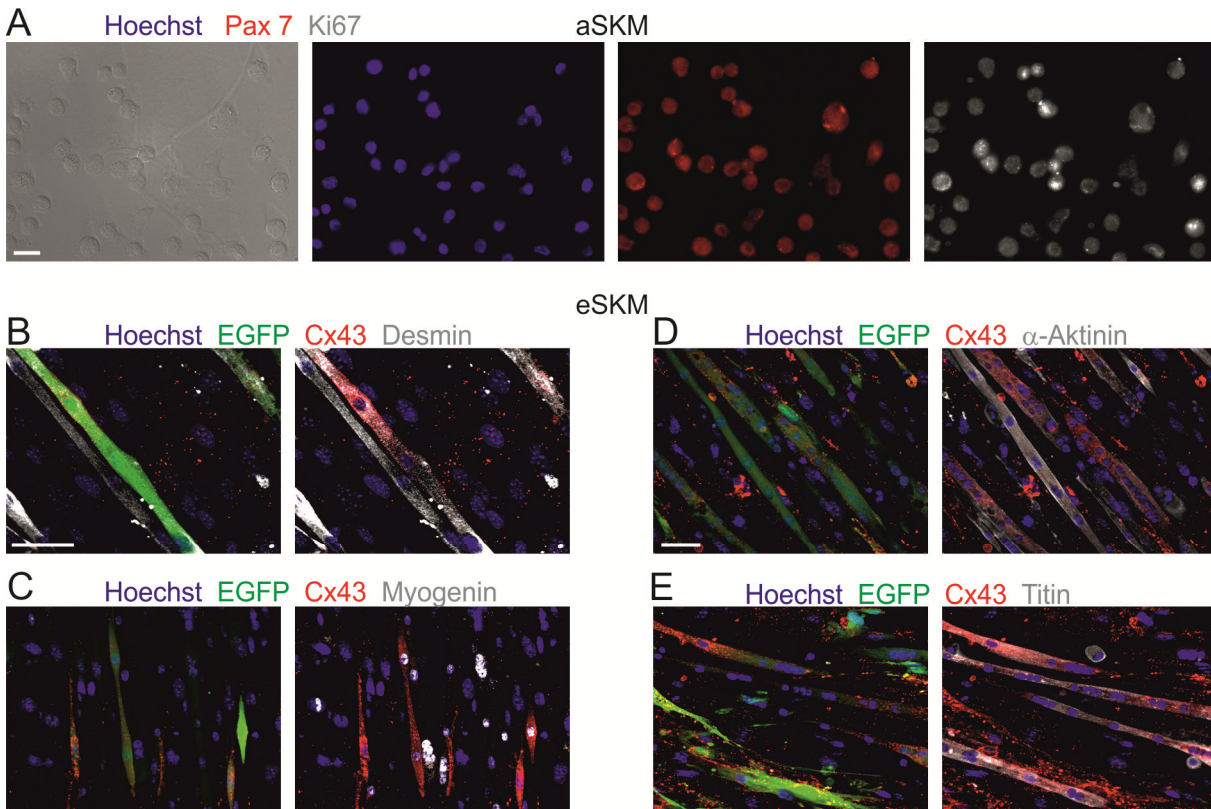


Abbildung 7: Differenzierung von transduzierten Skelettmuskelzellen

(A) Murine Myoblasten 3 Tage nach Isolation aus adulten Tieren. Satellitenzellen identifiziert durch Färbungen gegen Pax7 (rot). Der Proliferationsmarker Ki67 (weiß) zeigt proliferierende Zellen. Zellkerne mit Hoechst (blau) gefärbt.

(B bis E) Viral transduzierte Skelettmuskelzellen aus embryonalen Tieren bilden elongierte Myotuben. Native eGFP Fluoreszenz (grün) zeigt viral transduzierte Zellen an und korreliert mit Färbungen gegen Cx43 (rot). Immunhistologische Färbungen gegen verschiedene Muskelmarker (weiß; Desmin in B; Myogenin in C; α -Aktinin in D; Titin in E) belegen den fortgeschrittenen Differenzierungsgrad der Zellen. Zellkerne mit Hoechst (blau) angefärbt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Isolation gefärbt: 5 Tage B; 19 Tage C, D, E. Maßstabsbalken: 20 μ m (A); 50 μ m (B, C, D, E).

Die Differenzierung der viral transduzierten, embryonalen und adulten Zellen wurde mit Immunfluoreszenz-Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Isolation untersucht. 3 Tage nach Isolation ließen sich die Zellen mittels Pax7, einem Marker für Satellitenzel-

len der Skelettmuskulatur, anfärben. Parallele Färbungen für den Proliferationsmarker Ki67 ließen proliferierende Skelettmuskeln erkennen (Abbildung 7, A). Färbungen von MyoD (Myogener Faktor 3, Transkriptionsfaktor in Muskelzellen) zeigten die weitere Differenzierung in proliferierende Myoblasten (Abbildung 5, A und B). Darüber hinaus wurde Desmin als Marker für fortgeschritten differenzierte Myoblasten gefärbt (Abbildung 7, B). Die Zellen entwickelten sich weiter zu mononukleären Myozyten und ließen sich mit Myogenin (Myogenem Faktor 4, ebenfalls ein muskulärer Transkriptionsfaktor) (Abbildung 7, C) anfärben. Die muskulären Strukturproteine des kontraktile Apparates α -Aktinin und Titin bewiesen die Differenzierung in kontraktionsfähige Myotuben (Abbildung 7, D und E).

Die spontane, kontraktile Aktivität der Zellen setzte bei embryonalen Skelettmuskelzellen an Tag 4 und bei adulten Skelettmuskelzellen an Tag 6 nach Isolation ein und war ein deutliches Zeichen funktioneller Differenzierung. Die eingebrachten Konstrukte behinderten die Ausreifung der Skelettmuskelzellen *in vitro* nicht.

3.2 Kopplungsnachweis *in vitro*

3.2.1 Prinzip und Anwendung der lokalen Einzelzellelektroporation

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde eine neue Methode zur lokalen Einzelzellelektroporation erstmals etabliert. Diese ermöglicht, im Vergleich zu den unter Abschnitt 1.5.3 beschriebenen Methoden, das schonende, gezielte Einbringen von Substanzen in einzelne Zellen, ohne deren Überleben zu gefährden. So ist es möglich, die behandelten Zellen über einen längeren Zeitraum, zum Beispiel für Genexpressionsexperimente, weiter zu kultivieren und zu beobachten.

Das Prinzip der lokalen Einzelzellelektroporation ist in Abbildung 8 dargestellt. Dabei wird eine scharfe Glas-Mikroelektrode mit den einzubringenden Substanzen gefüllt und der Zelle angenähert ohne die Zellmembran zu verletzen. Der Abstand der Elektroden spitze wurde mittels Hellfeld-Mikroskopie und dem elektrischen Widerstand der Elektrode bestimmt. Der Widerstand in der freien Flüssigkeit betrug 80-90 M Ω und stieg bei Annäherung an die Zelle auf 140-190 M Ω . Daraufhin wurde ein Strom aus alternierenden Rechteckpulsen mit einer Amplitude von +/-20 nA, einer Phasenlänge von 5 ms und einer Pulslänge von 2,5 ms angelegt, resultierend in einer Frequenz von 200 Hz. Durch

diese Wechselfspannung wurde die Zellmembran lokal permeabilisiert und die gewünschte Substanz konnte durch Iontophorese in die Zelle eingebracht werden.

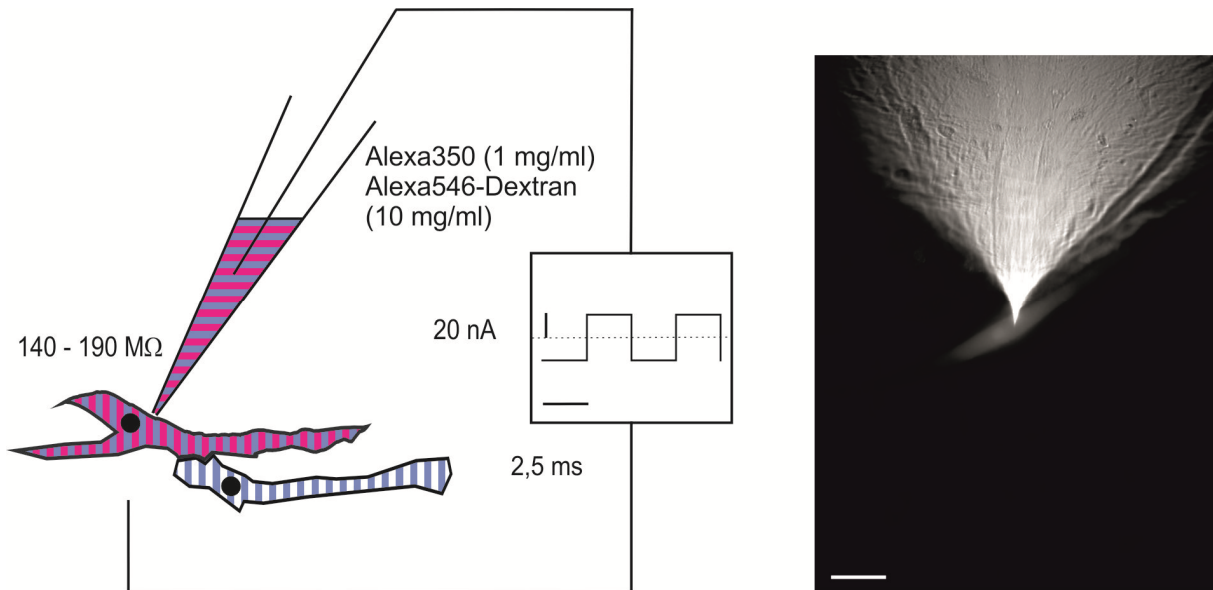


Abbildung 8: Prinzip der lokalen Einzelzellelektroporation

Links: schematische Darstellung der lokalen Einzelzellelektroporation: Scharfe Elektroden wurden mit Intrazellulär-Lösung und zwei verschiedenen Farbstoffen gefüllt. Blau: Alexa350 (345 Da; 1 mg/ml, Cx43-permeabel); Rot: Alexa546-Dextran (10 kDa, 10 mg/ml, nicht Cx43-permeabel). Die Spitze der Farbstoff-gefüllten Elektrode wurde der Zelle angenähert und die Zellmembran mit alternierenden Rechteckpulsen von 200 Hz und einer Amplitude von +/- 20 nA permeabilisiert. Rechts: Beispielhafte Darstellung eines selektiven Ladevorgangs von einer Zelle. Maßstabsbalken: 100 µm.

Für die Farbstofftransferexperimente zum Nachweis funktioneller Kopplung wurde die Glas-Mikroelektrode mit zwei verschiedenen Farbstoffen in Intrazellulär-Lösung gefüllt (Zusammensetzung: siehe Abschnitt 2.3.1): Alexa350 (blau) in einer Konzentration von 1 mg/ml und Alexa546-Dextran (rot) in einer Konzentration von 10 mg/ml (siehe Abbildung 8).

Beide Farbstoffe wurden nach Permeabilisieren der Zellwand durch Iontophorese in die Zelle eingebracht und anschließend wurde die Ausbreitung der Farbstoffe mit Licht der entsprechenden Wellenlänge (Alexa350: 360 nm; Alexa546-Dextran: 544 nm, Transmissionslicht: Infrarot-Spektrum) untersucht. Aufnahmen wurden direkt nach der Elektroporation (0 Min.) und im Abstand von 5 - 15 Min. gemacht.

Der blaue Farbstoff Alexa350 ist Cx43-permeabel und sollte von der geladenen Zelle durch die Cx43-Kanäle in andere eGFP-positive (und damit Cx43-exprimierende) Zellen diffundieren. Der Dextran-gekoppelte, nicht Cx43-permeable, rote Farbstoff diente als

Kontrolle. Mit einer Größe von 10 kDa kann dieser nicht durch Cx43-Kanäle (durchgängig bis max. 1 kDa) diffundieren und sollte nicht in andere Zellen permeieren, sondern ausschließlich in der selektiv, mit beiden Farbstoffen beladenen Zelle verbleiben. Auf diese Weise wurde das Vorhandensein von zytoplasmatischen Brücken oder Zellfusionen ausgeschlossen. Bei einem erfolgreichen Farbstofftransfer fluoreszierte also die elektroporierte Zelle sowohl im blauen, als auch im roten Licht, wohin gegen die gekoppelte Zelle nur im blauen Licht zu erkennen war.

3.2.2 Kopplungsnachweis *in vitro* mittels lokaler Einzelzellelektroporation

3.2.2.1 Embryonale Kardiomyozyten

Zur Evaluation der Methode der lokalen Einzelzellelektroporation wurde der Kopplungsnachweis an embryonalen Kardiomyozyten erbracht. Diese exprimieren endogen, das heißt genetisch unverändert, Cx43 und koppeln darüber elektrisch untereinander.

In exemplarisch durchgeführten Farbstofftransferexperimenten (n=2) zeigte sich nach Laden der Zellen mit Alexa350 (Konzentration von 1 mg/ml) und Alexa546-Dextran (Konzentration von 10 mg/ml) (Abbildung 9, A-C, Pfeil) ein diffuser Transfer des Cx43-gängigen Alexa350 in mehrere benachbarte Zellen (Abbildung 9, A-C, Pfeilspitzen), was einer guten Kopplung zwischen den Kardiomyozyten durch Cx-Kanäle entspricht. Der rote Kontrollfarbstoff zeigte, auch nach 30 Min., keinerlei Transfer in benachbarte Zellen (Abbildung 9, B).

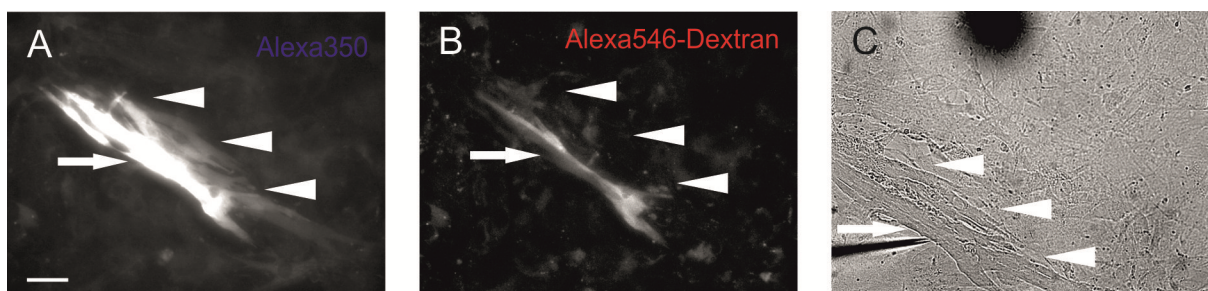


Abbildung 9: Kopplungsnachweis mittels lokaler Einzelzellelektroporation in embryonalen Herzmuskelzellen

Farbstofftransferexperimente in genetisch nicht veränderten, embryonalen Kardiomyozyten. (A) Blauer Farbstoff Alexa350 (Cx43-permeabel), der von der geladenen Zelle (Pfeil) in mehrere benachbarte Zellen (Pfeilköpfe) diffundiert. (B) Rotes Alexa546-Dextran (nicht Cx43-permeabel), welches nur in der geladenen Zelle zu sehen ist. Transmissionsaufnahme (C) zeigt einen leicht verschobenen Bildausschnitt, der Farbstofftransfer scheint zwischen allen benachbarten Zellen stattzufinden. Maßstabsbalken: 100 µm.

3.2.2.2 Skelettmuskelzellen

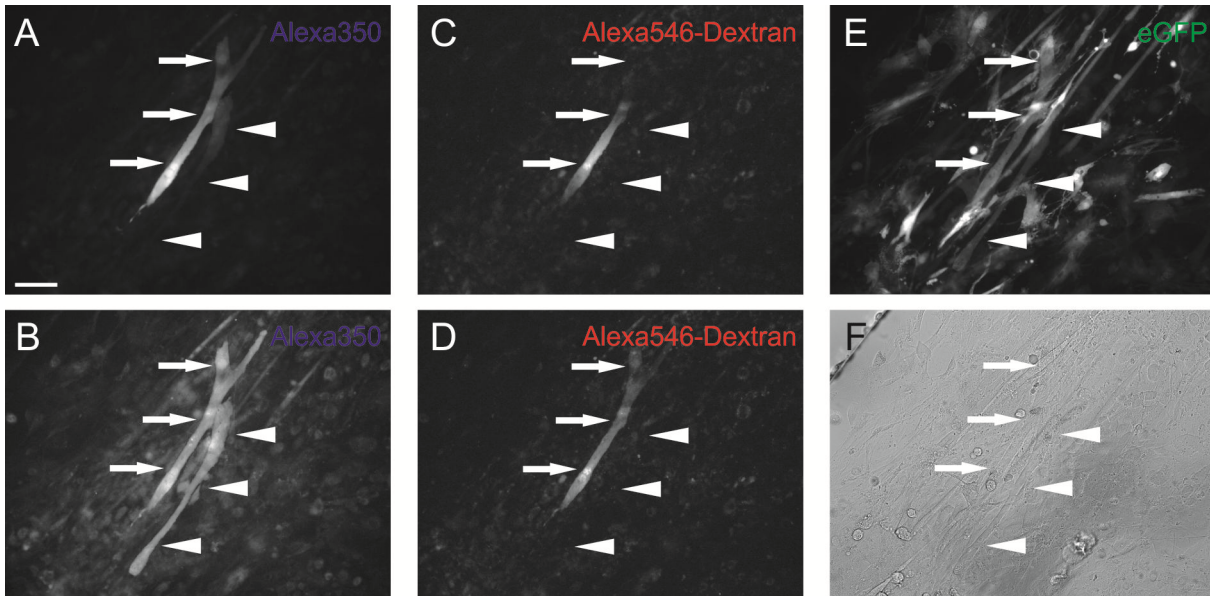


Abbildung 10: Funktionelle Kopplung in embryonalen Skelettmuskelzellen durch Cx43 Farbstofftransfereperimente an embryonalen Skelettmuskelzellen, transduziert mit dem Cx43-IRES-eGFP-Virus. Linke Spalte (**A** und **B**) blaues Alexa350 (Cx43-permeabel). Mittlere Spalte (**C** und **D**) roter Kontrollfarbstoff Alexa546-Dextran (nicht Cx43-permeabel). Obere Bilder (**A**, **C**) mit beiden Farbstoffen geladene Skelettmuskelzelle kurz nach dem Ladevorgang (Pfeile). Untere Bilder (**B** und **D**) Farbstofftransfer in benachbarte Myotube nur von Alexa350 (**B**, Pfeilspitzen), Kontrollfarbstoff (**D**) verbleibt in der geladenen Zelle. Die Bilder wurden 16 Minuten nach dem Ladevorgang aufgenommen. Im eGFP-Kanal (**E**) sind beide Zellen eGFP-positiv. Durchlichtbild (**F**) zeigt viele benachbarte Myotuben, die nicht eGFP-positiv sind. Ein Farbstofftransfer in eGFP-negative Tuben wurde niemals beobachtet. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Die lokale Einzelzellelektroporation wurde im Folgenden genutzt, um selektive Farbstofftransfer-Experimente an transduzierten, embryonalen und adulten Skelettmuskeln durchzuführen und so die funktionelle Kopplung durch lentiviral eingebrachtes Cx43 zu beweisen. Die Isolation der Zellen erfolgte, wie unter Abschnitt 2.7.1.1 beschrieben, gefolgt von viraler Transduktion mit dem CMV-Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt. Die Skelettmuskelzellen wurden auf den beschichteten Glasplättchen aus der 24-Lochplatte entnommen, in einen Objektträger überführt und mit Tyrode-Lösung beschichtet. In dieser Lösung konnten die Zellen bei Raumtemperatur mindestens 2 Std. überleben. Im Transmissionslicht wurden zunächst adäquate Zellen nach ihrer Morphologie (elongierte Myotuben, parallel zueinander) ausgewählt. Die Untersuchungen erfolgten an embryonalen und adulten Skelettmuskelzellen im Myotuben-Stadium (ab Tag 7 nach Isolation). Es erfolgte eine gezielte Elektroporation von eGFP-positiven Myotuben.

In embryonalen, transduzierten Skelettmuskelzellen konnte durch erfolgreichen Farbstofftransfer eine funktionelle Kopplung über lentiviral eingebrachtes Cx43 bewiesen werden. Abbildung 10 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die mit Pfeilen markierte, eGFP-positive Zelle (Abbildung 10, E) wurde mit beiden Farbstoffen geladen (Abbildung 10, A und C). Innerhalb von 1-2 Min. diffundierte der Cx43-permeable, blaue Farbstoff Alexa350 in eine benachbarte, ebenfalls eGFP-positive Zelle (Abbildung 10, B Pfeilspitzen). Der Dextran-gekoppelte, rote Kontrollfarbstoff blieb in der geladenen Zelle und diffundierte nicht durch Cx43-Poren (Abbildung 10, D). Insgesamt ließ sich in 9 Experimenten an embryonalen Skelettmuskelzellen ein erfolgreicher Farbstofftransfer nachweisen, der immer nur in ebenfalls eGFP-positive und damit Cx43-exprimierende Zellen stattfand. Ein Farbstofftransfer in eGFP-negative Zellen wurde niemals in einem Experiment beobachtet (interne Negativ-Kontrolle), was darauf schließen lässt, dass die funktionelle Kopplung in Skelettmuskelzellen durch das lentiviral eingebrachte Cx43 stattfindet.

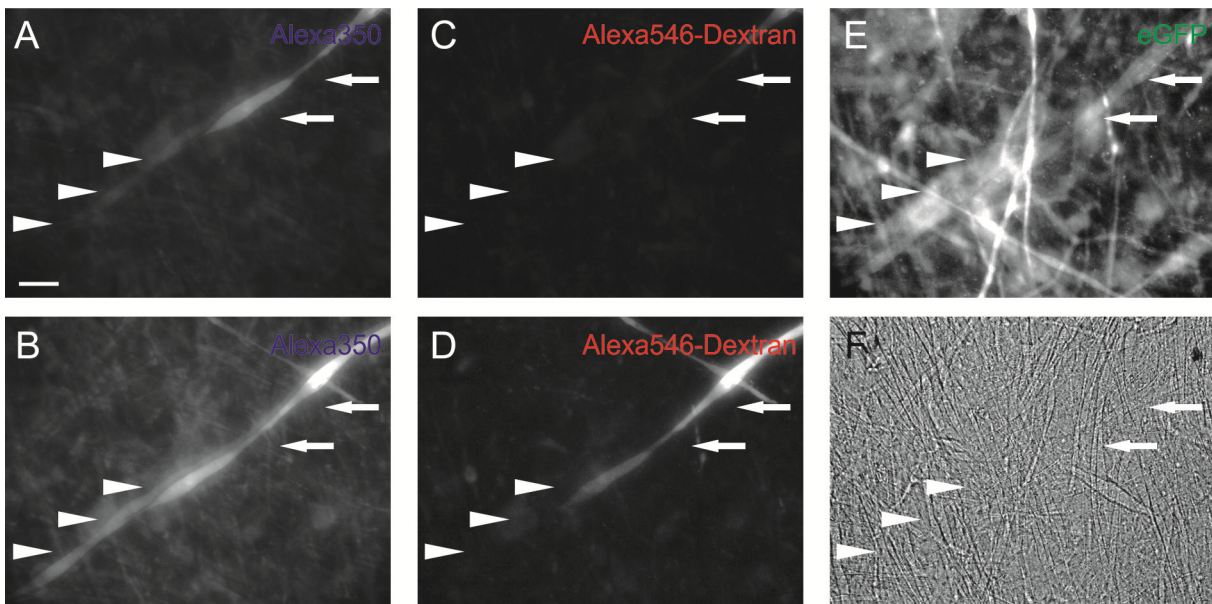


Abbildung 11: Funktionelle Kopplung in adulten Skelettmuskelzellen durch Cx43 Farbstofftransferexperimente an adulten Skelettmuskelzellen, transduziert mit dem Cx43-IRES-eGFP-Virus. (A) und (B) zeigen Alexa350, (C) und (D) Alexa546-Dextran. Mit Pfeilen markierte Myotube wurde mit beiden Farbstoffen geladen (A und C kurz nach dem Ladevorgang). Der blaue Farbstoff diffundiert in eine benachbarte Zelle, die sich nicht mit dem Kontrollfarbstoff füllt (B und D, 16 Minuten nach Ladevorgang, Pfeilspitzen). (E) zeigt im eGFP-Kanal, dass beide Zellen das Fluoreszenzprotein exprimieren. Das Sichtfeld ist in B, D, E und F leicht nach unten und links verschoben, um die Tube, in die der Farbstofftransfer stattfindet, besser darzustellen. Durchlichtbild (F) zeigt viele benachbarte Myotuben, die nicht eGFP-positiv sind. Maßstabsbalken: 100 µm.

In adulten Skelettmuskelzellen konnte durch Einzelzellelektroporation mit anschließendem Farbstofftransfer ebenfalls eine funktionelle Kopplung durch lentiviral eingebrachtes Cx43 nachgewiesen werden (n=19). In Abbildung 11 ist ein repräsentativer Experimentverlauf dargestellt. Die mit Pfeilen markierte eGFP-positive Skelettmuskelzelle (Abbildung 11, E) wurde mit beiden Farbstoffen geladen (Abbildung 11, A und C). Der blaue Farbstoff Alexa350 diffundierte nach wenigen Min. in eine angrenzende Myotube, die ebenfalls eGFP exprimierte (Abbildung 11, B, Pfeilspitzen). Der rote Kontrollfarbstoff Alexa546-Dextran verblieb hingegen in der geladenen Zelle (Abbildung 11, D). Ein erfolgreicher Farbstofftransfer in lentiviral transduzierten adulten Skelettmuskelzellen ließ sich in 19 Experimenten nachweisen. In keinem Experiment an primären Skelettmuskelzellen aus adulten Tieren wurde ein Farbstofftransfer in Zellen beobachtet, die eGFP-negativ waren, also kein Cx43 exprimierten. Mit diesen Versuchen wurde die funktionelle Kopplung durch lentiviral eingebrachtes Cx43 in embryonalen und adulten Skelettmuskelzellen nachgewiesen.

3.2.2.3 Fibroblasten

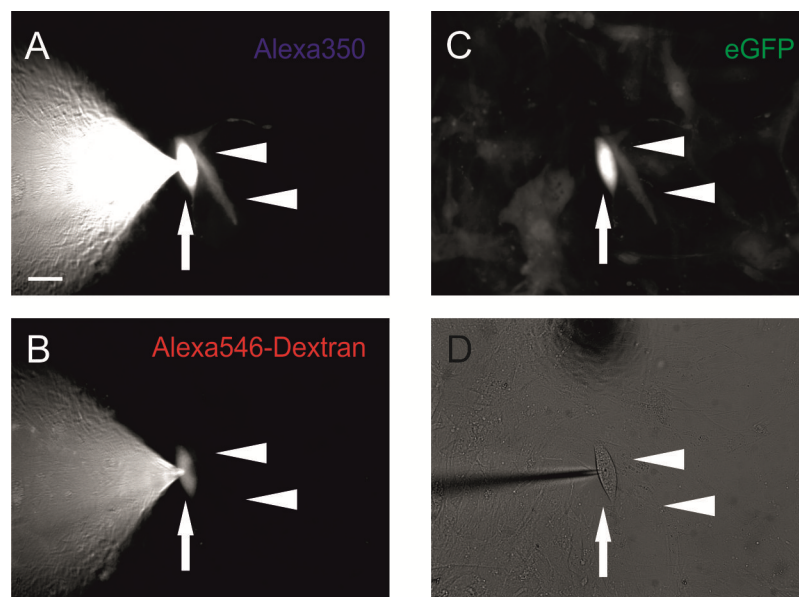


Abbildung 12: Lokale Einzelzellelektroporation in Fibroblasten zum Kopplungsnachweis Farbstofftransferexperimente an Fibroblasten, die mit dem Cx43-IRES-eGFP-Virus transduziert wurden. Der mit einem Pfeil markierte Fibroblast wurde geladen und zeigt sich im blauen Alexa350-Kanal (**A**) und im roten Alexa546-Dextran-Kanal (**B**). In **A** erkennt man einen Farbstofftransfer in einen benachbarten Fibroblasten (Pfeilspitzen), der in **B** 10 Minuten nach Ladevorgang nicht zu sehen ist. Beide Zellen sind eGFP-positiv (**C**). (**D**) Durchlichtbild. Maßstabsbalken: 100 μ m.

Des Weiteren wurden exemplarische Farbstofftransfer-Experimente in Fibroblasten durchgeführt (Abbildung 12, A-D). Die Zellen wurden ebenfalls mit dem Cx43-IRES-eGFP-Virus transduziert und wie oben beschrieben mit den beiden Farbstoffen, Alexa350 (Konzentration von 1 mg/ml) und Alexa546-Dextran (Konzentration von 10 mg/ml), geladen. In diesen Experimenten (2 biologische Replikate und 7 untersuchte Zellen) zeigte sich ebenfalls ein Farbstofftransfer von Alexa350 in eine benachbarte, eGFP-positive Zelle (Pfeilspitzen) und keine Diffusion des Kontroll-Farbstoffes Alexa546-Dextran (Abbildung 12, B) (n=1). Daher kann man vermuten, dass eine funktionelle Kopplung auch in Fibroblasten, welche zum Beispiel zur Narbenbildung nach einem Herzinfarkt beitragen, über lentiviral eingebrachtes Cx43 möglich ist. Um diese These zu untermauern, sind weitere Experimente an dieser Zellpopulation nötig.

3.2.3 Anwendung der lokalen Einzelzellelektroporation zum Gentransfer

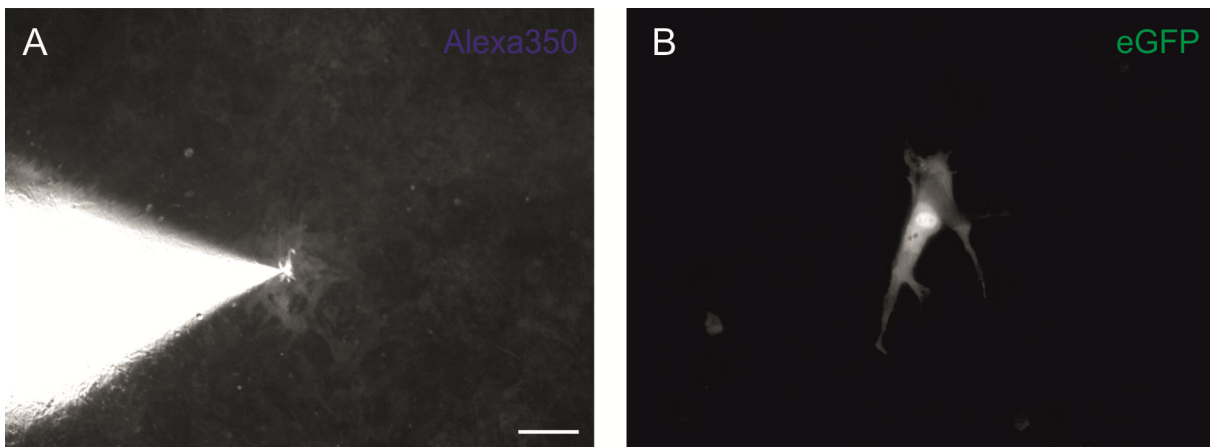


Abbildung 13: Gentransfer mittels lokaler Einzelzellelektroporation

(A) Ladevorgang der DNA-Lösung (50 ng/µl); Visualisierung mittels blauem Alexa350. (B) 48 Std. nach dem Beladen zeigte eine Zelle eGFP-Expression. Die in B gezeigte Zelle konnte neben den morphologischen Kriterien anhand spontaner kontraktile Aktivität als Kardiomyozyt identifiziert werden. Maßstabsbalken: 100 µm (A); 50 µm (B).

Die Methode der lokalen Einzelzellelektroporation kann auch verwendet werden, um örtlich-kontrollierte, genetische Modifikationen durch das Einbringen von DNA in einzelne Zellen zu ermöglichen.

In vorläufigen Experimenten wurden embryonale Kardiomyozyten aus spätembryonalen, genetisch unveränderten Mäusen verwendet. In diese sollte ein DNA-Plasmid eingebracht werden, um zu zeigen, dass einzelne Kardiomyozyten selektiv genetisch manipuliert werden können. Die embryonalen Kardiomyozyten wurden an Tag sechs nach Iso-

lation der lokalen Einzelzellelektroporation unterzogen. Eine Glas-Mikroelektrode wurde mit der einzubringenden DNA beladen. Das verwendete Plasmid kodierte für die DNA-Sequenz des grünen Fluoreszenzproteins eGFP unter Kontrolle des β -Aktin Promotors (CAG) und wurde mit einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l verwendet. Alexa350 (blau) in einer Konzentration von 1 mg/ml wurde als Markerfarbstoff, der die erfolgreiche Elektroporation der Zelle anzeigt, hinzugefügt (Abbildung 13). 48 Std. nach Elektroporation wurden die Kardiomyozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie auf eGFP-Fluoreszenz untersucht. Die blaue Fluoreszenz des Alexa350 war nach diesem Zeitraum nicht mehr nachweisbar. Insgesamt wurden ca. 70 Zellen erfolgreich mit dem Farbstoff-DNA-Gemisch geladen. In der Analyse konnte jedoch nur eine eGFP-positive Zelle nach 48 Std. auffindig gemacht werden. Dieser Kardiomyozyt zeigte, wie die umliegenden nativen Zellen, auch nach 48 Std. noch spontane Kontraktionen. Mit diesen Versuchen konnte, wenn auch mit niedriger Effizienz, die prinzipielle Möglichkeit des Gentransfers mittels der lokalen Einzelzellelektroporation gezeigt werden.

3.3 Verwendungen von Zellen aus anderen Spezies als Grundlage zum Großtiermodell

Als Zwischenschritt zur klinischen Anwendung am Menschen wurden Versuche an Zellen von Großtieren durchgeführt. Aus Muskelbiopsien von Schweinen, die eine dem menschlichen Herzen ähnliche Pumpfunktion haben, wurden Skelettmuskelzellen isoliert (siehe Abschnitt 2.7.1.4).

Myoblasten von Hunden, welche eine vergleichbare Elektrophysiologie zu humanen Kardiomyozyten aufweisen, wurden in Kultur untersucht. Diese Zellen wurden von der Abteilung für Pathologie und Labormedizin der Universität von North Carolina-Chapel Hill von D. A. Detwiler zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Skelettmuskelzellen aus Schweinen

Myoblasten aus Muskelbiopsien adulter Schweine wuchsen in Kultur als proliferierende Zellen aus den Zelltrümmern des Biopsiegewebes aus und formten einen Rasen, in dem sich nach 8 bis 10 Tagen elongierte Zellen bildeten (Abbildung 14, A und B). Anhand von Zellmorphologie und von Färbungen ließ sich prinzipiell zeigen, dass Myotuben aus Biopsien der Schweinemuskulatur gewonnen werden können. In diesen Zellen konnten

Vimentin, ein Intermediärfilament und unspezifischer Marker mesenchymaler Strukturen, sowie die muskelspezifischen Antigene Desmin und α -Aktinin angefärbt werden.

Ein Großteil (> 80 %) der kultivierten Zellen entsprach allerdings morphologisch Fibroblasten (Vimentin-positiv), die keine Muskelmarker exprimierten (Abbildung 14, C bis F).

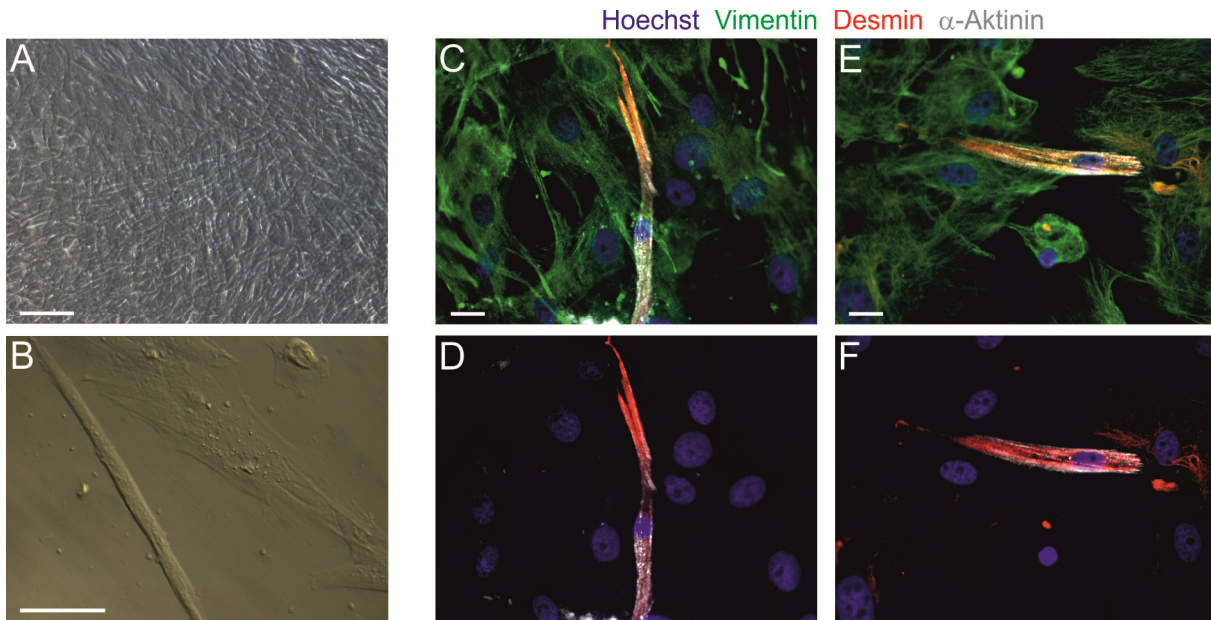


Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbungen von Skelettmuskelzellen aus Schweinen (A) und (B) Durchlichtmikroskopische Aufnahmen genetisch unveränderter, nicht fixierter Zellen aus Muskelbiopsien des Diaphragmas vom Schwein (20 Tage nach Präparation). (B) vergrößerte Aufnahme einer Myotube. (C-F) immunhistologische Färbungen der Skelettmuskelzellen 11 Tage nach Isolation. (C und D) Zellen aus Muskelbiopsien der Hinterbeinmuskulatur; (E und F) Zellen aus dem Diaphragma des Schweins. Angefärbt wurden Vimentin (Intermediärfilament, grün), Desmin (muskuläres Intermediärfilament, rot) und α -Aktinin (muskelspezifisches Strukturprotein, weiß). In blau sind Zellkerne dargestellt. Maßstabsbalken: 100 μ m (A.), 50 μ m (B.), 20 μ m (C-F).

3.3.2 Skelettmuskelzellen aus Hunden

Hunde-Zellen (von der Abteilung für Pathologie und Labormedizin der Universität von North Carolina-Chapel Hill von D. A. Detwiler zur Verfügung gestellt) wurden, wie in Abschnitt 2.7.1.5 beschrieben, kultiviert. Die Zellen bildeten 3 bis 4 Tage nach dem Aussäen einen konfluenten Zellrasen, in dem auch längliche Zellen zu finden waren, die in der Morphologie Myotuben ähnelten (Abbildung 15, A). Mittels der beschriebenen lentiviralen Konstrukte ließen sich die Zellen nach dem gleichen Protokoll wie adulte murine Zellen transduzieren und zeigten nach ~48 Std. eGFP-Expression (Abbildung 15, B).

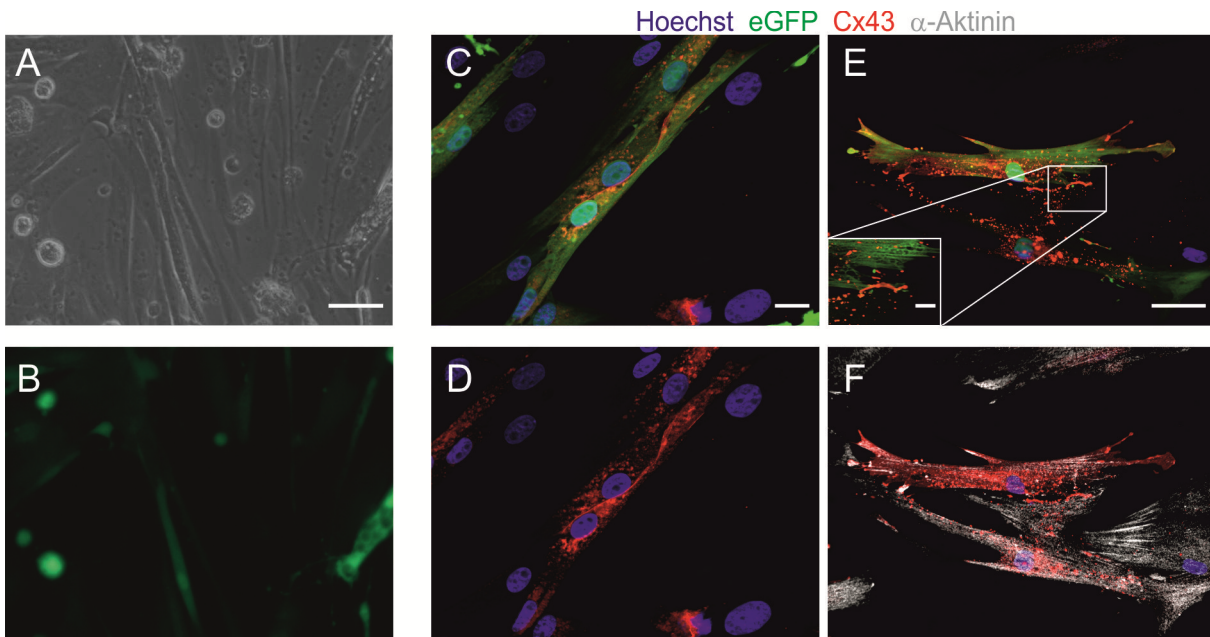


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbungen von Skelettmuskelzellen aus Hunden (A und B) Durchlicht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von nicht gefärbten, caninen Zellen 4 Tage nach lentiviraler Transduktion mit dem CMV-Cx43-IRES-eGFP-Virus. Anhand der nativen eGFP-Fluoreszenz ließen sich transduzierte Zellen erkennen. (C-F) immunhistologische Färbungen zeigen die Kolokalisation der nativen eGFP-Fluoreszenz (grün) mit Cx43 (rot). Färbungen gegen α -Aktinin sind weiß dargestellt. Der vergrößerte Ausschnitt in E zeigt eine mögliche Kopplungsstelle zwischen zwei transduzierten Zellen über Cx43. Maßstabsbalken: 50 μ m (A und E), 20 μ m (C), 10 μ m (vergrößerter Ausschnitt in E).

Die Differenzierung der Zellen zu Myotuben wurde durch Färbungen gegen muskelspezifische Proteine wie α -Aktinin bestätigt (Abbildung 15, C-F). Nach Transduktion mit dem Cx43-Konstrukt ließ sich in diesen Zellen eine membranständige Cx43-Fluoreszenz nachweisen. In einem Fall schien es in benachbarten, transduzierten Zellen zu einer Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über Cx43 zu kommen, ähnlich dem Glanzstreifen zwischen Kardiomyozyten (Abbildung 15, C bis F, E vergrößerter Ausschnitt). Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden an den Hunde-Zellen vorläufige Kopplungsexperimente mit der oben beschriebenen Technik der lokalen Einzelzellektroporation durchgeführt. Dabei ließ sich in 1 von 5 Versuchen ein Farbstofftransfer zwischen 2 transduzierten Zellen sicher nachweisen (Abbildung 16). Diese Machbarkeitsstudien untermauern die These der funktionellen Kopplung durch lentiviralen Gentransfer auch in primären Skelettmuskelzellen aus Hunden.

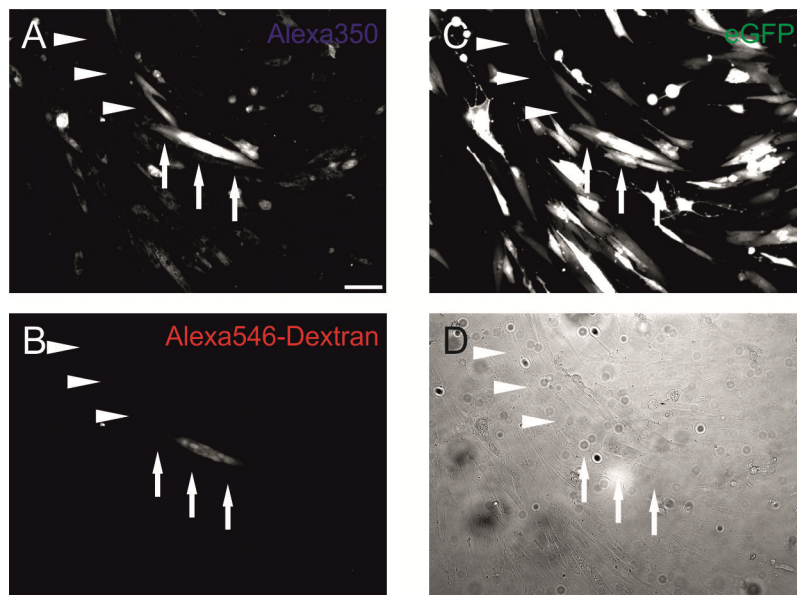


Abbildung 16: Kopplungsnachweis mittels lokaler Einzelzellelektroporation in Skelettmuskelzellen aus Hunden

(**A-D**) Farbstofftransferexperimente an eGFP-positiven, caninen Zellen nach lentiviraler Transduktion. Zellen mit Cx43-gängigem, blauem Farbstoff Alexa350 (**A**) und rotem Kontrollfarbstoff Alexa546-Dextran (**B**) geladen (Pfeile). Ausschließlich der blaue Farbstoff diffundierte in benachbarte, ebenfalls eGFP-positive Zelle (Pfeilspitzen), Alexa546-Dextran war auch nach 20 Min. nur in der geladenen Zelle zu erkennen. (**C**) Native eGFP-Fluoreszenz. (**D**) Durchlichtbild. Maßstabsbalken: 100 μ m.

3.4 Oberflächen- und Langzeit-EKG Messungen an Mäusen zur Evaluation von spontanen Arrhythmien

3.4.1 Oberflächen-EKG Messungen in der "EKG-Röhre"

Die nicht invasive Messung des Oberflächen-EKGs von Mäusen in der "EKG-Röhre", über die Pfoten der Tiere, ermöglicht die Aufzeichnung eines standardisierten EKGs mit 3 Ableitungen. Da die Messungen an wachen Tieren vorgenommen wurden, konnten Anästhesie-induzierte Effekte ausgeschlossen werden.

3.4.1.1 Auswirkungen der Implantation von Skelettmuskelzellen mit und ohne Cx43 auf das Oberflächen-EKG von Mäusen

Um die Auswirkung der Implantation von Skelettmuskelzellen mit und ohne Cx43-Expression auf das Oberflächen-EKG von infarzierten Mäusen zu untersuchen, wurden EKG-Messungen an wachen Mäusen in einer so genannten EKG-Röhre (siehe Abschnitt 2.7.5.1) durchgeführt.

Durch 10-minütige Kontrollmessungen an nicht-infarzierten, genetisch unveränderten CD1-Mäusen wurde das physiologische EKG-Muster der Tiere aufgezeichnet. Anschließend wurden diese Tiere infarziert und Skelettmuskelzellen mit und ohne Cx43 in das ischämische Areal injiziert. An Tag 6 - 7 und 12 - 14 nach Operation wurden Oberflächen-EKGs der Tiere für jeweils 30 Min. abgeleitet und auf arrhythmische Ereignisse und sonstige Auffälligkeiten analysiert. So konnten drei Gruppen miteinander verglichen werden:

1. Gesunde Tiere ohne Infarkt dienten als Negativ-Kontrolle (n = 18).
2. Infarzierte Tiere mit Zellinjektion von Skelettmuskelzellen, die mit dem CMV-eGFP-Virus behandelt wurden und kein Cx43 exprimierten, wurden aufgrund des arrhythmogenen Potentials von Skelettmuskelzellen als Positiv-Kontrolle für das Auftreten von Arrhythmien verwendet (n = 8).
3. Infarzierte Tiere mit Zellinjektion von Skelettmuskelzellen, die mit dem CMV-Cx43-IRES-eGFP-Konstrukt transduziert wurden und damit Cx43 exprimierten (n = 10).

Die durchschnittliche Herzfrequenz aller Tiere war in den verschiedenen Messungen weitestgehend unverändert. Zu Beginn der EKG-Messung zeigten die Tiere im Allgemeinen eine hohe Herzfrequenz, um 800 Schläge pro Min. (in Ruhe ca. 600 Schläge pro Min.). Dies spiegelte eine maximale Stimulation wieder, ausgelöst durch den Stress des Fixationsvorgangs der Mäuse in der EKG-Röhre. In manchen Fällen führte diese Reizung zu arrhythmischen Ereignissen, wie einem intermittierendem AV-Block oder einem synkopalen Zustand mit einem kurzzeitigen Abfallen der Herzfrequenz auf Bereiche um 200 Schläge pro Minute. Diese Ereignisse traten fast in der Hälfte der untersuchten Tiere auf, ohne dass es einen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen gab.

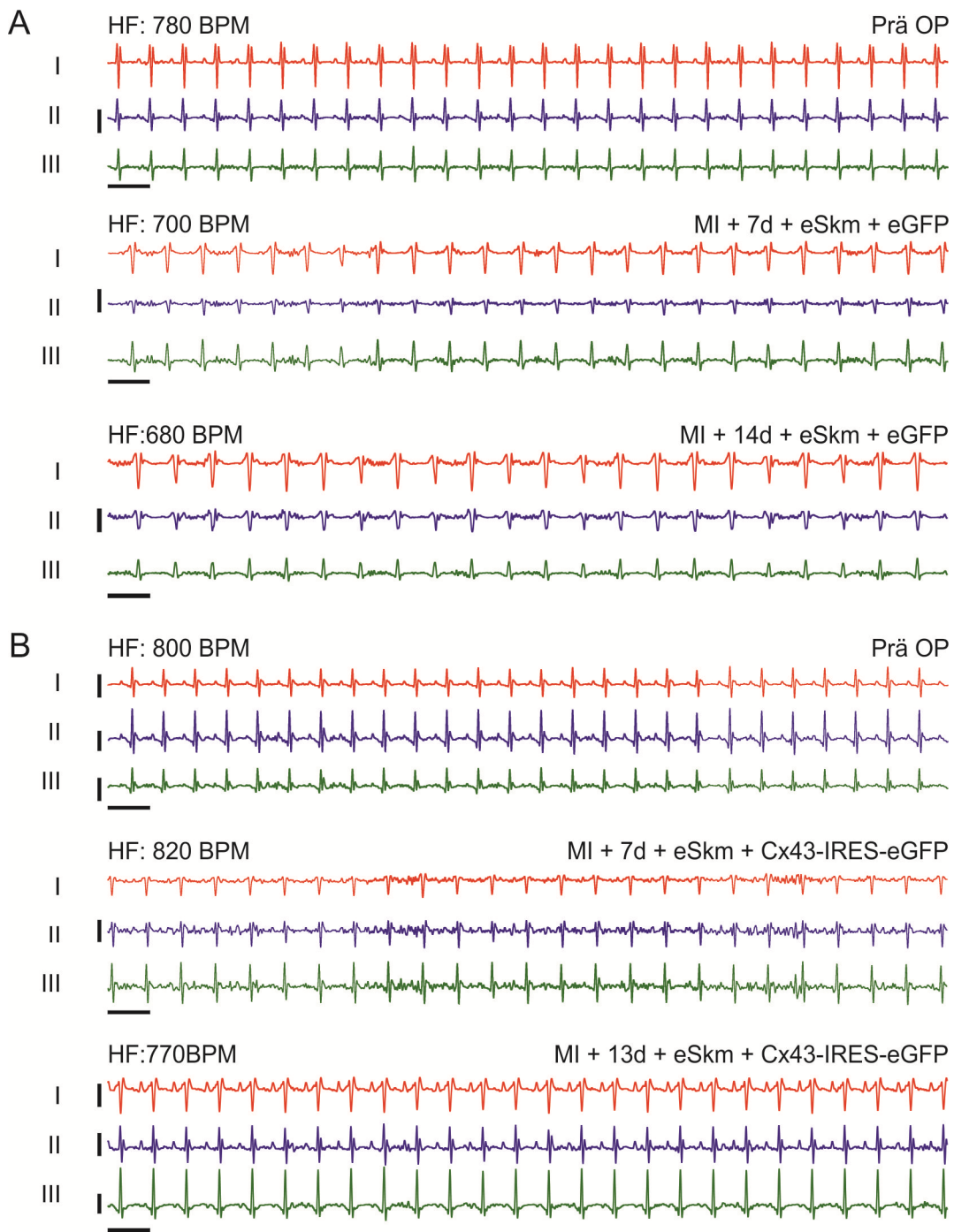


Abbildung 17: Aufzeichnungen der EKG-Röhre vor und nach Implantation von Skelettmuskelzellen mit und ohne Cx43

(A) Repräsentative EKG-Messungen der Kontrollgruppe. Vor OP und 6-7 sowie 12-14 Tage (d) nach OP und Implantation von genetisch unveränderten Skelettmuskelzellen (eSKM) in den Infarkt. (B) Repräsentative EKG-Messungen der Versuchsgruppe zu den gleichen Zeitpunkten wie unter (A). Implantation von Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen in den Infarkt. Die Messungen wurden jeweils an derselben Maus vorgenommen. Ableitung I: rot; Ableitung II: blau; Ableitung III: grün; Skalierung: 0,5 mV bzw. 100ms; Herzfrequenz (HF in BPM) in der Abbildung angegeben. MI = Myokardinfarkt.

In der Analyse der EKG-Morphologie (QRS-Breite, elektrische Herzachse) zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen Tieren, die mit Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen behandelt wurden, und Kontrolltieren, bei denen eGFP-exprimierende Zellen implantiert wurden (Abbildung 17).

Bei der manuellen Auswertung der EKG-Messungen wurde vor allem nach arrhythmischen Ereignissen gesucht. Dazu wurde die Herzrate anhand des Schlag-zu-Schlag-Abstandes mit der Software Lab Chart (ADInstruments, Sydney, Australia) ermittelt und graphisch dargestellt. Da eine Extrasystole außerhalb des regelmäßigen Herzrhythmus zu erwarten ist, führt sie zu einer einmaligen Änderung des Schlag-zu-Schlag-Abstandes und damit der Herzfrequenz. Mit der verwendeten Software konnte eine solche Änderung dargestellt werden.

Herausforderungen bei der Auswertung von EKG-Messungen allgemein und insbesondere bei der Suche nach Arrhythmien in längeren Aufzeichnungen, stellten die Identifikation und der Ausschluss von elektrischem Rauschen bzw. Artefakten dar. Solche Artefakte können zum Beispiel eine Erkennung eines Sinusrhythmus anhand der regelmäßigen Abfolge von P-Wellen erschweren oder es kann eine Deformation des QRS-Komplexes vorgetäuscht werden, die diesen wie eine Extrasystole erscheinen lässt. Bei den durchgeführten Messungen wurde daher besonders auf die rauschfreie Aufzeichnung des EKGs geachtet. Durch Filtern der aufgezeichneten Daten mit einem Bandpass-Filter (200 - 25 Hz) konnte artifizielles Rauschen teilweise unterdrückt werden. Weiterhin war der Vergleich der 3 Ableitungen untereinander hilfreich, um Arrhythmien von Artefakten zu unterscheiden.

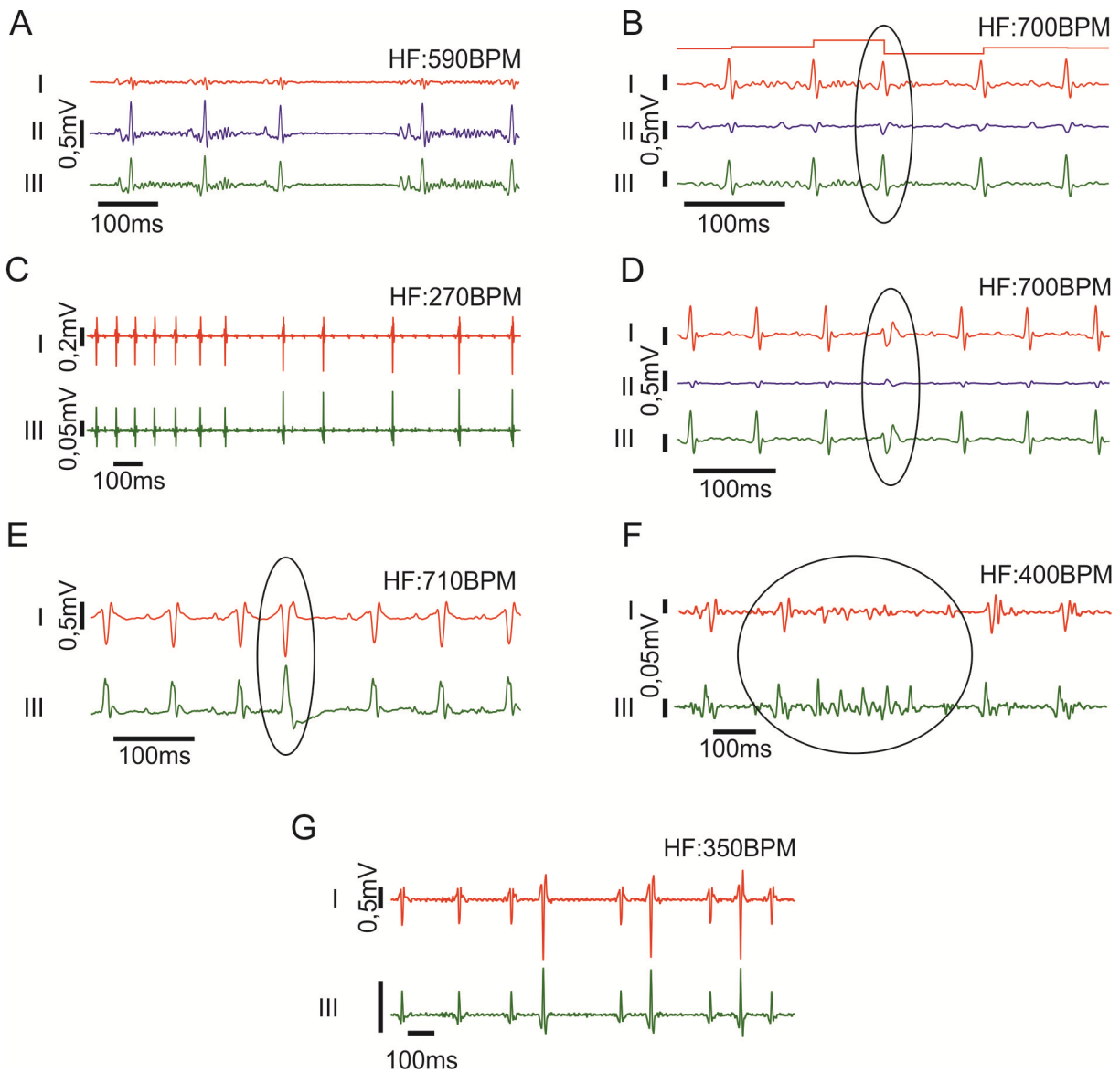


Abbildung 18: Exemplarische Rhythmusstörungen

Auswahl von exemplarischen spontanen Rhythmusstörungen bei Messungen mit der EKG-Röhre. **(A)** Sinusarrhythmie. **(B)** Kreis: supraventrikuläre Extrasystole mit post-extrasystolischer Pause, der obere Graph zeigt den Schlag-zu-Schlag-Abstand. **(C)** AV-Block Grad III. **(D)** Kreis: interponierte ventrikuläre Extrasystole. **(E)** Kreis: interponierte ventrikuläre Extrasystole. **(F)** Kreis: kurze, nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardie. **(G)** ventrikulärer Bigeminus. Ableitung I: rot; Ableitung II: blau; Ableitung III: grün; Skalierung und Herzfrequenz zum Zeitpunkt der Aufzeichnung in der Abbildung angegeben.

Im Abbildung 18 sind Rhythmusstörungen gezeigt, die bei der Analyse der EKG-Aufzeichnungen auffielen. Als supraventrikuläre Rhythmusstörungen fielen häufig Sinusarrhythmien in Form von sehr kurzen Sinusbradykardien oder als intermittierender Sinusarrest auf (Abbildung 18, A). Weiterhin kam es bei wenigen Tieren gehäuft zu sup-

raventrikulären Extrasystolen (Abbildung 18, B), die bei den meisten Mäusen eher sporadisch auftraten. Selten kam es zu intermittierenden AV-Blockierungen, teilweise sogar zu einer totalen AV-Dissoziation (Abbildung 18, C). An ventrikulären Rhythmusstörungen konnten ventrikuläre Extrasystolen erkannt werden (Abbildung 18, D und E). In einem Fall fiel eine selbstlimitierende, ventrikuläre Tachykardie auf (Abbildung 18, F) und einmal wurde ein ventrikulärer Bigeminus aufgezeichnet (Abbildung 18, G).

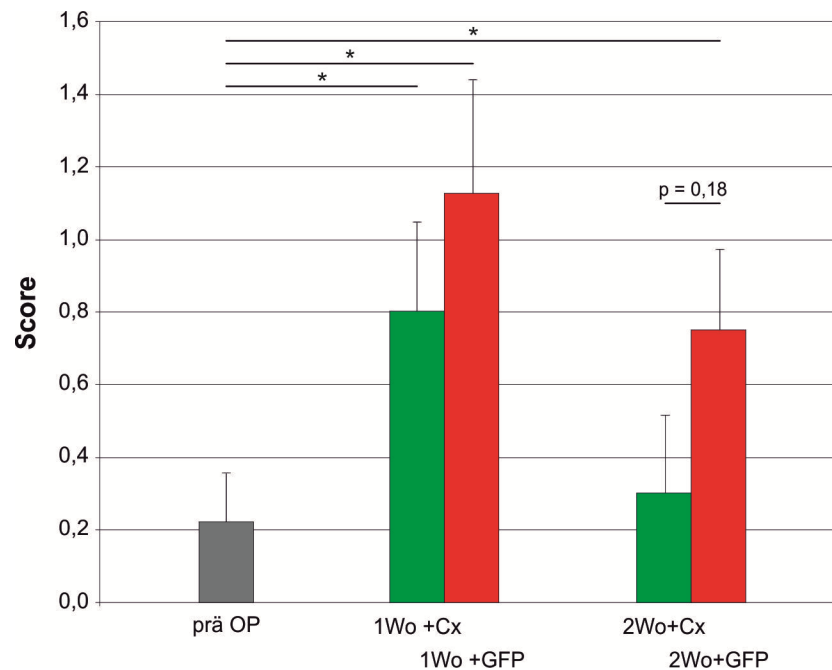


Abbildung 19: Arrhythmiescore nach manueller EKG-Auswertung
Graphische Darstellung des Arrhythmiescores nach manueller EKG-Auswertung von Messungen mit der EKG-Röhre vor OP und 1 bzw. 2 Wochen nach Infarkt. Grau: Messungen vor OP (n=18). Grün: Messungen an Mäusen mit Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen (n=10). Rot: Messungen der Kontrollgruppe, nur mit eGFP-exprimierenden Skelettmuskelzellen therapiert (n=8). Dargestellt ist der Mittelwert des Bewertungsscores (Definition: siehe Text), Fehlerbalken: SEM.

Die Analyse der EKG-Messungen fand geblindet statt, das heißt der Untersucher wusste zum Zeitpunkt der EKG-Analyse nicht, ob das Tier mit Zellen behandelt wurde oder zur Kontrollgruppe gehörte. Das Auftreten von Arrhythmien wurde auf einer Skala von 0 bis 3, je nach Häufigkeit und Art der aufgetretenen Rhythmusstörungen, bewertet. Ein Wert von 0 stand für ein Fehlen von ventrikulären Arrhythmien und keine auffälligen supraventrikulären Rhythmusstörungen. In Messungen, die mit 1 bewertet wurden, traten supraventrikuläre Rhythmusstörungen (Sinusbradykardien mit geringem Abfall der Schläge

pro Minute nicht mitgezählt) auf. Eine Bewertung von 2 entsprach ventrikulären Arrhythmien. Beim gehäuften Auftreten von ventrikulären Arrhythmien wurde ein Score von 3 vergeben. Aufgrund des Krankheitsmodells und der höheren Mortalität wurde den ventrikulären Arrhythmien größere Relevanz beigemessen als supraventrikulären. Eine Zusammenfassung der Auswertung ist in Abbildung 19 dargestellt.

1 Woche nach Infarkt kam es in der eGFP-Kontrollgruppe vor allem zu mehr ventrikulären Arrhythmien als in der Cx43-Gruppe (Arrhythmiescore nur für ventrikuläre Arrhythmien: 1,1 vs. 0,7). Atriale Rhythmusstörungen traten sogar in den mit Cx43 exprimierenden Skelettmuskelzellen behandelten Tieren etwas vermehrt auf (Arrhythmiescore nur für atriale Arrhythmien: 0,5 vs. 0,3). 2 Wochen nach Infarkt traten in der Cx43-Gruppe sowohl weniger atriale ($p = 0,052$) als auch ventrikuläre Arrhythmien ($p = 0,56$) auf, ohne dass dieser Unterschied zu der eGFP-Kontrollgruppe das statistische Signifikanzniveau erreichte.

3.4.2 Semiautomatische Analyse der Langzeit-EKG-Daten

Neben der oben beschriebenen Messung des Oberflächen-EKGs von wachen, fixierten Mäusen in der EKG-Röhre wurde das Langzeit-EKG von nicht narkotisierten und freilaufenden Tieren über einen Zeitraum von bis zu 5 Wochen mittels implantierter Transmitter aufgezeichnet. Dadurch konnte das Auftreten von spontanen Arrhythmien und der antiarrhythmogene Effekt einer kardialen Zelltherapie nach einem Herzinfarkt über einen längeren Zeitraum beurteilt werden. Die Messungen wurden wie in Abschnitt 2.7.5.2 beschrieben vorgenommen.

3.4.2.1 Datenformat

Die Aufzeichnung der Langzeit-EKG-Daten erfolgte mit der kommerziell erhältlichen Software "Ponemah" der Firma DSI. Da die Software "Ponemah" zur Datenanalyse nur begrenzt verwendbar war, mussten die aufgezeichneten Daten mit einer Länge von 48-72 Std. aus dem Programm exportiert und in ein allgemein verwendbares Daten-Format (Binärdatei) umgewandelt werden. Dies wurde mit einer, in der Programmierumgebung LabView geschriebenen Software, die im Institut für Physiologie I entwickelt wurde, durchgeführt. Mit dieser Software konnten aus den einzelnen kontinuierlichen EKG-

Blöcken von 48-72 Std. Dauer auch kurze Stücke ausgeschnitten werden, um diese mittels LabChart zu analysieren.

Um das gesamte Langzeit-EKG von 4-7 Wochen semiautomatisch untersuchen zu können, wurde eine selbstentwickelte Software verwendet.

3.4.2.2 Das „Systole“ Programm

Kommerziell erhältliche Softwarelösungen sind aus verschiedenen Gründen nicht optimal geeignet, die Langzeit-EKG-Messungen der Maus von 4 – 7 Wochen Dauer zu verarbeiten und automatisch zu analysieren. Die große Datenmenge von ca. 1 Gb pro Maus pro Tag ließ sich von kommerziellen Programmen nicht einlesen, die Analyse der Daten konnte ausschließlich manuell erfolgen oder die Analysealgorithmen boten keine ausreichend genaue Erkennungsrate von Rhythmusstörungen der Maus. Daher wurde ein eigenes Programm im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelt und von Dipl.-Inf. H. Begerau in der Programmierumgebung LabView umgesetzt (Abbildung 20).

Die Funktionen des Programms werden im Folgenden beschrieben.

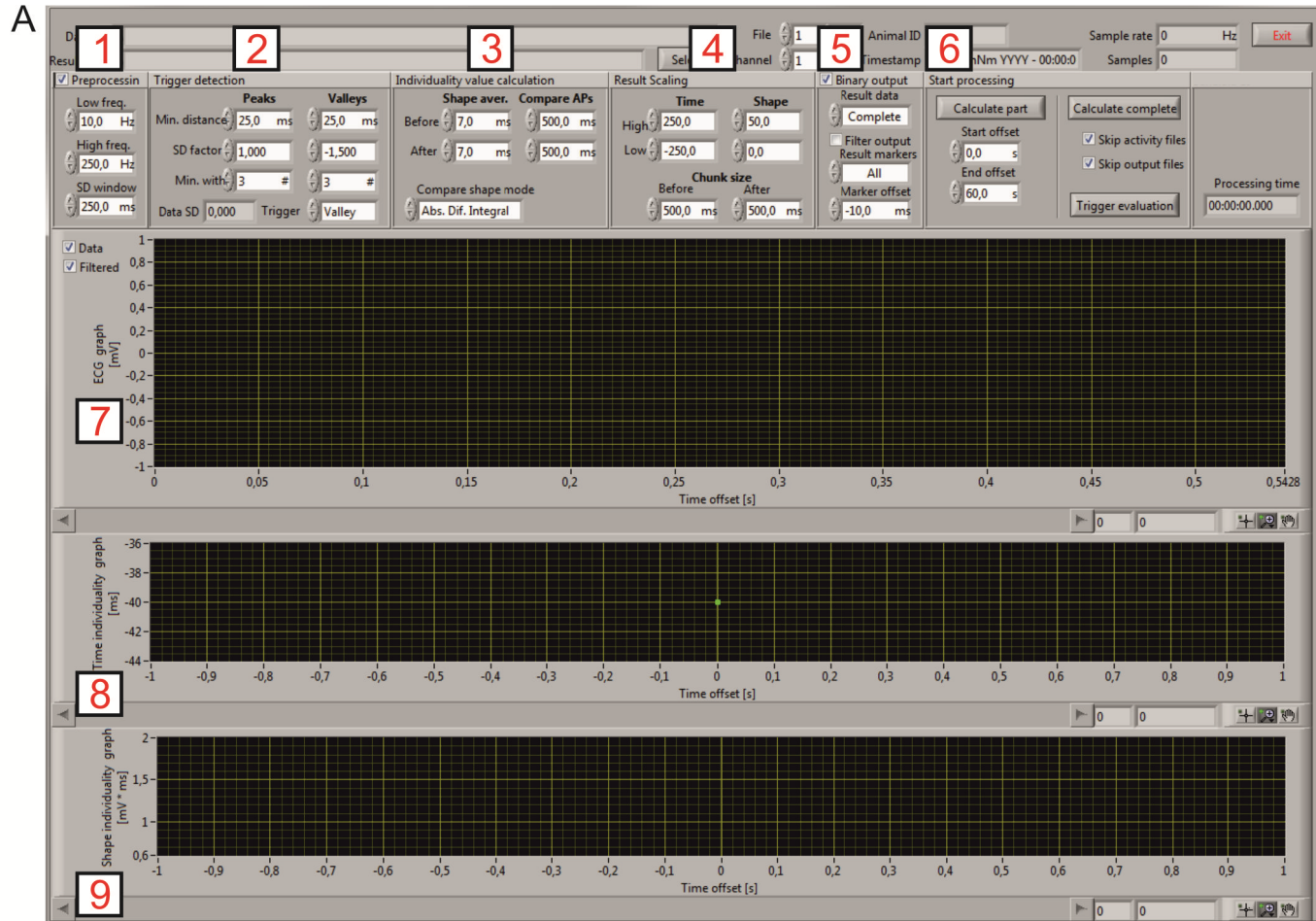


Abbildung 20: Bildschirmfoto der Arbeitsoberfläche des „Systole“ Programms

(A) Arbeitsoberfläche des „Systole“ Programms zur Einstellung der Analyseparameter: 1. Vorverarbeitung der Daten durch einen Bandpass-Filter; 2. Parameter zur Detektion der QRS-Komplexe; 3. Einstellungsbereich zur Berechnung der Individualitäts-Werte; 4. Parameter zur Darstellung der Ergebnisse; 5: Vorgaben für das Ausgabeformat der analysierten Dateien (binary); 6. Start der semiautomatischen Analyse sowie Darstellung der Bewertung einzelner Schläge; Darstellungsfenster: 7: EKG-Signal; 8: *time-individuality* Wert jedes Schläges; 9: *shape-individuality* Wert jedes Schläges, jeweils mit eingestelltem Grenzwert, und Markierung von auffälligen Werten.

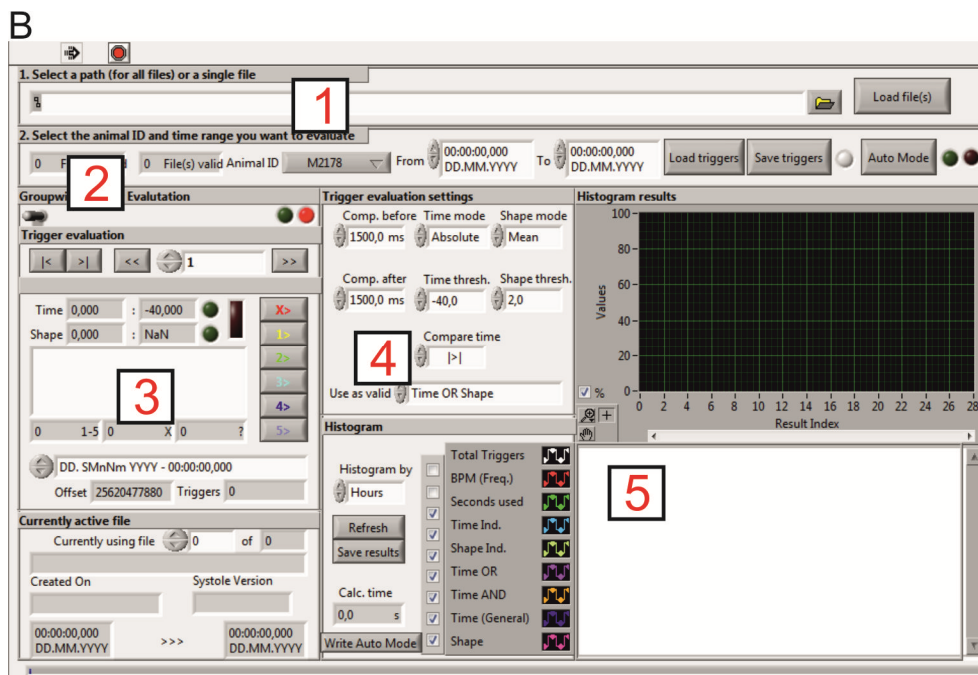


Abbildung 20: Bildschirmfoto der Arbeitsoberfläche des „Systole“ Programms (B) *Evaluate-trigger*-Modul: 1: Auswahl der zu analysierenden Dateien; 2: Auswahl eines einzelnen Tieres und Analysezeitraumes oder komplette Berechnung; 3: Trigger Bewertung mit Kategorien: 1-5 und X; 4: Einstellung der Grenzwerte; 5: Möglichkeit der Darstellung als Histogramm.

3.4.2.2.1 Datenvorverarbeitung

Mit der Software "Ponemah" wurden ununterbrochene EKG-Messungen von 48-72 Std. Dauer aufgezeichnet. Nach diesem Zeitraum musste die Messung aufgrund von Hard- und Software Limitationen neu gestartet werden, um eine Aufzeichnung des EKGs über bis zu 5 Wochen zu ermöglichen. Dieser Neustart der Messung bedingte einen Zeitraum von ca. 3 Min., in dem das EKG nicht aufgezeichnet werden konnte.

Zu Beginn der semiautomatischen Datenanalyse wird die EKG-Datei in kurze Blöcke von 25 Sek. unterteilt, die vom Programm einzeln verrechnet und anschließend wieder zusammen geführt werden. Diese Unterteilung ist notwendig, um eine Software-Verarbeitung der großen Dateien (von 48-72 Std. Dauer) zu ermöglichen. Um die Erkennung von QRS-Komplexen zu verbessern, durchliefen die Daten einen digitalen Bandpass-Filter von 10 bis 250 Hz, der Rauschen verringert und Ausschläge des QRS-Komplexes verstärkt.

Vor der eigentlichen Analyse des EKGs müssen die einzelnen QRS-Komplexe vom Programm erkannt werden. Dazu wird eine Schwellenwertfunktion verwendet, die ent-

weder die Maxima (*peaks*) oder die Minima (*valleys*) der QRS-Komplexe markiert. Hierbei werden aus der Standardabweichung des Signals berechnete, variable Schwellenwerte genutzt, da sich die absolute Höhe der EKG-Ausschläge je nach Qualität der Ableitung ändern kann.

Die Formel zur Berechnung des Schwellenwertes lautet:

Schwellenwert = [Standardabweichung des Blockes] x [Standardabweichungsfaktor]

Der Standardabweichungsfaktor wird dem Programm vorgegeben, wobei ein hoher Wert zu einem hohen Grenzwert und damit zu einer geringeren Anzahl erkannter Schläge führt. Ein niedriger Grenzwert resultiert in einer vermehrten Markierung von Artefakten. Bevor die semiautomatische Analyse mit dem „*Systole*“ Programm gestartet wurde, konnte anhand von kurzen Ausschnitten des EKGs ein Wert zwischen 2 und 3,5 für den Standardabweichungsfaktor empirisch bestimmt werden.

Ein weiterer Parameter zur Erkennung von validen Herzschlägen ist die Dauer des QRS-Komplexes. Für die durchgeführten Analysen wurden 3 ms als unterer Grenzwert gewählt. Signale mit einer kürzeren Dauer wurden nicht markiert, um eine fehlerhafte Detektion von Artefakten zu reduzieren. Zusätzlich wurde der minimale Abstand zwischen 2 validen Herzschlägen mit 15 ms vorgegeben. Innerhalb dieses Abstandes kann nur ein QRS-Komplex erkannt werden. Alle weiteren Signale innerhalb diesen Zeitraumes werden als artifiziell von der Analyse ausgeschlossen.

Anhand dieser Berechnungen wurden die QRS-Komplexe der gesamten Datei detektiert (Trigger-Erkennung) und die Ergebnisse separat gespeichert. Die weiteren Kalkulationen wurden dann, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, auf Grundlage dieser Trigger-Erkennung durchgeführt.

3.4.2.2 Die Individualität eines Schlages

Der Fokus lag in diesem Teil der Arbeit auf der Erkennung von ventrikulären Arrhythmien, wie einzelnen Extrasystolen und Tachyarrhythmien. Solche Störungen der elektrischen Aktivität der Herzkammern sind charakterisiert durch ein Auftreten außerhalb des regulären Herzrhythmus, also einen veränderten zeitlichen Abstand der Aktionspotentiale zueinander, sowie durch einen aberrierenden Weg der Erregungsausbreitung bzw. -

rückbildung im Myokard und damit eine veränderte Form des QRS-Komplexes im EKG. Daraus ergeben sich zwei Parameter, anhand derer man Herzaktionen beurteilen kann: Die zeitliche Abfolge und die Form von QRS-Komplexen.

Aufgrund von einer relativ hohen Variabilität der Signalqualität bei Langzeit-EKG-Messungen mit implantierbaren EKG-Transmittern (zum Beispiel wechselnde Amplitude des Signals, Bewegungsartefakte, etc.), ist eine Beurteilung dieser Parameter pro Schlag im Vergleich zur aktuellen „Umgebung“ des einzelnen QRS-Komplexes und nicht mit festen Grenzwerten sinnvoll. Diese „Umgebung“ ist ein vor der Analyse festgelegter EKG-Bereich vor und nach dem aktuellen, zu analysierenden QRS-Komplex.

Um nun also eine semiautomatische Detektion von Rhythmusstörungen mit dem „*Systole*“ Programm durchzuführen und eine Unterscheidung in physiologische und pathologische, elektrische Herzaktionen zu ermöglichen, wurden zwei Indizes errechnet, die jeden QRS-Komplex individuell beurteilen.

Eine Größe bildet die zeitliche Regelmäßigkeit eines Schlages, bezogen auf die umgebenden Schläge ab. Dieser Wert wurde „*time-individuality*“ genannt. Dieser Parameter der *time-individuality* eines QRS-Komplexes beinhaltet den zeitlichen Abstand zum vorangegangenen Komplex in Millisekunden. Außerdem wird der durchschnittliche zeitliche Abstand der umgebenden Schläge mit einbezogen. Der Wert der *time-individuality* ist die Differenz des aktuellen Abstandes vom durchschnittlichen Abstand der direkt benachbarten Schläge aus der Umgebung in Millisekunden.

Bei einer stabilen, regelmäßigen Pulsrate ohne arrhythmisches Ereignis ist die *time-individuality* unabhängig von der Höhe der Herzfrequenz und hat einen Wert von 0. Ein negativer Wert der *time-individuality* bedeutet, dass die erkannte elektrische Aktivität relativ früher stattfindet, ein positiver Wert steht für ein relativ späteres Auftreten. Die so für jeden QRS-Komplex errechneten *time-individuality*-Werte werden mit einem einfachen, absoluten Grenzwert verglichen, der dem Programm vorgegeben wird. Bei Überschreiten des Grenzwertes wird der Schlag markiert, das heißt er ist verglichen mit seiner Umgebung unregelmäßig und könnte eine Arrhythmie sein.

Der zweite Parameter stellt den Unterschied der Form eines QRS-Komplexes von den Komplexen in der direkten Umgebung dar und wurde als „*shape-individuality*“ bezeichnet. Der *shape-individuality* liegt ebenfalls ein Vergleich des aktuellen QRS-Komplexes mit den direkt umgebenden Komplexen zugrunde. Aus den Kurven dieser benachbarten

Schläge wird eine Summationskurve gebildet (Abbildung 21, B). Die Kurve des aktuellen Schlages wird nun mit der Summationskurve verglichen und der Unterschied durch eine Differenzkurve berechnet (Abbildung 21, C und D). Aus dem Betrag der Differenzkurve wird das Integral gebildet, um einen positiven, skalaren Wert zu erhalten (Abbildung 21, E, F). Dieser abstrakte Wert ist die *shape-individuality* des aktuellen Schlages (Abbildung 21) und nimmt bei identischer Form des analysierten Schlages, verglichen mit der Umgebung, den Wert 0 an.

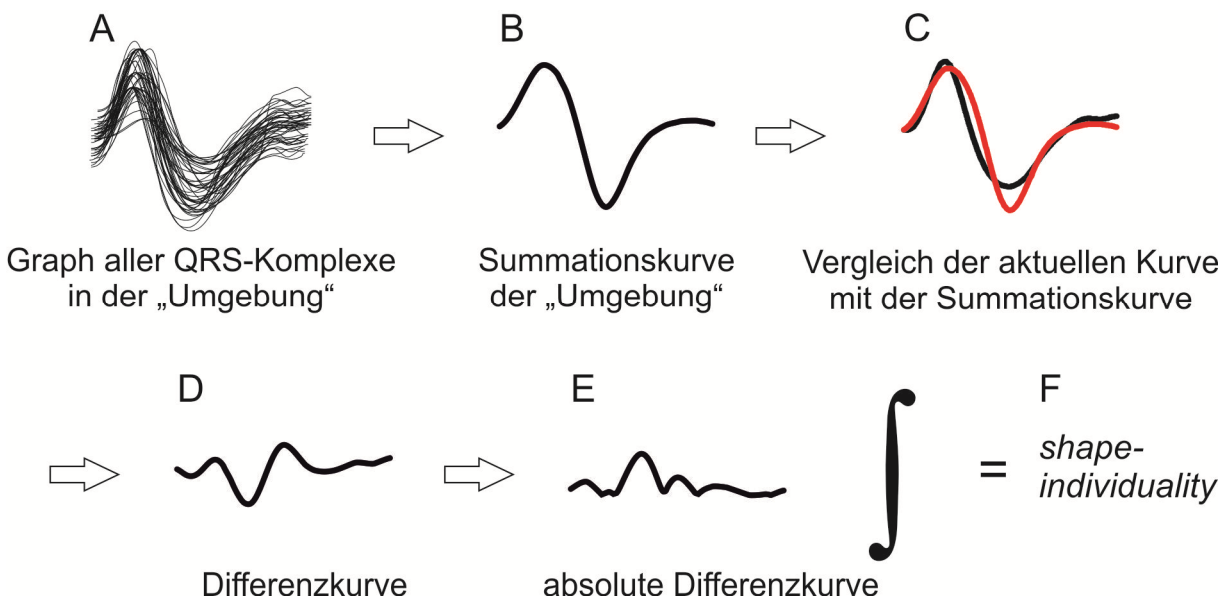


Abbildung 21: Berechnung der *shape-individuality*

Berechnungsschritte zur Bestimmung des Wertes der *shape-individuality* eines QRS-Komplexes. (A) und (B) Bildung einer Summationskurve aller QRS-Komplexe "der Umgebung". (C) Vergleich der Summationskurve mit dem aktuellen Schlag. (D) und (E) Berechnung der absoluten Differenzkurve. (F) Integral der absoluten Differenzkurve ist der Wert der *shape-individuality* des aktuellen QRS-Komplexes.

Die *shape-individuality* wird mit einem variablen Grenzwert analysiert. Das heißt, der Grenzwert wird vom Programm für jeden Schlag anhand der *shape-individuality*-Werte der umgebenden Schläge berechnet und so an das aktuelle EKG-Signal angepasst. Dadurch wird die Erkennung von falsch-positiven Ereignissen, wie Rauschen und Bewegungsartefakten, verringert. Das „Systole“ Programm gibt nach diesen Analyseschritten neben der Herzfrequenz, den prozentualen Anteil der nach den eingestellten Parametern als „auffällig“ markierten Ereignisse von allen erkannten Schlägen pro Stunde an.

3.4.2.3 Analyse der vom „Systole“ Programm ausgegebenen Daten

Das „Systole“ Programm erlaubt mit den oben beschriebenen Berechnungen eine starke Kondensierung der in den EKG-Daten enthaltenen Informationen. Allerdings ist eine vollständige automatische Bewertung noch nicht möglich. Die weiteren manuellen Analyseschritte zur Evaluation der Arrhythmogenität eines Langzeit-EKGs werden im Folgenden beschrieben.

Um die Funktionsfähigkeit des Programms zu bewerten, war eine Begutachtung der einzelnen, auffälligen QRS-Komplexe nötig. Dazu wurde das Programm mit einer Erweiterung dem „Evaluate Trigger“ Modul ausgestattet. Dieses greift auf die Daten aus den vorherigen Kalkulationen zurück und ermöglicht eine Bewertung jedes einzelnen Schläges durch die Darstellung des QRS-Komplexes zu jedem erkannten Trigger. Mit Hilfe dieser Funktion wurden die Parameter des „Systole“ Programms optimiert, um eine bestmögliche Erkennung der einzelnen QRS-Komplexe und eventueller arrhythmischer Ereignisse zu gewährleisten. Weiterhin konnten mit dieser Erweiterung auch unterschiedliche Grenzwerte zur Erkennung von Arrhythmien in der kompletten Langzeit-Analyse getestet und automatisch auf Datensätze von ganzen Experimenten angewendet werden. Durch manuelle Kontrollen der durch das „Systole“ Programm berechneten Dateien zeigte sich, dass für die *time-individuality* ein Grenzwert von 50 ms und für die *shape-individuality* ein Grenzwert von 3,5 geeignet war. Bei höheren Grenzwerten wurden Arrhythmien nicht erkannt, niedrigere Einstellungen führten zum häufigeren Analysieren von Artefakten.

Die Ergebnisse der Berechnungen wurden in tabellarischer Form ausgegeben. Diese Daten wurden in Microsoft Excel importiert und, wie unten beschrieben, weiter verrechnet und grafisch aufgearbeitet. So ließen sich die als auffällig erkannten Schläge für die *time-* und für die *shape-individuality* in Prozent der Gesamtschläge darstellen und in Graphen zusammenfassen (Abbildung 24, C). In dieser Darstellung steht ein Datenpunkt für die prozentualen, auffälligen Schläge pro Stunde des Gesamtexperiments. In anschließenden Analysen wurden die Ergebnisse weiter kondensiert. Die Infarkt-Experimente wurden in 3 Blöcke von je 7 Tage Dauer unterteilt. Der 1. Block fasst die Woche direkt vor der Infarzierung des linken Ventrikels zusammen. Im zweiten Block ist die 1. und im 3. die 2. Woche nach Infarkt und Zelltherapie verrechnet. Von diesen Blö-

cken wurden die Mittelwerte kalkuliert und untereinander verglichen, um Auffälligkeiten zu erkennen.

Die qualitative und quantitative Analyse der Langzeit-EKG-Daten erfolgte standardisiert in 3 Schritten:

1. Geblindete, orientierende, manuelle Datenanalyse von kurzen EKG-Abschnitten.
2. Qualitative Klassifizierung der mit dem „*Systole*“ Programm generierten Daten anhand von Excel-Graphen und die geblindete Zuordnung zu den einzelnen Versuchsgruppen.
3. Kondensierung der Daten-Blöcke für eine quantitative Analyse der prozentualen Auffälligkeiten.

3.4.3 Ergebnisse der Langzeit-EKG Messungen

3.4.3.1 Synchrone Messungen mit der EKG-Röhre

Um die Methode der Langzeit-EKG-Messung genauer zu evaluieren, wurde das Oberflächen-EKG von Tieren, denen ein Telemetrie-Transmitter implantiert worden war, gleichzeitig und synchronisiert mit der oben beschriebenen EKG-Röhre aufgezeichnet, so dass beide Ableitungsformen miteinander verglichen werden konnten. Der Vektor des telemetrisch gemessenen EKGs entsprach ungefähr Ableitung II nach Einthoven des Oberflächen-EKGs. (Abbildung 22).

Im Vergleich war die EKG-Röhre anfällig für elektrisches Rauschen und gab bei schlechtem Kontakt zwischen den Elektroden und den Pfoten der Maus kein gutes Signal, das telemetrische EKG-System wurde vor allem durch Muskel- und Bewegungsartefakte beeinflusst.

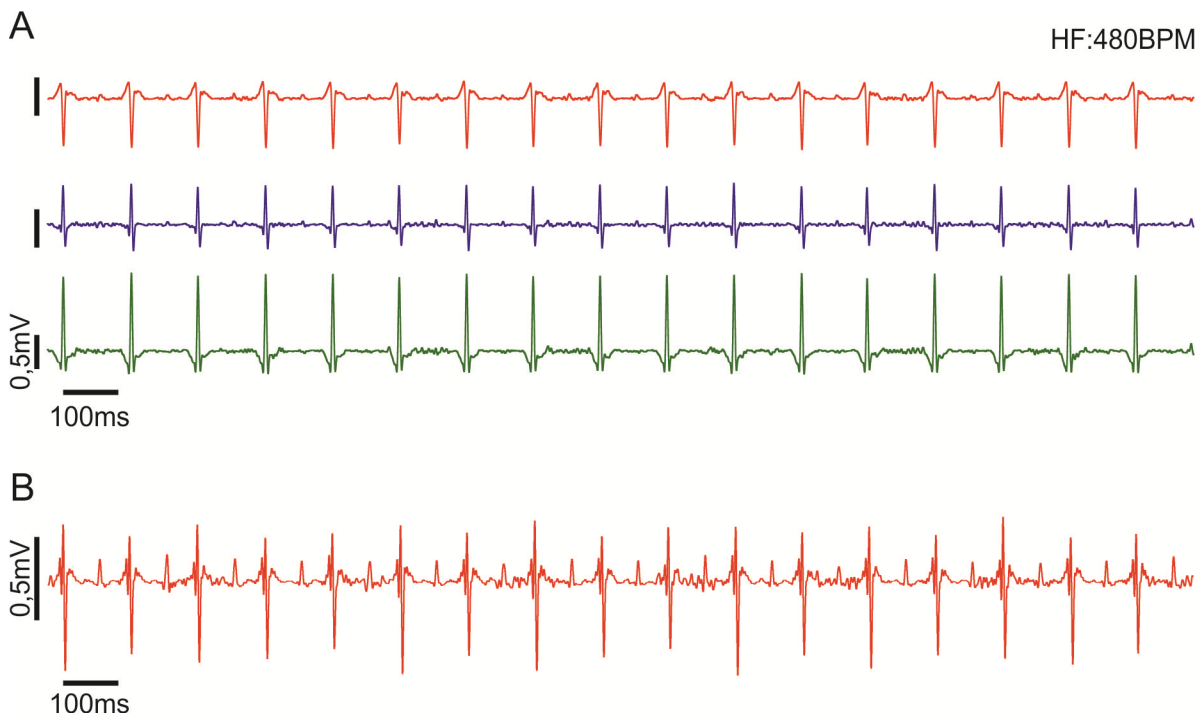


Abbildung 22: Vergleich von Oberflächen-EKG mit telemetrisch abgeleitetem EKG (A) Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs mit der EKG-Röhre (I: rot, II: blau, III: grün); (B) Aufzeichnung des telemetrisches EKGs. Die Messungen wurden synchron vorgenommen. Der Zeitpunkt der Aufzeichnung war 43 Tage nach Implantation des Transmitters und 15 Tage nach Infarzierung der Maus. Maßstabsbalken: Amplitude: 0,5 mV; Zeit: 100 ms.

3.4.3.2 Präoperative Messungen und Auswirkungen eines Herzinfarktes auf die EKG-Morphologie in Langzeitmessungen

Messungen an Mäusen vor und nach Kryoinfarzierung ohne Zelltherapie zeigten zunächst das physiologische EKG-Muster von Mäusen ohne Beeinflussung durch Narkotika oder Stress durch Fixierung (Abbildung 24, B). Dabei stellte sich heraus, dass die Qualität des aufgezeichneten EKGs durch die Bewegung der Tiere stark beeinflusst wurde. So entstanden hochfrequente Artefakte durch Potentiale der Skelettmuskulatur (Abbildung 23, B). Ferner hatte die Körperstellung der Maus Einfluss auf den Vektor der Ableitung. Besonders bei der Fellpflege sitzt die Maus vorn über gebeugt was zu einer Verschiebung der Elektrodenspitzen des Telemetrie-Transmitters zueinander führt. Diese Verschiebung ändert die Ebene der Ableitung, wodurch sich der Vektor der EKG-Kurve verschieben kann (Abbildung 23, A).

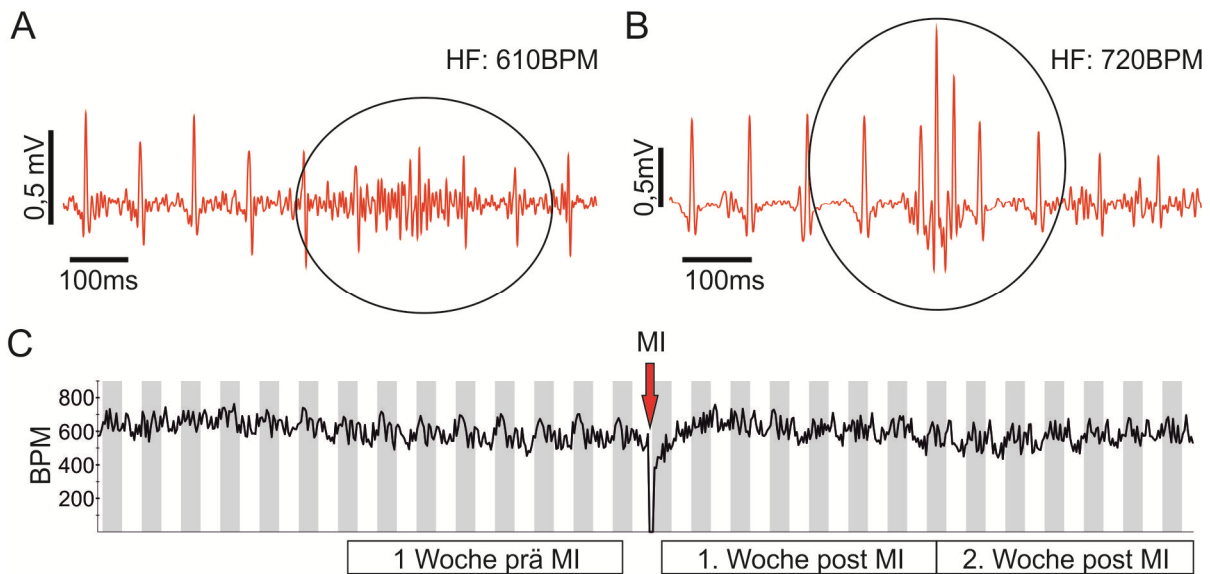


Abbildung 23: Das telemetrische Langzeit-EKG von Mäusen

(A) und (B) typische Artefakte der Langzeit-EKG-Messung an Mäusen. (A) Durch Kratz-Artefakte kommt es zu einer artifizierten Änderung der elektrischen Herzachse. (B) Bewegung der Maus kann zu Muskelartefakten führen, die im EKG als arrhythmische QRS-Komplexe imponieren können. (C) Durchschnittliche Herzfrequenz einer Maus in Schlägen pro Minute; ein Messpunkt entspricht einer Stunde des Experiments. Dauer der Messung: 28 Tage mit Darstellung der Analysezeiträume: 1 Woche vor Infarkt und je die erste und zweite Woche nach Infarkt. Infarzierung und Zelltherapie mit embryonalen Kardiomyozyten der Maus 2 Wochen nach Transmitterimplantation. Graue Balken: Nächte.

Die Langzeit-EKG-Messungen an gesunden Tieren zeigten eine Herzfrequenz von 600 bis 700 Schlägen pro Min., wobei die Pulsrate deutlichen Tag-Nacht-Schwankungen unterlag und entsprechend dem Aktivitätsniveau der Tiere nachts höher war (Abbildung 23, C). Diese zyklische Änderung der Herzfrequenz war direkt nach einem Herzinfarkt reduziert (Abbildung 23, C) und stellte sich nach einigen Tagen unvollständig wieder ein. Weiterhin änderte sich durch den Kryoinfarkt der Vektor des QRS-Komplexes deutlich. Entsprechend der Position der Elektroden des implantierten Transmitters wurde ein EKG-Vektor vergleichbar der Ableitung II nach Einthoven aufgezeichnet. Während der Summationsvektor des EKGs vor der Infarzierung eher positiv mit einer klaren R-Zacke war (Abbildung 24, B), wurde durch den zugefügten Infarkt häufig ein stark negativer Vektor mit einer RSr'-Konfiguration, also einem starken negativen Anteil (Abbildung 24, B), ermittelt. Diese Änderung im EKG begann direkt nach Induktion des Kryoinfarktes und vollzog sich über einen Zeitraum von mehreren Tagen.

3.4.3.3 Implantation von embryonalen Kardiomyozyten in den Herzinfarkt

Der wirksame Schutz vor Arrhythmien durch die Zelltherapie des Herzinfarktes wurde zunächst in Langzeit-EKG-Messungen untersucht.

Nach Implantation der EKG-Transmitter (siehe Abschnitt 2.7.5.2) wurde das EKG der gesunden Tiere ($n = 16$) über 2 Wochen kontinuierlich aufgezeichnet. Diese Messungen dienten als interne Kontrolle (Abbildung 24, A und B, obere Reihe). Nach 2 Wochen erfolgte die Infarzierung der Herzen mittels Kryoläsion und die Randomisierung der Tiere in zwei Gruppen (je $n = 8$). Eine Gruppe erhielt die Zellinjektion mit 200 000 embryonalen Kardiomyozyten (eKM), die anderen Tiere dienten als Kontrolle (sham) ohne Zelltherapie. Das EKG wurde für weitere 14 Tage aufgezeichnet (Abbildung 24, A und B). Nach dem Beobachtungszeitraum wurden die Mäuse geopfert und die Herzen für histologische Untersuchungen entnommen. Die transplantierten, embryonalen Kardiomyozyten wurden aus genetisch veränderten Mäusen isoliert, welche das grüne Fluoreszenzprotein (GFP) herzspezifisch, unter Kontrolle des α -Aktin-Promoters, exprimieren (Fleischmann et al., 1998). Sie konnten daher anhand nativer Fluoreszenz identifiziert werden. In die statistische Analyse wurden nur die Tiere einbezogen, in deren Infarktregion die transplantierten Herzzellen durch Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar waren, was in 5 Tieren der Fall war. Tiere, die vor Ende des Experiments starben, wurden ebenfalls aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Dies war bei einem Tier der Versuchsgruppe (3 Tage nach Infarkt) und bei 3 Tieren aus der Kontrollgruppe (Tod am 2., 8. und am 12. Tag nach Infarkt) der Fall. Die Todesursache war, nach Auswertung der EKG-Aufzeichnung, in keinem der Fälle eine ventrikuläre Arrhythmie. In die Analyse wurden somit in der behandelten Gruppe $n = 4$ Tiere und in der Kontroll-Gruppe $n = 5$ eingeschlossen.

Die orientierende, manuelle Analyse von kurzen EKG Abschnitten ergab keinen deutlichen Unterschied in der EKG-Morphologie zwischen den Gruppen. Die unter Abschnitt 3.4.3.1 beschriebene Änderung der elektrischen Herzachse auf einen negativen Gesamtvektor vollzog sich innerhalb weniger Tage nach Infarkt und verlief in beiden Gruppen ähnlich (Abbildung 24 A, B).

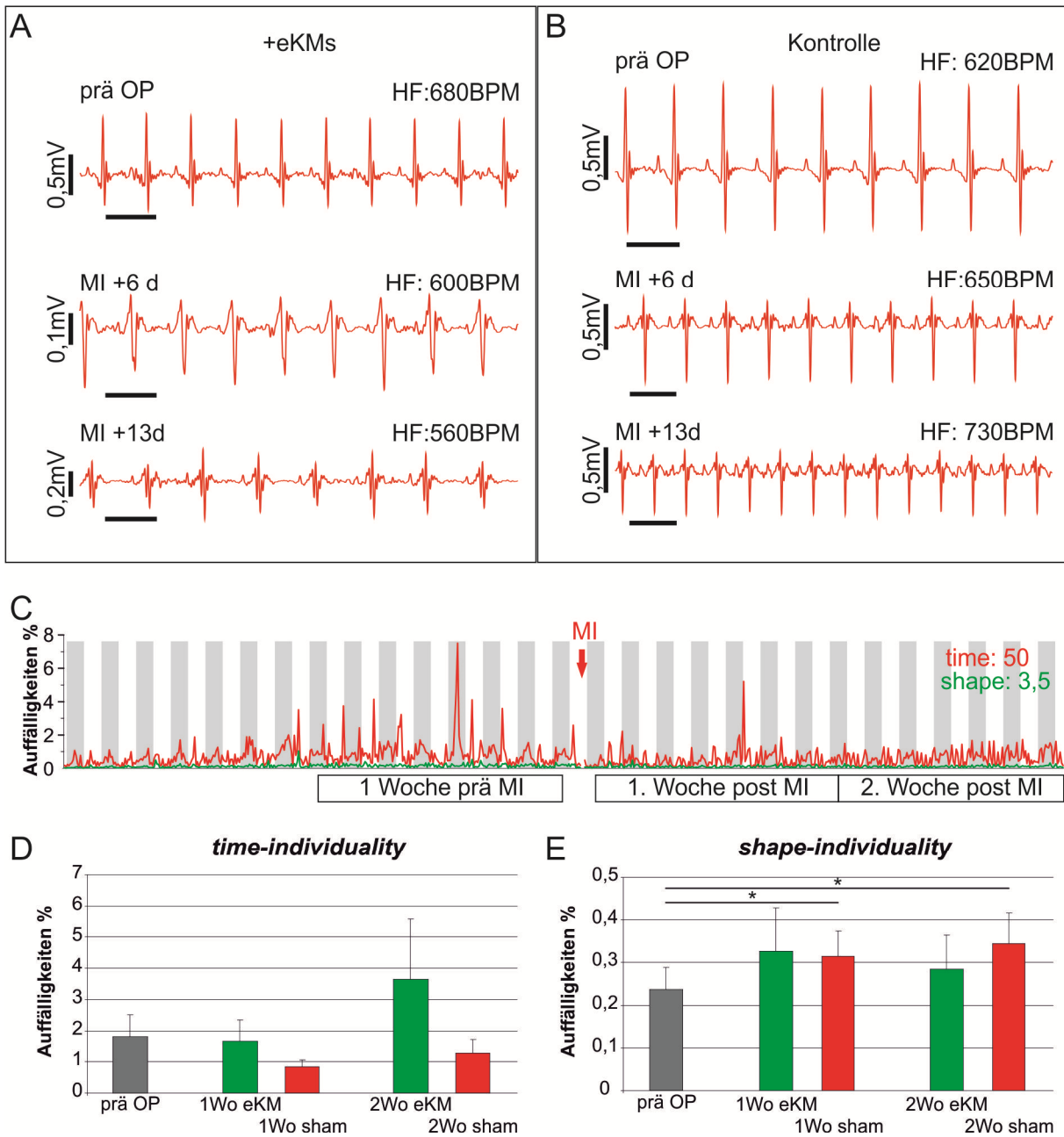


Abbildung 24: Auswirkungen der Implantation von embryonalen Kardiomyozyten auf das spontane EKG von Mäusen

(A) und (B) exemplarische EKG-Ausschnitte vor, bzw. 6 und 13 Tage nach Infarkt. Ausschnitte jeweils vom gleichen Tag und gleicher Uhrzeit nach Operation; Skalierung: 100ms. (A) Infarkt und Implantation von embryonalen Kardiomyozyten (eKM). (B) Nur Infarkt ohne Zellimplantation. (C) repräsentativer Graph des gesamten Experiments der mit eKM behandelten Gruppe (4 Wochen Aufzeichnungszeit). Rot ist der prozentuale Anteil der nach *time-individuality* auffälligen QRS-Komplexe dargestellt, grün ist der nach *shape-individuality* erkannte Anteil. Ein Punkt des Graphen steht für eine Stunde Aufzeichnungszeit. (D) und (E) fassen die in (C) markierten Zeiträume als Balkendiagramm zusammen. Grau sind die Werte vor OP dargestellt, grün die der mit eKM behandelten Tiere und rot die Kontrollgruppe (Fehler: SEM; $p = < 0,05$).

In der geblindeten, grafischen Analyse der mit dem „Systole“ Programm erstellten Daten (Grenzwerte betragen für die *time-individuality* 50 ms und für die *shape-individuality* 3,5) war eine Unterscheidung der beiden Gruppen (Infarkt mit und ohne Implantation von embryonalen Kardiomyozyten) anhand des post-Infarkt Verlaufs nicht sicher möglich (Abbildung 24 C). Anschließend wurden die Daten weiter kondensiert und die prozentualen Auffälligkeiten quantitativ untersucht. In der Woche vor Infarzierung wurden mittels *time-individuality* 1,80 % der erkannten Schläge als auffällig markiert. In der Woche direkt nach Infarzierung fiel der Anteil von auffälligen Schlägen in der *time-individuality* in beiden Gruppen ab, wobei es in der Kontrollgruppe zu einem deutlicheren Abfall kam.

Die Analyse der zweiten Woche nach Infarkt ergab für die *time-individuality* eine ansteigende Tendenz der auffällig markierten Ereignisse in der mit embryonalen Kardiomyozyten behandelten Gruppe, ohne eine deutliche Änderung bei der Kontrollgruppe (Abbildung 24, D). Statistisch war kein signifikanter Unterschied der Gruppen untereinander und im Vergleich zu Messungen vor Infarkt nachweisbar.

Durch den Parameter der *shape-individuality* wurden bei gesunden Tieren vor Infarkt im Mittel 0,23 % der Schläge als auffällig markiert. In der ersten Woche nach Infarkt stieg dieser Wert in beiden Gruppen deutlich an. In der Kontrollgruppe ohne Zellimplantation lag der Unterschied zu gesunden Tieren im statistisch signifikanten Bereich ($p = 0,02$). Zwei Wochen nach Läsion des Herzens blieb dieser statistisch signifikante Anstieg verglichen mit gesunden Tieren erhalten ($p = 0,02$) (Abbildung 24, E).

Ob diese Ergebnisse einem protektiven Effekt der implantierten Zellen entsprechen, ließe sich aufgrund der hohen experimentellen Variabilität der durchgeführten Versuche mit einer größeren Anzahl an untersuchten Tieren verifizieren. Die geringere Zahl an frühzeitigen Todesfällen in der mit embryonalen Kardiomyozyten behandelten Gruppe (1 Tier), verglichen mit der Kontrollgruppe (3 Tiere), könnte für einen möglichen protektiven Effekt nach Herzinfarkt sprechen.

3.4.3.4 Implantation von Skelettmuskelzellen mit und ohne Cx43 in den Herzinfarkt

Um nach den erfolgreichen Kopplungsexperimenten *in vitro* (vgl. Abschnitt 3.2) den protektiven Effekt der Implantation von Cx43-positiven Skelettmuskelzellen in den Herzinfarkt *in vivo* nachzuweisen, wurden lentiviral transduzierte, embryonale Skelettmuskelzellen in den Kryoinfarkt von Mäusen injiziert und das EKG der Mäuse in Langzeitversu-

chen gemessen (Abbildung 25). Eine Korrelation zur Fluoreszenzmikroskopie, wie bei der Implantation von embryonalen Kardiomyozyten, erfolgte aufgrund der schwachen eGFP-Fluoreszenz nicht. Keines der Tiere verstarb frühzeitig. In der Versuchsserie ergab die geblindete, orientierende, manuelle Datenanalyse von kurzen EKG-Abschnitten keinen Hinweis auf einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (repräsentative EKG-Ausschnitte sind in Abbildung 25 dargestellt). Nach der semiautomatischen Analyse der Daten mit dem „Systole“ Programm (Grenzwerte betragen für die *time-individuality* 50 ms und für die *shape-individuality* 3,5) erfolgte die grafische Auswertung aller 8 Mäuse mit Excel (Abbildung 25, C). Diese Graphen wurden geblindet den beiden Versuchsgruppen zugeordnet. Dabei wurde bei 3 von 4 Tieren, die mit Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen behandelt wurden, ein protektiver Effekt vermutet. Dies war aber auch bei zwei von 4 Kontrolltieren der Fall, die mit embryonalen Skelettmuskelzellen behandelt wurden, welche nur eGFP exprimieren. Eine Unterscheidung anhand der grafischen Darstellung der vom Programm erkannten Auffälligkeiten war also nicht sicher möglich.

Im folgenden Schritt der Analyse wurden die EKG-Daten erneut zu Blöcken zusammengefasst (markierte Bereiche in Abbildung 25; 1 Woche vor Infarkt und die erste und zweite Woche nach Infarkt) und die prozentualen Auffälligkeiten gemittelt.

Die Analyse der *time-individuality* ergab für prä-Infarkt Messungen aller 8 Tiere 1,36 % auffällige Schläge, vergleichbar mit den Kontrollmessungen an gesunden Tieren aus vorangegangenen Experimenten (Abschnitt 3.4.3.3). In der ersten Woche nach Infarkt kam es nach *time-individuality* in der mit Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen behandelten Gruppe zu keinem deutlich vermehrten Auftreten von auffälligen Ereignissen gegenüber gesunden Tieren ($p = 0,9$). Im Vergleich dazu kam es in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg der auffälligen Ereignisse ($p = 0,06$). Nach manueller Analyse der einzelnen Aufzeichnungen war vor allem die artefaktreiche Messung eines Tieres der Kontrollgruppe für den hohen Wert der *time-individuality* in diesem Zeitraum verantwortlich. In den ersten 5 Tagen nach Infarkt kam es bei diesem Tier zu einem gehäuften falsch- bzw. nicht- Erkennen der QRS-Komplexe, so dass ein hoher Anteil an Schlägen, vor allem nach *time-individuality*, markiert wurde (im Mittel bei dieser Maus ca. 31 %). Dies besserte sich spontan gegen Ende der ersten Woche. Der Parameter *shape-individuality* war aufgrund des variablen Grenzwertes für diese Artefakte nicht

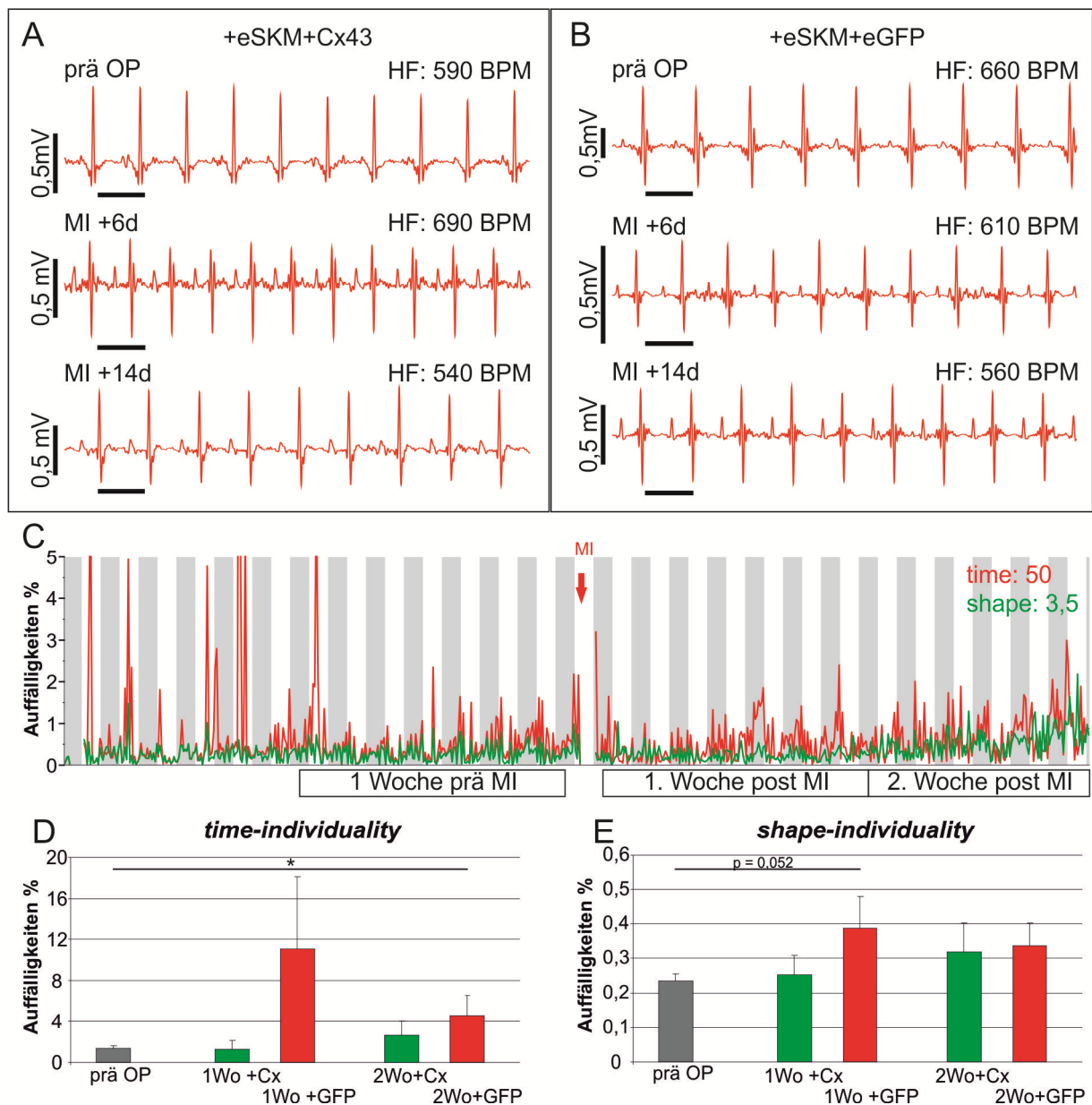


Abbildung 25: Auswirkungen der Implantation von Skelettmuskelzellen mit und ohne Cx43 auf das spontane EKG von Mäusen
(A) und **(B)** exemplarische EKG-Ausschnitte vor, sowie 6 und 14 Tage nach Infarkt. Jeweils Ausschnitte vom gleichen Zeitpunkt (Tag und Uhrzeit) nach Operation. **(A)** Infarkt und Implantation von embryonalen Skelettmuskelzellen (eSKM) nach lentiviraler Transduktion mit Cx43; Skalierung: 100ms. **(B)** Kontrollgruppe, Infarkt und Implantation von eSKM ohne Cx43. **(C)** repräsentativer Graph des gesamten Experiments (4 Wochen Aufzeichnungszeit) der mit Cx43-exprimierenden eSKM behandelten Gruppe. Rot ist der prozentuale Anteil der nach *time-individuality* erkannten QRS-Komplexe dargestellt, grün der nach *shape-individuality* erkannte Anteil. Ein Punkt des Graphen steht für eine Stunde Aufzeichnungszeit. **(D)** und **(E)** fassen die in **(C)** markierten Zeiträume als Balkendiagramm zusammen. Grau sind die Werte vor OP dargestellt, grün die der mit Cx43-exprimierenden eSKM und rot ist die Kontrollgruppe dargestellt (Fehler: SEM).

anfällig. Allerdings wurden, nach Ausschluss dieses Tieres, auch bei den anderen Tieren der Kontrollgruppe in der ersten Woche nach Infarkt tendenziell mehr auffällige Ereignisse nach der *time-individuality* markiert als in der zweiten Woche (4,38 % vs. 3,71 %).

In der zweiten Woche nach Infarkt bestand für die mit Cx43-positiven Zellen behandelte Gruppe nach *time-individuality* kein deutlicher Unterschied zu den prä-Infarkt Messungen ($p = 0,2$). In der Kontrollgruppe kam es zu einem statistisch signifikanten, vermehrten Auftreten von auffälligen Ereignissen ($p = 0,049$). Nach dem Parameter der *shape-individuality* wurden prä-Infarkt 0,23 % der Schläge als auffällig markiert, auch diese Rate war mit den Vorversuchen vergleichbar. Die erste Woche nach Infarkt zeigte in der mit Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen behandelten Gruppe keinen Anstieg der auffälligen Schläge verglichen mit nicht-infarzierten Tieren ($p = 0,7$). In der Kontrollgruppe kam es dagegen zu einem vermehrten Auftreten von deformierten Schlägen. Dieser Anstieg war im Vergleich zu prä-Infarkt Messungen in der *shape-individuality* grenzwertig signifikant ($p = 0,052$). Auch in der zweiten Woche nach Infarkt war in der mit Cx43-positiven Zellen behandelten Gruppe kein eindeutiger Unterschied zu gesunden Tieren nachweisbar ($p = 0,2$). Die Kontrollgruppe zeigte nach *shape-individuality* ein leicht vermehrtes Auftreten von auffälligen Schlägen ($p = 0,08$)

Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis auf einen protektiven Effekt von Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen vor Herzrhythmusstörungen nach einem Herzinfarkt sein.

3.4.3.5 Langzeit EKG-Messungen vor und nach Infarkt bei Mäusen mit Long-QT-Syndrom

Die Evaluation des semiautomatischen Analyse Programms „*Systole*“ erfolgte auch an einem genetisch modifizierten Mausmodell. Es wurden die in der Literatur durch Nuyens et al., 2001 beschriebenen SCN5aD-Tiere (siehe auch Abschnitt 2.4) als positiv-Kontrolle für das Auftreten von spontanen Herzrhythmusstörungen verwendet. In diesen Mäusen ist das Gen für den kardialen SCN5a Natrium-Kanal heterozygot mutiert, was zu einer Verlängerung des QT-Intervalls im EKG und einem vermehrten Auftreten von spontanen, ventrikulären Arrhythmien führt. 6 dieser hemizygoten Tiere wurden als Versuchsgruppe untersucht (Abbildung 26, A).

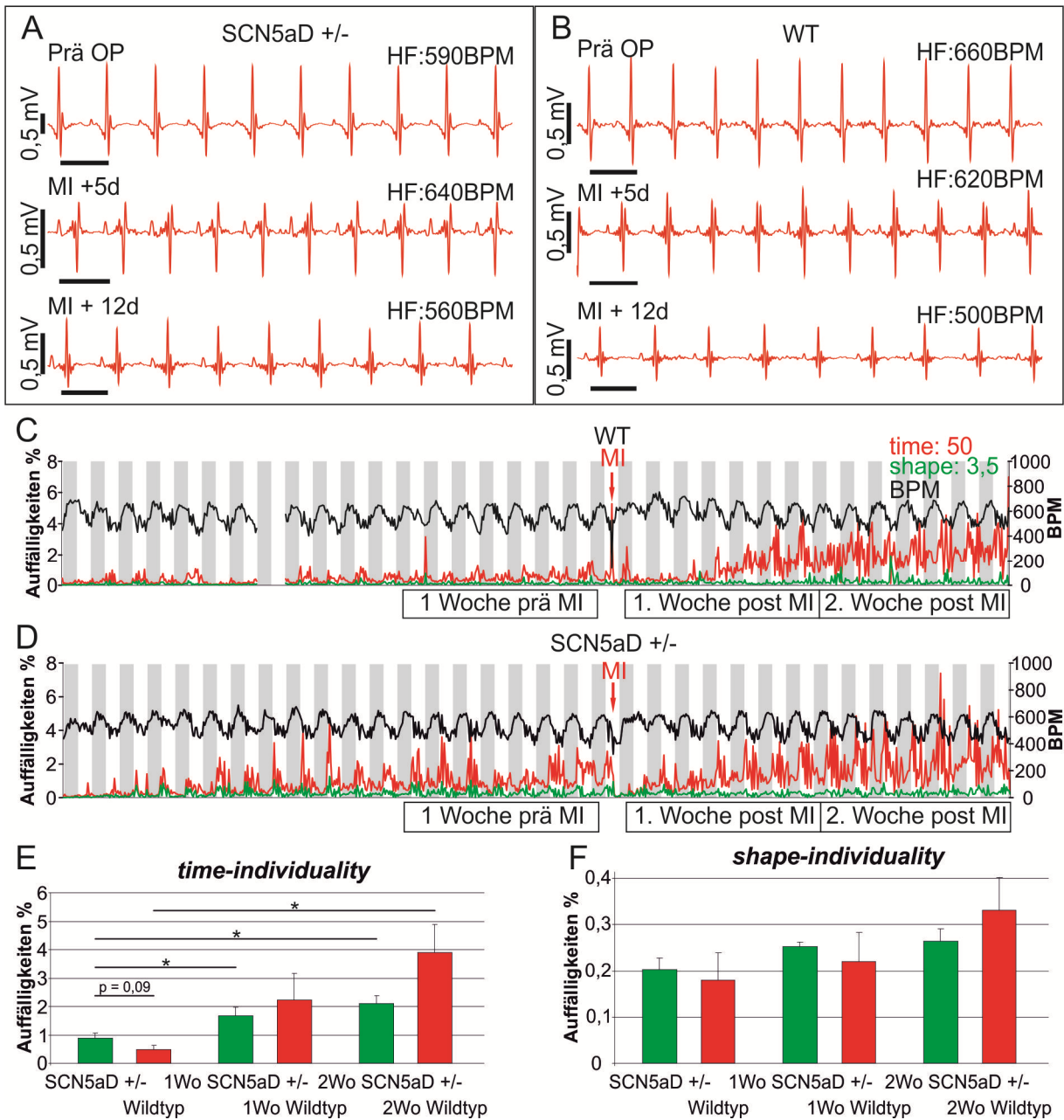


Abbildung 26: Spontanes EKG von SCN5aD Mäusen

(A) und (B) exemplarische EKG-Ausschnitte vor, 5 und 12 Tage nach Infarkt. Ausschnitte jeweils vom gleichen postoperativen Zeitpunkt; Skalierung: 100ms. (A) SCN5aD-Maus. (B) Wildtyp(WT)-Maus der Kontrollgruppe. (C) repräsentativer Graph des gesamten Experiments (4 Wochen Aufzeichnungszeit) einer WT-Maus der Kontrollgruppe (An Tag 8 nach Implantation Fehlfunktion der Aufzeichnung für 24 Std.). (D) repräsentativer Graph des gesamten Experiments (4 Wochen Aufzeichnungszeit) einer hemizygoten SCN5aD-Maus. Rot ist der prozentuale Anteil der nach *time-individuality* erkannten QRS-Komplexe dargestellt, grün der nach *shape-individuality* erkannte Anteil. Ein Punkt des Graphen steht für eine Stunde Aufzeichnungszeit. (E) und (F) fassen die in (C) markierten Zeiträume als Balkendiagramm zusammen. Grün sind die Werte der Maus die heterozygot für SCN5aD ist und rot die der Kontrollgruppe dargestellt (Fehler: SEM).

Als negativ-Kontrolle dienten 6 Wildtyp-Tiere aus dem jeweils gleichen Wurf (Abbildung 26, B). Die Langzeit EKG-Messungen wurden wie zuvor mit einer 2-wöchigen Messung der nicht infarzierten Tiere begonnen. Anschließend wurden die Mäuse beider Gruppen ebenfalls durch Kryoläsion infarziert, um einen möglichen pro-arrhythmogenen Effekt nachzuweisen und das EKG für weitere 14 Tage kontinuierlich gemessen.

Während des Untersuchungszeitraums von 4 - 5 Wochen gab es keine Unterschiede in der Überlebenszeit der Tiere. In der orientierenden, manuellen Analyse des EKGs war ein Unterschied zwischen den Gruppen nicht sicher nachweisbar. (Repräsentative EKG-Beispiele in Abbildung 26, A und B). Anschließend folgte die oben beschriebene, semi-automatische Analyse der Daten mit dem „Systole“ Programm (Grenzwerte betragen für die *time-individuality* 50 ms und für die *shape-individuality* 3,5) und es erfolgte die geblindete, grafische Auswertung der Daten mit Hilfe von Excel (Abbildung 26, C und D).

In beiden Gruppen (heterozygote SCN5A-Mutation und Wildtyp-Kontrolle) war bei der geblindeten Untersuchung der Graphen in 5 von 6 Fällen eine richtige Zuordnung zu den entsprechenden Versuchsgruppen möglich. Diese Unterscheidung konnte vor allem anhand der prä-Infarkt Aufzeichnungen getroffen werden. Die heterozygot mutierten Tiere wiesen, meist bei niedrigen Herzfrequenzen, eine erhöhte Rate an Auffälligkeiten (sowohl nach *time-* als auch nach *shape-individuality*) auf. Dies geschah vorwiegend tagsüber (Tag/Nacht-Rhythmus im 12 Stunden Intervall), wenn die Tiere ein niedrigeres Aktivitätsniveau zeigten (Schlaf). Diese Bradykardie-induzierten Herzrhythmusstörungen waren nach Infarkt weniger deutlich erkennbar. In Abbildung 26, C und D sind zwei repräsentative Experimentverläufe dargestellt.

Die statistische Auswertung der über 7 Tage gemittelten EKG-Daten (markierte Bereiche in Abbildung 26, C und D; 1 Woche vor Infarkt und die erste und zweite Woche nach Infarkt) ergab nach *time-individuality* in der Woche vor Infarkt für die Wildtyp-Tiere 0,47 % auffällige Schläge und für die mutierten Tiere 0,88 %. Der Unterschied von 0,41 % lag mit $p = 0,09$ unterhalb des statistischen Signifikanzniveaus.

In der ersten Woche nach Infarkt lag der prozentuale Anteil an markierten Schlägen in der genetisch unveränderten Kontrollgruppe nach der *time-individuality* tendenziell höher als bei heterozygoten Tieren ($p = 0,5$). In der 2. Woche nach Infarkt verstärkte sich diese Tendenz ($p = 0,1$), wobei weiterhin keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Verglichen mit prä-Infarkt-Messungen war die Zunahme an auffälligen Schlägen sowohl

bei Wild-Typ-Mäusen ($p = 0,006$) als auch bei mutierten Tieren ($p = 0,003$) statistisch signifikant (Abbildung 26, E und F).

Die Analyse der *shape-individuality* ergab vor Infarkt für die genetisch unveränderten Tiere 0,17 % deformierte Schläge und für die mutierten Mäuse 0,20 %. Ein deutlicher Unterschied war damit nicht nachweisbar ($p = 0,7$). In der 1. Woche nach Infarkt waren die Ergebnisse der *shape-individuality* in beiden Gruppen weiterhin vergleichbar ($p = 0,91$). Dies änderte sich auch in der 2. Woche nach Infarkt nicht ($p = 0,38$).

Anhand der semi-automatischen Auswertung ließ sich das in der Literatur (Nuyens et al., 2001) beschriebene vermehrte Auftreten von Rhythmusstörungen bei SCN5aD-Mäusen kaum nachvollziehen. Der Unterschied in den Arrhythmie-Parametern von nicht infarzierten Tieren verglichen mit genetisch unveränderten Tieren, der in der geblindeten, graphischen Auswertung der Langezeit-EKG-Messungen festgestellt wurde, war in der statistischen Analyse nur in Tendenzen, unterhalb des Signifikanzniveaus, nachweisbar. Ein experimenteller Herzinfarkt durch Kryoläsion führte zwar zu einem vermehrten Auftreten von Arrhythmien verglichen mit nicht-infarzierten Tieren, der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ging allerdings weitestgehend verloren.

4. Diskussion

4.1 Lentivirale Modifikation von Zellen *in vitro* zur Zelltherapie

Ziel der durchgeführten Experimente war die Weiterentwicklung der Zelltherapie des Herzinfarktes mit dem Schwerpunkt einer Protektion vor post-Infarkt Arrhythmien.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden primäre Skelettmuskelzellen aus embryonalen und adulten Mäusen kultiviert, das Kopplungsprotein Cx43 durch lentivirale Transduktion stabil in diesen Zellen exprimiert, und diese Zellen in den Infarkt von Mäusen implantiert. Skelettmuskelzellen wurden aufgrund der folgenden Eigenschaften schon früh als vielversprechende Zellquelle zur Therapie des Myokardinfarktes betrachtet (Murry et al., 1996):

- als kontraktile Zellen sind sie elektrisch erregbar.
- sie können autolog durch Muskelbiopsien gewonnen werden.
- ein hohes Proliferationspotential erlaubt eine Vermehrung *in vitro*.
- als natürliche Muskelvorläuferzellen haben Myoblasten ein sehr geringes Risiko der Tumorgenese.

Der Effekt der Therapie des Herzinfarktes durch die Implantation von Skelettmuskelzellen wurde sowohl in tierexperimentellen, als auch in klinischen Studien am Menschen (Murry et al., 2005) untersucht und wird weiterhin kontrovers diskutiert (Barnett und van den Hoff, 2011): Durch die fehlende elektrische Kopplung der in den Infarkt implantierten Skelettmuskelzellen mit nativen Kardiomyozyten kommt es zu einem vermehrten Auftreten von, teils lebensbedrohlichen, Herzrhythmusstörungen (Gepstein et al., 2010). Embryonale Kardiomyozyten, als alternative Zellquelle, dagegen sind zu einer interzellulären, elektrischen Kopplung durch Connexine in der Lage und führten im Tiermodell zu einer verminderten Mortalität, verbesserten Pumpfunktion und einer geringeren Vulnerabilität gegenüber induzierten Herzrhythmusstörungen nach einem Herzinfarkt (Roell et al., 2007). Da diese Zellen aus embryonalem Gewebe gewonnen werden, ist eine klinische Anwendung aus ethischen Gründen nicht möglich.

Um den pro-arrhythmogenen Effekt von Skelettmuskelzellen und die ethische Problematik von embryonalen Kardiomyozyten zu umgehen, wurden in vorangegangenen Studien genetisch modifizierte Skelettmuskelzellen erfolgreich transplantiert (Roell et al., 2007). Diese Muskelzellen wurden aus transgenen Mäusen gewonnen, die Cx43 unter einem

Skelettmuskel-spezifischen Promotor exprimieren. Dadurch war eine elektrische Koppelung zwischen den implantierten skelettalen Zellen und den Herzmuskelzellen möglich. Die Vulnerabilität gegenüber induzierten Herzrhythmusstörungen wurde in den behandelten Tieren dadurch auf das Niveau von gesunden Tieren gesenkt. Da transgene Modelle für den Menschen natürlich nicht genutzt werden können, ist es notwendig, eine andere Methode zur Generierung von genetisch veränderten Zellen zu etablieren. In dieser Arbeit wurden daher Lentiviren genutzt, um Cx43 durch Transduktion in Myoblasten von embryonalen und adulten Mäusen einzubringen. Generell birgt die genetische Modifikation durch virale Genfähren *in vivo* folgende Risiken und Probleme:

1. Auf die eingebrachten, körperfremden Viren kann eine immunologische Reaktion des Empfänger-Organismus erfolgen, die zu einem Untergang der transduzierten Zellen und zum Misserfolg der Therapie führt.
2. Eine Induktion von Tumorwachstum durch Aktivierung von Protoonkogenen bei der Integration des Virus in die DNA ist möglich.
3. Toxische Effekte, zum Beispiel durch eine zu hohe Viruslast, sind möglich.
4. Das Resultat der genetischen Modifikation kann bei fehlender Integration in das Wirts-Genom, wie sie zum Beispiel bei Adeno-assoziierten Viren (AAV) vorkommt, transient und von kurzer Dauer sein.

Trotz dieser Hindernisse wurde die virale Gentherapie verschiedener Erkrankungen schon in einigen Studien am Menschen *in vivo* angewendet (Sheridan, 2011). Der erste erfolgreiche Gentransfer in den USA fand im September 1990 statt (Blaese et al., 1995). Kinder mit einem schweren, kombinierten Immundefekt (SCID) wurden mit Retroviren behandelt, was zu einem Rückgang der klinischen und laborchemischen Krankheitsparameter führte.

Im Zusammenhang mit Studien zur viralen Gentherapie *in vivo* kam es allerdings auch zu gravierenden Nebenwirkungen. Der erste Fall ist der des 18-jährigen Jesse Gelsinger im Jahr 1999. Er nahm an einer klinischen Phase-I-Studie zur Ornithin-Transcarboxylase-Defizienz teil und starb an Multiorganversagen, ausgelöst durch eine immunologische Reaktion 4 Tage nach der Behandlung mit Adenoviren.

In einer Studie von 2003 zur Gentherapie des schweren kombinierten Immundefekts (SCID) von Kindern induzierte die Therapie bei mehreren Patienten eine Leukämie, die in einem Fall tödlich verlief. Ursache für das Auftreten von hämato-onkologischen Tumo-

ren nach viraler Gentherapie war die Integration des Virus in verschiedene Protoonkogene wodurch es zu einer unkontrollierten Proliferation der betroffenen T-Zellen kam (Hacein-Bey-Abina et al., 2008). In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die verwendeten Viren-Typen (γ -Retrovirus) bevorzugt in Promotor-Regionen von aktiven Genen integrieren und so die Wahrscheinlichkeit einer verstärkten Expression von Protoonkogenen erhöht ist (Cavazza et al., 2013).

Um solche negativen Folgen einer viralen Therapie *in vivo* zu verhindern und trotz der genannten Risiken das Potential der viralen Gentherapie zu nutzen, wurde in dieser Arbeit der lentivirale Gentransfer *in vitro*, also außerhalb des Körpers, im "Reagenzglas", durchgeführt. Auf diese Weise kommt es zu keinem direkten Kontakt zwischen Virus und Empfänger. Die genetisch veränderten Zellen werden erst nach Abwaschen der Viruspartikel in den Empfänger-Organismus eingebracht. Dadurch können viele Risiken, wie eine immunologische Reaktion auf Virusprotein oder eine Virus-assoziierte Toxizität, umgangen werden.

In dieser Arbeit wurden Lentiviren gewählt, da diese stabil in das Empfänger-Genom integrieren, und lang anhaltende Genexpression gewährleisten. Ein besonderer Vorteil ist, dass auch nicht proliferierende Zellen transduziert werden (Pfeifer et al., 2001). In der Zellkultur von Skelettmuskelzellen aus Mäusen war auch 50 Tage nach lentiviraler Transduktion Fluoreszenz von viral eingebrachtem eGFP vorhanden. Es wurde kein Hinweis auf eine Induktion von Tumoren durch Transplantation transduzierter Zellen (adulte und embryonale Skelettmuskelzellen) gefunden. Eine alternative, virale Genföhre für die Transduktion von Skelettmuskelzellen könnten Adeno-assoziierte Viren darstellen (Gruntman et al., 2013). Demgegenüber bietet ein Lentivirus-basierter Gentransfer allerdings die Möglichkeit Genprodukte größer als 5 kb zu transduzieren und vor allem eine stabile und damit lebenslange Integration in das Empfänger-Genom (High et al., 2014). Gerade im Bezug auf eine antiarrhythmische Therapie mit genetisch veränderten Skelettmuskelzellen ist eine stabile Transduktion der Zellen eine wichtige Voraussetzung für die Sicherheit des Verfahrens. Ein Verlust des künstlich eingebrachten Kopplungsproteins Cx43 würde dazu führen, dass die nicht koppelnden Skelettmuskelzellen einen proarrhythmischen Effekt ausüben könnten und deshalb die Patienten prophylaktisch mit einem implantierten Defibrillator versorgt werden müssten um einen plötzlichen Herztod durch Arrhythmien zu verhindern (Menasché et al., 2008). Ein sol-

cher zusätzlicher Eingriff würde ein unverhältnismäßiges Risiko für den Patienten darstellen (erhöhtes Risiko für Infektionen, Wundheilungsstörungen und Gerätefehlfunktionen).

Die Methode des lentiviralen Gentransfers *in vitro* erwies sich in dieser Arbeit als sichere Möglichkeit der genetischen Modifikation von embryonalen und adulten, murinen Skelettmuskelzellen für die Zelltherapie des Herzinfarktes und führte im beobachteten Zeitraum zu stabiler, funktioneller Expression des Kopplungsproteins Cx43. Weiterhin wurden zur Vorbereitung einer möglichen klinischen Anwendung erste Transduktionsversuche an Zellen vom Großtiermodell durchgeführt.

Vor einer zukünftigen Anwendung am Menschen sind noch weitere tierexperimentelle Studien notwendig, die die praktische Anwendbarkeit, Effizienz und potentielle Nebenwirkungen dieser Therapie genauer untersuchen.

4.2 Die neue Methode der lokalen Einzelzellelektroporation

Die elektrische Kopplung zwischen Zellen spielt eine wichtige Rolle für die Protektion vor Arrhythmien nach einem Herzinfarkt. Um die funktionelle Kopplung zwischen den verwendeten, genetisch modifizierten Skelettmuskelzellen zu beweisen, wurde die neue Methode der lokalen Einzelzellelektroporation etabliert. Der Transfer von Farbstoff, der über eine Mikroelektrode gezielt und schonend eingebracht wurde, zeigte eine erfolgreiche Kopplung der Zellen über das lentiviral eingebrachte Cx43 an.

Zum Nachweis dieser Kopplung zwischen Zellen sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben: elektrische Messungen mit Mikroelektroden an benachbarten Zellen können Aufschlüsse über den Grad der Konnektivität zwischen den Zellen liefern (Loewenstein, 1979). Farbstofftransfer-Messungen werden als Nachweis von Zell-Zell-Verbindungen angewendet. Das Einbringen des Farbstoffes in die Zelle erfolgt dabei entweder durch Mikroinjektion (Enomoto et al., 1984), die *patch-clamp*-Technik (Roell et al. 2007) oder sogenanntes *scrape-loading*, wobei jeweils die Zellmembran mechanisch zerstört wird, um den Farbstoff in die Zelle zu bringen (El-Fouly et al., 1987). Durch den mechanischen Stress, dem die Zellmembran ausgesetzt wird, kann es zum Zelltod kommen, so dass eine weitere Kultivierung und Langzeitbeobachtung nicht möglich ist. Die Technik des *scrape-loading* erlaubt keine Analyse von isolierten Zellen, sondern nur von größeren Zellverbänden und kann nur bei Zellen durchgeführt werden, die als dichte

ter Zellrasen (*monolayer*) wachsen. Daher ist eine Analyse bei geringen Zellzahlen oder Zellen, die keinen Zellrasen bilden, limitiert.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode der lokalen Einzelzellelektroporation hingegen ermöglicht durch eine schonende, lokale elektrische Permeabilisierung der Zellmembran, eine Farbstoffanreicherung in der einzelnen Zielzelle, ohne die Zellmembran dauerhaft zu verletzen. Da die Zelle mechanisch nicht beeinflusst wird, ist eine Langzeitkultivierung möglich. Auch können selektiv einzelne Zellen untersucht werden. Daher sind nur geringe Zellmengen nötig und ein Zellrasen muss nicht zwingend vorliegen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Farbstoffen mit unterschiedlicher Molekülgröße ist es weiterhin möglich, eine Cx-vermittelte Kopplung über *Gap junctions* von anderen Arten der interzellulären Kopplung, wie beispielsweise zytoplasmatischen Brücken, zu unterscheiden (Su et al., 1990). Die lokale Einzelzellelektroporation konnte in der vorliegenden Arbeit eine funktionelle Kopplung über lentiviral eingebrachtes Cx43 in murinen Skelettmuskelzellen beweisen. In ersten Pilotexperimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass mittels Einzelzellelektroporation lokale, genetische Manipulationen in Zellpopulationen möglich sind.

Dies kann als Grundlage dienen, um in zukünftigen Experimenten an kardialen Zellen lokal Gene zu untersuchen, die in die Schrittmachergenerierung involviert sind, wie zum Beispiel die HCN-Kanal-Gruppe (Bucchi et al., 2006).

4.3 EKG-Messungen an Mäusen

Ein therapeutisches Ziel der Behandlung des Herzinfarktes ist die Verhinderung von Herzrhythmusstörungen. Die pathophysiologische Grundlage dieser post-Infarkt-Arrhythmien liegt in der Ausbildung kreisender Erregungen oder arrhythmischer Herde in der Randzone des ischämischen Areals (de Bakker et al., 1993). Diese sich selbst erhaltende, kardiale Erregung kann zu Kammertachykardien bis hin zum Kammerflimmern, mit drohendem Herz-Kreislaufversagen, führen (Di Diego und Antzelevitch 2011).

Um diese Mechanismen und mögliche therapeutische Ansätze zu untersuchen, werden verschiedene experimentelle Methoden angewendet: *In vitro* können die elektrophysiologischen Grundlagen von Arrhythmien an isolierten Herzmuskelzellen, beispielsweise Membranströme über einzelne Kanalproteine oder verschiedene metabolische, hypoxische und pharmakologische Einflussfaktoren, untersucht werden (Morita et al.,

2009). *Ex vivo* Messungen an Herzen, die nach Langendorff perfundiert werden (Zimmer 1998), erlauben eine genaue Analyse der Erregungsausbreitung über das (ischämische) Myokard. Auf diese Weise sind extra-korporale Untersuchungen von pharmakologischen Effekten möglich (Efimov et al., 2004).

Um das Auftreten von Arrhythmien *in vivo* zu untersuchen, können verschiedene Methoden angewendet werden: Die Vulnerabilität des Herzens gegenüber induzierten Arrhythmien wird mittels intrakardialer Elektrostimulation über einen Herzkatheter (elektrophysiologische Untersuchung) bestimmt (Roell et al., 2007). Ein Vorteil dieser Methode ist die standardisierte, elektrische Stimulation des Herzens nach einem festgelegten Protokoll, wodurch ventrikuläre Rhythmusstörungen (ventrikuläre Tachykardien) ausgelöst werden sollen (Kreuzberg et al., 2006). Diese Untersuchung ist jedoch zeitaufwendig und invasiv, da eine Narkotisierung des Tieres und die operative Einführung des Herzkatheters notwendig ist. Nach der Untersuchung wird das Tier in der Regel geopfert. Außerdem ist die Vulnerabilität gegenüber induzierten Arrhythmien nicht direkt gleichzusetzen mit dem Auftreten von spontanen Herzrhythmusstörungen, wie sie beim Menschen in 95-100 % der Fälle nach einem Herzinfarkt auftreten. Die invasive elektrophysiologische Untersuchung ist daher auch beim Menschen das letzte Glied einer Reihe von diagnostischen Schritten zur Analyse des Arrhythmiepotentials, an deren Anfang das Oberflächen- und Langzeit-EKG steht. Das spontane Auftreten von Arrhythmien im Mausmodell wurde deswegen im Rahmen dieser Arbeit durch diese zwei verschiedene Techniken der EKG-Messung untersucht: Die Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs über die Pfoten der Mäuse und die Ableitung eines Langzeit-EKGs über mehrere Wochen durch ein implantierbares System.

Die Messung des Oberflächen-EKGs über die Pfoten der Tiere ist eine relativ einfach durchzuführende Methode, die kosten- und zeiteffizient machbar ist (Chu et al., 2001). Durch die Aufzeichnung von mehreren standardisierten Ableitungen ermöglicht sie eine genaue, morphologische Analyse des EKG-Signals. Desweiteren können durch den Verzicht auf eine Narkose Anästhesie-induzierte Effekte ausgeschlossen werden (Hamlin et al., 2003). Aufgrund der begrenzten Aufnahmezeit durch die stark einschränkende Fixierung der Tiere lässt sich mit dieser Technik die elektrische Aktivität des Herzens allerdings nur über einen relativ kurzen Zeitraum (ca. 1 h) beurteilen. Durch die Fixie-

rung in der EKG-Röhre (siehe Abbildung 2) stehen die Tiere, vor allem zu Beginn der Messung, unter Stress, wodurch es zu einer erhöhten Herzfrequenz kommt.

Um das EKG von Mäusen über einen langen Zeitraum (mehrere Wochen) zu beurteilen (ohne dass die Aufzeichnungsmethode Einfluss auf die Messergebnisse hat), wurde ein implantierbares telemetrisches System genutzt (Kramer und Kinter, 2003). Mit dieser bislang so nicht beschriebenen Langzeit-Methode konnte das EKG von sich frei bewegenden Mäusen kontinuierlich über 4-5 Wochen aufgezeichnet werden, ohne die Tiere in ihrem Verhalten zu beeinflussen. Die Messungen fanden unter physiologischen Bedingungen statt und erlaubten eine lückenlose Beurteilung der elektrischen Aktivität des Herzens im Zeitverlauf, wobei es zu keinen Stress-induzierten Artefakten kam (Kramer et al., 1993).

Die Implantation des EKG-Transmitters stellt allerdings einen zeitaufwendigen, invasiven Eingriff dar. Die Mäuse verlieren aufgrund von verminderter Nahrungsaufnahme zunächst an Gewicht, bevor sie sich nach einigen Tagen vollständig erholen (Kramer et al., 1993). Da die verwendeten telemetrischen Transmitter über zwei Ableitungselektroden verfügen, kann außerdem nur eine einzige bipolare Ableitung aufgezeichnet werden. Daher ist die spätere EKG-Analyse im Vergleich zum Mehrkanal-EKG limitiert.

Die charakteristischen Eigenschaften der verwendeten EKG-Systeme bedingen generell unterschiedliche Anwendungsbereiche: Die Aufzeichnung des Oberflächen-EKGs mit der EKG-Röhre eignet sich vor allem zur qualitativen EKG-Analyse zu definierten Zeitpunkten vor und nach Therapie. Aufgrund der hohen Signalqualität mit mehreren Ableitungen ist eine morphologische EKG-Analyse, wie zum Beispiel das Vermessen von Zeiten der Erregungsausbreitung und -rückbildung, gut möglich.

Die telemetrischen Langzeit-EKG-Messungen sind gut geeignet, um quantitative Untersuchungen der elektrischen Herzaktivität durchzuführen und das Auftreten von spontanen Herzrhythmusstörungen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Um von den Vorteilen der Techniken zu profitieren, wurden in dieser Arbeit erstmals beide Systeme kombiniert verwendet.

4.4 Die Entwicklung einer semiautomatischen Analyse-Software für Langzeit-EKG-Messungen an Mäusen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig kontinuierlich über 4 bis 5 Wochen aufgezeichnete, telemetrische Langzeit-EKG-Messungen zur Quantifizierung von spontanen Herzrhythmusstörungen und zur Evaluation des antiarrhythmogenen Potentials der Zellersatztherapie des Herzinfarktes angewendet.

Aufgrund der großen Datenmenge stellt die Analyse der gespeicherten EKG-Daten bei durchgehenden Messungen über mindestens 4 Wochen eine große Herausforderung dar. Die in Abschnitt 1.3 beschriebenen Unterschiede des murinen EKGs zur elektrischen Aktivität des humanen Herzens (Frequenz, QRS-Morphologie) verhindern die Verwendung humaner EKG-Analyse-Software. Die kommerziellen Software-Lösungen zur Analyse des EKGs von Mäusen waren nach Test-Untersuchungen mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht geeignet, um Langzeit-Untersuchungen auszuwerten. Für einige Programme stellte die Größe der aufgezeichneten Dateien von ca. 1 Gb pro Maus und Tag ein Problem dar (zum Beispiel ecgAUTO, emka Technologies). Bei anderen Programmen war die Möglichkeit der (halb-) automatischen Analyse der EKG-Daten nicht gegeben und die Untersuchung der Aufzeichnungen war ausschließlich manuell möglich (zum Beispiel LabChart mit ECG-Module, ADInstruments). Bei einer durchschnittlichen Herzfrequenz von 600-650 Schlägen pro Min. und einem Beobachtungszeitraum von 4 - 6 Wochen (entspricht ca. 3024000 QRS-Komplexen pro Maus) boten diese Systeme, aufgrund der zeitaufwendigen manuellen EKG-Analyse keine Alternative, eine ausreichende Anzahl an Tieren zu untersuchen.

Programme, die in der Lage waren die großen EKG-Dateien zu lesen und eine halb-automatische Analyse erlaubten (zum Beispiel Ponemah, DSI), arbeiteten mit Bibliotheken von Beispiel-QRS-Komplexen, die vor Analyse des EKGs zusammengestellt werden mussten, um dem Programm „Richtwerte“ vorzugeben. Anhand dieser erfolgte ein Vergleich mit dem zu analysierenden EKG und eine Klassifikation in arrhythmische Ereignisse. Trotz des zeitaufwendigen Erstellens dieser Bibliotheken kam es zu einer hohen Rate an falsch beurteilten Ereignissen. So war diese Art der Analyse anfällig für Artefakte durch Muskelaktivität und auch die in Abschnitt 3.4.3.2 beschriebene Vektoränderung des QRS-Komplexes durch eine Verschiebung der ableitenden Elektroden zueinander führte zu häufigen Fehlern.

Die „Systole“ Software ist in der Lage sehr große Dateien zu verrechnen und die neu etablierten Parameter der *time-* und *shape-individuality* für einzelne QRS-Komplexe erlauben eine Umgebungs-abhängige Beurteilung des EKGs und ermöglichen so, durch Anpassung der Analyseparameter des Programms an Ausschnitte des EKGs, eine flexible Abstimmung auf die Signalqualität.

In das „Systole“ Programm wurde weiterhin eine automatische Funktion zur Berechnung des Prozentsatzes an Auffälligkeiten mit verschiedenen Grenzwerten integriert. Initial wurden mit dieser Funktion in der manuellen Evaluation der Ergebnisse optimale Grenzwerte für beide Parameter ermittelt, die anschließend für alle weiteren EKG-Analysen verwendet werden konnten.

Die „Systole“ Software bietet neben der Berechnung und Analyse der gesamten Langzeit-EKG-Daten auch die Möglichkeit auf der Ebene einzelner QRS-Komplexe Bewertungen vorzunehmen und die Schläge in Kategorien einzuordnen. Damit erlaubt das „Systole“ Programm eine schnelle, semiautomatische Verarbeitung und Analyse des telemetrischen Langzeit-EKGs mit variablen Parametern.

In bisherigen Studien zum EKG und zu Herzrhythmusstörungen bei Mäusen (Kramer und Kinter 2003; Farraj et al., 2011) fanden telemetrische Systeme mehrfach Verwendung zur Aufzeichnung des murinen EKGs, allerdings blieb die Anwendung meist auf kurze Zeitintervalle beschränkt und das EKG wurde nicht kontinuierlich aufgezeichnet. So wurde zum Beispiel in einer Studie von Betsuyaku et al. aus dem Jahr 2004 das Auftreten von Arrhythmien nach einem Herzinfarkt mittels eines implantierbaren EKG-Systems untersucht (Betsuyaku et al., 2004). Mäusen wurde ein experimenteller Myokardinfarkt durch Ligatur des Ramus interventrikularis anterior (Ast der linken Koronararterie) zugefügt. 2 Tage nach Infarkt wurde den Tieren ein telemetrischer Transmitter implantiert und das EKG der Mäuse an Tag 3, 4, 6 und 7 nach Infarkt aufgezeichnet. Die Aufzeichnungen erfolgten dabei über 4 Min. im halbstündigen Intervall über 24 Std. (insgesamt 192 Min. pro Tag). In dieser Studie zeigten Mäuse nach Herzinfarkt vermehrt Rhythmusstörungen (vor allem ventrikuläre Extrasystolen, aber auch spontane ventrikuläre Tachykardien), ohne dass ein statistisches Signifikanzniveau erreicht wurde. Allerdings konnten Kramer et al. schon 1993 zeigen, dass durch die Implantation des Transmitters an Tag 2 nach Infarzierung der Tiere die Messergebnisse verfälscht werden (Kramer et al., 1993). In der von Betsuyaku et al. durchgeführten Studie geben die

aufgezeichneten EKG-Episoden nur einen kleinen Bruchteil (192 Min. pro 24 Std., entspricht 13,3 % pro Tag, an 4 von 7 Tagen) der Herzaktivität während der Experimente wieder. Eine derartig unterbrochene Aufzeichnung erlaubt, im Vergleich zu einer kontinuierlichen Aufzeichnung und Analyse des EKGs, nur eine unvollständige Beurteilung des Auftretens von Herzrhythmusstörungen.

In der Studie von Betsuyaku et al., 2004 wurde das Auftreten von Arrhythmien bei genetisch veränderten Mäusen untersucht, die heterozygot für eine nicht-funktionale Cx43-Mutation waren und dadurch weniger Cx43 exprimierten als genetisch unveränderte Tiere. Diese Mäuse wurden mit Wild-Typ-Mäusen (Stamm: C57BL/6) verglichen. Die Inzidenz von ventrikulären Extrasystolen (VES) bei Wild-Typ-Tieren ohne Infarkt wird mit 0,4 VES pro Std. angegeben. Dies entspricht bei einer normalen Herzfrequenz von ca. 650 Schlägen pro Min. ca. 0,001 % der Schläge. In dem beobachteten Zeitraum von 192 Min. pro Tag wären somit 1 - 2 VES zu erwarten. Eine statistische Signifikanz ist dabei zweifelhaft.

In der vorliegenden Arbeit wurden für nicht infarzierte Tiere (Stamm: CD1) zwischen 0,23 % (702 VES/Std. nach *shape-individuality*) und 1,8 % (90 VES/Std. nach *time-individuality*) arrhythmische Ereignisse über den Zeitraum von einer Woche ermittelt.

6 Tage nach Infarkt geben Betsuyaku et al. ca. 0,0125 % (4,9 VES/Std.) an. In den in dieser Arbeit durchgeführten kontinuierlichen Langzeit-EKG-Messungen von einer gesamten Woche nach Infarkt wurden zwischen 0,3 % (117 VES/Std. nach *shape-individuality*) und 2,2 % (858 VES/Std. nach *time-individuality*) auffällige Schläge in der semiautomatischen Analyse detektiert.

Auch wenn ein direkter Vergleich der Daten von Betsuyaku et al., 2004 und den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten aufgrund des Studiendesigns nur teilweise möglich ist, fällt bei der semiautomatischen Analyse der Langzeit-EKG-Daten eine höhere Inzidenz an auffälligen Ereignissen auf. Aufgrund der stichprobenartigen, diskontinuierlichen EKG-Aufzeichnung und Analyse bei Betsuyaku et al. kann es, im Vergleich zur kontinuierlichen EKG-Messung in dieser Arbeit, zu einer unvollständigen Beurteilung von Arrhythmien kommen. Eine weitere Erklärung ist möglicherweise der semiautomatische Analyse-Algorithmus des „Systole“ Programms, der selbst bei optimaler Einstellung teilweise auch Artefakte als auffällige Ereignisse markiert. Dies ist bei einer manuellen Auswertung (wie bei Betsuyaku et al.) seltener der Fall. Auch die Verwendung eines

anderen Mausstamms (C57BL/6 vs. CD1) könnte leichte Unterschiede in den Ergebnissen erklären (Wehrens et al., 2000; Appleton et al., 2004). Der größte Unterschied liegt sicherlich im ungleichen Studiendesign: mit verschiedenen Zeitpunkten der Transmitter-Implantation (2 Tage nach Infarkt vs. 2 Wochen vor Infarkt), der Art des Myokardinfarktmodells (Ligatur vs. Kryoinfarzierung), sowie der Methode der EKG-Messungen.

In der vorliegenden Arbeit war teilweise ein statistisch signifikanter Unterschied im Auftreten von spontanen Herzrhythmusstörungen vor und nach Infarkt nachweisbar. Die Inkonsistenz dieses Ergebnisses kann mit einer hohen experimentellen Variabilität und geringen Versuchszahlen erklärt werden.

Insgesamt erwies sich das semiautomatische EKG-Analyse Programm „*Systole*“ in der vorliegenden Arbeit aber als praktikables Mittel, um das kontinuierliche Langzeit-EKG von Mäusen über Wochen zu verarbeiten. Das Auftreten von spontanen, arrhythmischen Episoden *in vivo* konnte an nicht fixierten Mäusen, ohne Einfluss von Narkotika, untersucht werden.

4.5 Bewertung des arrhythmogenen Potentials mit Hilfe des selbstentwickelten „*Systole*“ Programms

Mit dem selbstentwickelten „*Systole*“ Programm wurde das arrhythmogene Potential nach Herzinfarkt in Langzeit-EKG-Messungen an Mäusen untersucht und ein protektiver Effekt der Zellersatztherapie analysiert.

Die Auswertungen dieser Messungen zeigten in der Kontrollgruppe ohne Zelltherapie nach Infarkt einen statistisch signifikanten Anstieg der arrhythmischen Ereignisse, verglichen mit gesunden Tieren. Bei den mit embryonalen Kardiomyozyten behandelten Tieren ließ sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu nicht-infarzierten Tieren nachweisen. Allerdings gab es zwischen den beiden Versuchsgruppen ebenfalls keine signifikanten Abweichungen im Auftreten von spontanen Arrhythmien (Abschnitt 3.4.3.3). Auffällig war eine deutlich erhöhte Mortalität in der unbehandelten Kontrollgruppe (3 von 8 Tieren) im Vergleich zur mit embryonalen Kardiomyozyten behandelten Versuchsgruppe (1 von 8 Tieren), wobei es bei keinem der vorzeitig verstorbenen Tieren nach Auswertung des EKG-Messungen zu tachyarrhythmischen Episoden zum Zeitpunkt des Ablebens kam. Es ist daher möglich, dass es in der Kontrollgruppe durch die erhöhte Sterberate zu einer Selektion von infarzierten Kontrolltieren gekommen ist, die auch oh-

ne Zelltherapie weniger Arrhythmien aufwiesen. Dies könnte eine Erklärung für die fehlende Signifikanz zwischen den beiden Gruppen sein. Unbehandelte Tiere mit vermehrten Arrhythmien würden demnach nach Infarkt frühzeitig versterben und wegen unvollständiger Datensätze aus der semiautomatischen Analyse ausgeschlossen werden. Um diese These zu untermauern, sind in Zukunft weitere Untersuchungen mit einer höheren Zahl an biologischen Replikaten notwendig.

Eine Limitation des aktuellen „*Systole*“ Programms sind artefaktreiche Messungen durch elektrisches Rauschen. Es resultiert ein falsch-positives Erkennen von Arrhythmien, wodurch tatsächliche Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen überdeckt werden. In Zukunft könnte durch eine Verbesserung der Artefakt-Unterdrückung im „*Systole*“ Programm, zum Beispiel durch automatischen Ausschluss von stark gestörten EKG-Abschnitten, eine bessere Signalqualität des Langzeit-EKGs erreicht werden.

Um den Nutzen des „*Systole*“ Programms für die Erkennung von Arrhythmien genauer zu beurteilen, wurden weitere telemetrische Messserien an den unter Abschnitt 2.4 beschriebenen, genetisch veränderten Mäusen (SCN5aD-Tiere) durchgeführt. Diese Tiere sind als Krankheitsmodell für das lange QT-Syndrom etabliert und zeigen aufgrund einer heterozygoten Mutation im Gen für den kardialen SCN5A Natrium-Kanal (Deletion der Aminosäuren 1505-1507) spontane, polymorphe, ventrikuläre Arrhythmien (Nuyens et al., 2001). Die Auswirkungen dieser Mutation konnten in telemetrischen Langzeit-EKG-Messungen mit der semiautomatischen Analysefunktion des „*Systole*“ Programms in der Tendenz bestätigt werden, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte. Die heterozygoten SCN5aD-Tiere zeigten gegenüber den genetisch unveränderten Mäusen ein leicht vermehrtes Auftreten von arrhythmischen Ereignissen, sowohl nach dem Parameter der *time-* als auch der *shape-individuality* (siehe Abschnitt 3.4.3.5).

Mit dem „*Systole*“ Programm sind umfangreiche Langzeit-EKG-Untersuchungen an Mäusen mit einer semiautomatischen Analyse möglich. Weiterentwicklungen des „*Systole*“ Programms, vor allem zur Unterdrückung von Artefakten, würden für zukünftige Experimente die Anwendbarkeit erleichtern und die Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse steigern.

4.6 Verringerung spontaner Arrhythmien nach einem Herzinfarkt durch Implantation von Skelettmuskelzellen mit lentiviral eingebrachtem Cx43 in der Maus

In einer vorangegangenen Studie des Instituts für Physiologie I konnte der protektive Effekt von transplantierten, Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen vor induzierten Herzrhythmusstörungen nach einem Herzinfarkt im Mausmodell gezeigt werden. Die verwendeten Muskelzellen stammten aus genetisch veränderten Mäusen, die Cx43 in der Skelettmuskulatur exprimierten (Roell et al., 2007).

In Fortführung dieser Ergebnisse wurden in der vorliegenden Studie Skelettmuskelzellen aus genetisch unveränderten Tieren, in die Cx43 durch lentiviralen Gentransfer *in vitro* eingebracht wurde, für die Therapie des Herzinfarktes verwendet. Die geblindete, manuelle Analyse des Oberflächen-EKGs der infarzierten Tiere zeigte eine Woche nach Infarkt sowohl für Kontrolltiere mit einem Herzinfarkt und Skelettmuskelzellen ohne Cx43 ($p = 0,003$), als auch für Tiere denen Cx43-exprimierende Skelettmuskelzellen implantiert wurden ($p = 0,01$), ein deutlich vermehrtes Auftreten von arrhythmischen Ereignissen. Unmittelbar nach der Infarzierung war zwischen diesen Gruppen hingegen noch kein signifikanter Unterschied detektierbar (siehe Abschnitt 3.4.1.1). Die deutliche Zunahme von Arrhythmien in beiden Gruppen eine Woche nach Infarkt könnte der Induktion von Herzrhythmusstörungen durch das ischämische Areal entsprechen (Sabir et al., 2008). Der initial fehlende Unterschied zwischen den Gruppen ist möglicherweise durch den Zeitraum zu erklären, den die implantierten Zellen benötigen, um im Herzen anzuwachsen und elektrisch mit den vitalen Kardiomyozyten zu koppeln. Von Halbach et al. wurde 2007 in *in vitro* Studien beschrieben, dass murine, embryonale Kardiomyozyten, die in den Kryoinfarkt von Mäusen implantiert wurden, eine Woche nach Implantation noch nicht vollständig mit dem vitalen Myokard gekoppelt waren (Halbach et al., 2007). Roell et al. zeigten 2002 in *in vivo* Studien, dass der größte protektive Effekt von implantierten, embryonalen Kardiomyozyten, bezogen auf das Überleben der Tiere nach Herzinfarkt schon relativ früh (ca. Tag 2 - 8) nach Operation einsetzt und führen diesen Effekt vor allem auf die positive Auswirkung der implantierten Zellen auf die Narbenentwicklung zurück (Roell et al., 2002). Eine Untersuchung des spontanen, arrhythmischen Potentials, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, fand allerdings in beiden Studien nicht statt.

Ein ähnlich verzögertes Einsetzen der antiarrhythmogenen Wirkung der Zelltherapie, wie in Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben, war bei Implantation von genetisch veränderten, embryonalen Skelettmuskelzellen in den Herzinfarkt von Mäusen zu beobachten. Zwei Wochen nach Infarkt sank die Rate der Herzrhythmusstörungen von Tieren, die mit Cx43-positiven Skelettmuskelzellen behandelt waren, auf das Niveau gesunder Tiere ab (siehe Abbildung 19). Tiere, die einen Herzinfarkt ohne Behandlung erhielten, zeigten dagegen weiterhin mehr spontane Arrhythmien als gesunde Tiere, wobei der Unterschied zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant war.

Auch in Langzeit-EKG-Messungen an infarzierten Mäusen, die mit Skelettmuskelzellen mit oder ohne lentiviral eingebrachtem Cx43 behandelt wurden, waren in der Therapiegruppe tendenziell weniger auffällige Ereignisse zu detektieren (vgl. Abschnitt 3.4.3.4). Diese Ergebnisse lagen im Vergleich zu Kontrolltieren unterhalb des statistischen Signifikanzniveaus. Der Unterschied war nach dem Parameter der *time-individuality* ausgeprägter als nach der *shape-individuality*. Dies lässt sich einerseits durch die unterschiedliche Sensitivität der beiden Werte erklären, andererseits mit der ungleichen Empfindlichkeit der Algorithmen auf Artefakte: Beim Auftreten einzelner Artefakte, die von der Trigger-Erkennung erkannt werden, haben diese Artefakte sowohl eine hohe *time*- als auch *shape-individuality* und werden fälschlicherweise vom Programm nach beiden Parametern als Arrhythmie detektiert. Wird das EKG-Signal hingegen über einen längeren Zeitraum (> 5 Sek.) beispielsweise durch Bewegungsartefakte gestört, so dass die Trigger-Erkennung viele Artefakte markiert, werden über die Grenzwert-Funktion der *time-individuality* alle Trigger mit einem Wert über dem vorgegebenen Grenzwert als auffällig markiert. Im Gegensatz dazu passt die variable Grenzwert-Erkennung der *shape-individuality* den Grenzwert dem durchschnittlichen Niveau der *shape-individuality*-Werte der umgebenden Trigger an. Der Grenzwert wird dadurch in Bereichen erhöht, in denen, beispielsweise durch Rauschen, ein hohes Grundniveau vorliegt. Die *shape-individuality* ist also durch die variable Grenzwert-Erkennung weniger anfällig gegenüber artifiziell Rauschen von längerer Dauer (> 5 Sek.). Dies erklärt das generell etwas niedrigere Niveau der so erkannten Ereignisse.

Die Langzeit-EKG-Messungen mit anschließender semiautomatischer Analyse mit dem selbstentwickelten „Systole“ Programm zeigten also tendenziell ein vermindertes Auftreten von spontanen Herzrhythmusstörungen durch die Implantation von Skelettmuskel-

zellen mit lentiviral eingebrachtem Cx43 in den Herzinfarkt von Mäusen. In der Beurteilung der Daten bewies sich das „Systole“ Programm als wertvolles Mittel zur semiautomatischen EKG Auswertung.

Im Anschluss an die EKG-Messungen wurden die Tiere 2 Wochen nach Infarkt einer elektrophysiologischen Untersuchung unterzogen (Durchführung durch A. Klein und W. Roell). In Tieren, denen Cx43 transduzierte Skelettmuskelzellen transplantiert wurden, ließen sich deutlich weniger ventrikuläre Tachykardien auslösen als in Kontrolltieren. Durch die Transplantation von Wildtyp-Skelettmuskelzellen, die in-vitro lentiviral zur Expression von Cx43 befähigt wurden, ließ sich der Effekt auf die Senkung der Arrhythmie neigung nach Infarkt durch Transplantation von Skelettmuskelzellen aus Cx43 transgenen Mäusen (Roell et al., 2007) reproduzieren.

In einer parallel durchgeführten Arbeit an Ratten von Fernandes et al. wurde ebenfalls versucht mit Hilfe der Überexpression von Cx43 in Skelettmuskelzellen die Inzidenz ventrikulärer Tachykardien nach Herzinfarkt zu erniedrigen, es wurde jedoch keine signifikante Reduktion beobachtet (Fernandes et al., 2009). Diese Studie ist nur schwer mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimenten vergleichbar, da der methodische Ansatz sehr unterschiedlich ist: Es kommen adulte Skelettmuskelzellen zum Einsatz, lentiviral-transduzierte Muskelzellen sind nicht mit Hilfe eines Fluoreszenzmarkers markiert, es fehlt der eindeutige Nachweis der Cx43 Transduktion/Expression und insbesondere der funktionelle Kopplungsnachweis zwischen Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen. Ferner erfolgt die Transplantation der Zellen erst eine Woche nach Infarzierung und auch die funktionellen VT-Analysen unterscheiden sich: Es fehlen zum Beispiel Untersuchungen an nicht-infarzierten Tieren und infarzierten Tieren ohne Therapie als Kontrollgruppen, die für eine präzise Aussage bzgl. pro- oder antiarrhythmogenem Potential der Zelltherapie erforderlich erscheinen.

Trotzdem lassen sich in der entsprechenden Abbildung (Figure 4) der Publikation von Fernandes et al. Hinweise auf eine niedrigere Inzidenz von induzierten Arrhythmien bei Tieren finden, die mit Cx43-exprimierenden Skelettmuskelzellen behandelt wurden, verglichen mit Kontrolltieren (ca. 48 % vs. ca. 64 %).

Das Fehlen eines signifikanten Effekts könnte an dem oben beschriebenen Vorgehen von Fernandes et al. liegen und bedeutet keinen Widerspruch zu den Daten von Roell et al., 2007 und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Auf der Grundlage dieser Resul-

tate sind zukünftig weitere Studien für eine klinische Anwendung der Zelltherapie des Herzinfarktes notwendig.

5. Zusammenfassung

Als Folge der myokardialen Ischämie durch einen Herzinfarkt gehen Kardiomyozyten zugrunde und neben einer Herzinsuffizienz können lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen wie Kammertachykardien und Kammerflimmern auftreten. Um das durch den Infarkt zerstörte Gewebe zu ersetzen, sind in der Vergangenheit Zelltransplantationen durchgeführt worden. Wenig untersucht war bislang jedoch, ob die transplantierten Zellen auch die Gefahr von Rhythmusstörungen senken können.

Durch elektrophysiologische Katheter-Untersuchungen an Mäusen konnte am Institut für Physiologie I (Roell et al., 2007) gezeigt werden, dass die Zelltherapie mit elektrisch koppelnden Zellen die Vulnerabilität gegenüber induzierten Herzrhythmusstörungen deutlich senkt. Dabei erwiesen sich Skelettmuskelzellen aus transgenen Mäusen, die das „Kopplungs-Protein“ Cx43 überexprimieren, ähnlich wirkungsvoll wie embryonale Kardiomyozyten. In der vorliegenden Arbeit wurden in einem weiterentwickelten Ansatz, mit dem Ziel der späteren klinischen Anwendung, allogene Skelettmuskelzellen (sowohl embryonale als auch adulte) aus genetisch unveränderten Tieren für Transplantationsexperimente verwendet, in die Cx43 mittels lentiviraler Transduktion *in vitro* eingebracht wurde.

Die Funktionalität des Cx43-Konstruktes wurde mittels immunhistologischen Methoden untersucht und die Kopplung der Zellen *in vitro* durch Farbstofftransferexperimente nachgewiesen. Dazu wurde die neue Methode der lokalen Einzelzellelektroporation entwickelt, die das gezielte Einbringen von Substanzen in einzelne Zellen ermöglicht. Durch die Verwendung von Farbstoffen mit unterschiedlichen Molekulargewichten konnte eine interzelluläre Kopplung ausschließlich über Gap Junctions nachgewiesen und zytoplasmatische Brücken ausgeschlossen werden. Die Transplantation der mit Cx43 transduzierten Skelettmuskelzellen in den Herzinfarkt von Mäusen senkte die elektrische Vulnerabilität des Herzens in der elektrophysiologischen Untersuchung *in vivo* auf das Niveau von gesunden Tieren (invasive Experimente durchgeführt von A. Klein).

Neben der Auswirkung der Zellersatztherapie auf induzierte Herzrhythmusstörungen wurden insbesondere das Auftreten von spontanen, arrhythmischen Episoden *in vivo* mit zwei verschiedenen EKG-Ableitungsmethoden untersucht: eine Extremitätenableitung und eine Langzeit EKG-Messung unter Verwendung eines telemetrischen Systems. Zur

semiautomatischen EKG-Analyse wurde eine Software entwickelt, die die Quantifizierung von spontanen Arrhythmien erlaubt. Auch mit dieser Methode waren Hinweise auf einen antiarrhythmogenen Effekt der Zelltherapie des Herzinfarktes mit Cx43-positiven Skelettmuskelzellen erkennbar.

Die autologe, zelluläre Ersatztherapie nach Herzinfarkt stellt, bei Verwendung von elektrisch koppelnden Zellen, einen vielversprechenden Ansatz für eine zukünftige klinische Anwendung am Menschen dar. Die Verwendung von genetisch unveränderten Zellen, die *in vitro* lentiviral transduziert und anschließend erst für Implantationen verwendet werden, ist dabei ethisch unbedenklich sowie vermutlich nebenwirkungsarm.

6. Literaturverzeichnis

Agduhr E, Stenström N. The Appearance of the Electrocardiogram in Heart Lesions produced by Cod liver Oil Treatment. *Acta Paediatr* 1930; 10: 271–280

Appleton GO, Li Y, Taffet GE, Hartley CJ, Michael LH, Entman ML, Roberts R, Khoury DS. Determinants of cardiac electrophysiological properties in mice. *J Interv Card Electr* 2004; 11: 5–14

De Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Tasseron S, Vermeulen JT, de Jonge N, Lahpor JR. Slow conduction in the infarcted human heart. „Zigzag“ course of activation. *Circulation* 1993; 88: 915–926

De Bakker JM, van Capelle FJ, Janse MJ, Wilde AA, Coronel R, Becker AE, Dingemans KP, van Hemel NM, Hauer RN. Reentry as a cause of ventricular tachycardia in patients with chronic ischemic heart disease: electrophysiologic and anatomic correlation. *Circulation* 1988; 77: 589–606

Balogh S, Naus CCG, Merrifield PA. Expression of Gap Junctions in Cultured Rat L6 Cells during Myogenesis. *Dev Biol* 1993; 155: 351–360

Barnett P, van den Hoff MJB. Cardiac regeneration: different cells same goal. *Med Biol Eng Comput* 2011; 49: 723–732

Bauer C, Klinke R. *Physiologie*. Stuttgart - New York: Thieme 2005

Becher UM, Breitbach M, Sasse P, Garbe S, van der Ven PFM, Fürst DO, Fleischmann BK. Enrichment and terminal differentiation of striated muscle progenitors in vitro. *Experimental Cell Res* 2009; 315: 2741–2751

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass Kanar, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324: 98–102

Berul CI, Christe ME, Aronovitz MJ, Seidman CE, Seidman JG, Mendelsohn ME. Electrophysiological abnormalities and arrhythmias in MHC mutant familial hypertrophic cardiomyopathy mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 570–576

Betsuyaku T, Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Saffitz JE, Yamada KA. Spontaneous and inducible ventricular arrhythmias after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13: 156–164

Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, Greenblatt JJ, Rosenberg SA, Klein H, Berger M, Mullen CA, Ramsay WJ, Muul L, Morgan RA, Anderson WF. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 1995; 270: 475–480

Boyett M r., Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 658–687

Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JWU, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch A, Jacobse SEW, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007; 110: 1362 –1369

Bucchi A, Plotnikov AN, Shlapakova I, Danilo P, Kryukova Y, Qu J, Lu Z, Liu H, Pan Z, Potapova I, Knight BK, Girouard S, Cohen IS, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR. Wild-Type and Mutant HCN Channels in a Tandem Biological-Electronic Cardiac Pacemaker. *Circulation* 2006; 114: 992–999

Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC. In Vivo Visualization of Embryonic Stem Cell Survival, Proliferation, and Migration After Cardiac Delivery. *Circulation* 2006; 113: 1005–1014

Carr CA, Stuckey DJ, Tatton L, Tyler DJ, Hale SJM, Sweeney D, Schneider JE, Martin-Rendon E, Radda GK, Harding SE, Watt SM, Clarke K. Bone marrow-derived stromal cells home to and remain in the infarcted rat heart but fail to improve function: an in vivo cine-MRI study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 295: H533–H542

Cavazza A, Moiani A, Mavilio F. Mechanisms of Retroviral Integration and Mutagenesis. *Hum Gene Ther* 2013; 24: 119–131

Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, Clark WA, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Programmed Myocyte Cell Death Affects the Viable Myocardium after Infarction in Rats. *Exp Cell Res* 1996; 226: 316–327

Chu V, Otero JM, Lopez O, Morgan JP, Amende I, Hampton TG. Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. *BMC physiology* 2001; 1: 6

Davis LM, Rodefeld ME, Green K, Beyer EC, Saffitz JE. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995; 6: 813–822

Di Diego JM, Antzelevitch C. Ischemic Ventricular Arrhythmias Experimental Models and Their Clinical Relevance. *Heart Rhythm* 2011; 8: 1963–1968

Efimov IR, Nikolski VP, Salama G. Optical Imaging of the Heart. *Circ Res* 2004; 95: 21–33

Ei-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp Cell Res* 1987; 168: 422–430

Enomoto T, Martel N, Kanno Y, Yamasaki H. Inhibition of cell communication between Balb/c 3t3 cells by tumor promoters and protection by cAMP. *J Cell Physiol* 1984; 121: 323–333

Farraj AK, Hazari MS, Cascio WE. The Utility of the Small Rodent Electrocardiogram in Toxicology. *Toxicol Sci* 2011; 121: 11–30

Fernandes S, Van Rijen HVM, Forest V, Evain S, Leblond AL, Mérot J, Charpentier F, De Bakker JMT, Lemarchand P. Cardiac cell therapy: overexpression of connexin43 in skeletal myoblasts and prevention of ventricular arrhythmias. *J Cell Mol Med* 2009; 13(9B): 3703–3712

Fleischmann M, Bloch W, Kolossov E, Andressen C, Müller M, Brem G, Hescheler J, Addicks K, Fleischmann BK. Cardiac specific expression of the green fluorescent protein during early murine embryonic development. *FEBS Lett* 1998; 440: 370–376

Fouts K, Fernandes B, Mal N, Liu J, Laurita KR. Electrophysiological consequence of skeletal myoblast transplantation in normal and infarcted canine myocardium. *Heart Rhythm* 2006; 3: 452–461

Fraud S, Pethig K, Franke U, Wahlers T, Harringer W, Cremer J, Fieguth H, Oppelt P, Haverich A. Ten year survival after heart transplantation: palliative procedure or successful long term treatment? *Heart* 1999; 82: 47–51

Gepstein L, Ding C, Rehemedula D, Wilson EE, Yankelson L, Caspi O, Gepstein A, Huber I, Olgin JE. In Vivo Assessment of the Electrophysiological Integration and Arrhythmogenic Risk of Myocardial Cell Transplantation Strategies. *Stem Cells* 2010; 28: 2151–2161

Goedhart J, van Weeren L, Adjobo-Hermans MJW, Elzenaar I, Hink MA, Gadella TWJ. Quantitative Co-Expression of Proteins at the Single Cell Level – Application to a Multimeric FRET Sensor. *PLoS One* 2011; 6: 11

Goldbarg AN, Hellerstein HK, Bruell JH, Daroczy AF. Electrocardiogram of the Normal Mouse, *Mus Musculus*: General Considerations and Genetic Aspects. *Cardiovasc Res* 1968; 2: 93–99

Gorgels APM, Gijsbers C, de Vreede-Swagemakers J, Lousberg A, Wellens HJJ. Out-of-hospital cardiac arrest-the relevance of heart failure. The Maastricht Circulatory Arrest Registry. *Eur Heart J* 2003; 24: 1204–1209

Gruntman AM, Bish LT, Mueller C, Sweeney HL, Flotte TR, Gao G. Gene Transfer in Skeletal and Cardiac Muscle Using Recombinant Adeno-Associated Virus. *Curr Protoc Microbiol* 2013; 14: 1-14

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, Clappier E, Caccavelli L, Delabesse E, Beldjord K, Asnafi V, MacIntyre E, Dal Cortivo L, Radford I, Brousse N, Sigaux F, Moshous D, Hauer J, Borkhardt A, Belohradsky BH, Wintergerst U, Velez MC, Leiva L, Sorensen R, Wulffraat N, Blanche S, Bushman FD, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 2008; 118: 3132–3142

Halbach M, Pfannkuche K, Pillekamp F, Ziomka A, Hannes T, Reppel M, Hescheler J, Müller-Ehmsen J. Electrophysiological Maturation and Integration of Murine Fetal Cardiomyocytes After Transplantation. *Circ Res* 2007; 101: 484–492

Hamlin RL, Kijawornrat A, Keene BW, Hamlin DM. QT and RR Intervals in Conscious and Anesthetized Guinea Pigs with Highly Varying RR Intervals and Given QTc-Lengthening Test Articles. *Toxicol Sci* 2003; 76: 437–442

Herold G. *Innere Medizin Auflage 2010*. Köln: Gerd Herold, 2009

High KH, Nathwani A, Spencer T, Lillicrap D. Current status of haemophilia gene therapy. *Haemophilia* 2014; 20: 43–49

Holzer N, Hogendoorn S, Zürcher L, Garavaglia G, Yang S, König S, Laumonier T, Menetrey J. Autologous transplantation of porcine myogenic precursor cells in skeletal muscle. *Neuromuscular Disord* 2005; 15: 237–244

Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JWU, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; 203: 2315–2327

Kramer K, van Acker SA, Voss HP, Grimbergen JA, van der Vijgh WJ, Bast A. Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1993; 30: 209–215

Kramer K, Kinter LB. Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol Genomics* 2003; 13: 197–205

Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, Kim J-S, Degen J, Janssen-Bienhold U, Lewalter T, Tiemann K, Willecke K. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 5959–5964

Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotech* 2007; 25: 1015–1024

Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GGL, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim H-S, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of Intracoronary Cell Therapy on Left Ventricular Function in the Setting of Acute Myocardial Infarction: A Collaborative Systematic Review and Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1761–1767

Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *BBA-Rev Cancer* 1979; 560: 1–65

Lombard EA. Electrocardiograms of Small Mammals. *Am J Physiol - Leg Cont* 1952; 171: 189–193

London B. Cardiac arrhythmias: From (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; 12: 1089–1091

Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin J-T, Marolleau J-P, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAG-IC) Trial. *Circulation* 2008; 117: 1189–1200

Menasché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin J-T, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279–280

Van Meter CH Jr, Claycomb WC, Delcarpio JB, Smith DM, deGruiter H, Smart F, Ochsner JL. Myoblast transplantation in the porcine model: a potential technique for myocardial repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 1442–1448

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, Hahn A, Fichtner S, Schaefer A, Arseniev L, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009; 30: 2978–2984

Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary Bone Marrow Cell Transfer After Myocardial Infarction Eighteen Months' Follow-Up Data From the Randomized, Controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) Trial. *Circulation* 2006; 113: 1287–1294

Mitchell GF, Jeron A, Koren G. Measurement of heart rate and QT interval in the conscious mouse. *American Journal of Physiology - Heart Circ Physiol* 1998; 274: H747–H751

Mongue-Din H, Salmon A, Fiszman MY, Fromes Y. Non-invasive restrained ECG recording in conscious small rodents: a new tool for cardiac electrical activity investigation. *Pflug Arch Eur J Phy* 2007; 454: 165–171

Morita N, Sovari AA, Xie Y, Fishbein MC, Mandel WJ, Garfinkel A, Lin SF, Chen PS, Xie LH, Chen F, Qu Z, Weiss JN, Karagueuzian HS. Increased susceptibility of aged hearts to ventricular fibrillation during oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: H1594–H1605

Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 2512–2523

Murry CE. Cell-Based Cardiac Repair: Reflections at the 10-Year Point. *Circulation* 2005; 112: 3174–3183

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KBS, Ismail Virag J, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664–668

Nuyens D, Stengl M, Dugarmaa S, Rossenbacker T, Compernelle V, Rudy Y, Smits JF, Flameng W, Clancy CE, Moons L, Vos MA, Dewerchin M, Benndorf K, Collen D, Carmeliet E, Carmeliet P. Abrupt rate accelerations or premature beats cause life-threatening arrhythmias in mice with long-QT3 syndrome. *Nat Med* 2001; 7: 1021–1027

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SEW. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494–501

Olshausen K. EKG-Information: Vom Anfänger zum Profi 8. Aufl. Darmstadt: Steinkopff, 2005

Orlic D. Adult Bone Marrow Stem Cells Regenerate Myocardium in Ischemic Heart Disease. *Ann NY Acad Sci* 2003; 996: 152–157

Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed Connexin43 Gap Junction Distribution Correlates With the Location of Reentrant Circuits in the Epicardial Border Zone of Healing Canine Infarcts That Cause Ventricular Tachycardia. *Circulation* 1997; 95: 988–996

Pfeifer A, Kessler T, Yang M, Baranov E, Kootstra N, Cheresch DA, Hoffman RM, Verma IM. Transduction of Liver Cells by Lentiviral Vectors: Analysis in Living Animals by Fluorescence Imaging. *Mol Ther* 2001; 3: 319–322

Rajasingh J, Bord E, Hamada H, Lambers E, Qin G, Losordo DW, Kishore R. STAT3-Dependent Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation Into Cardiomyocytes Analysis of Molecular Signaling and Therapeutic Efficacy of Cardiomyocyte Precommitted mES Transplantation in a Mouse Model of Myocardial Infarction. *Circ Res* 2007; 101: 910–918

Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; 149: 731–740

Richards AG, Simonson E, Visscher MG. Electrocardiogram and phonogram of adult and newborn mice in normal conditions and under the effect of cooling, hypoxia and potassium. *Am J Physiol* 1953; 174: 293–298

Roell W, Lu ZJ, Bloch W, Siedner S, Tiemann K, Xia Y, Stoecker E, Fleischmann M, Bohlen H, Stehle R, Kolossov E, Brem G, Addicks K, Pfitzer G, Welz A, Hescheler J, Fleischmann BK. Cellular Cardiomyoplasty Improves Survival After Myocardial Injury. *Circulation* 2002; 105: 2435–2441

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

Sabir IN, Killeen MJ, Grace AA, Huang CLH. Ventricular arrhythmogenesis: Insights from murine models. *Prog Biophys Mol Bio* 2008; 98: 208–218

Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary Bone Marrow-Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction. *New Engl J Med* 2006; 355: 1210–1221

Schmalbruch H. Skeletal muscle fibers of newborn rats are coupled by gap junctions. *Dev Bio* 1982; 91: 485–490

Schwarz S. Pathophysiologie: Molekulare, zelluläre, systemische Grundlagen von Krankheiten. 1. Aufl. Wien: Maudrich; 2007

Sheridan C. Gene therapy finds its niche. *Nat Biotech* 2011; 29: 121–128

Speckmann EJ, Hescheler J, Köhling R. Physiologie 5. Aufl. Amsterdam: Urban & Fischer Verlag, 2008

Stagg MA, Coppen SR, Suzuki K, Varela-Carver A, Lee J, Brand NJ, Fukushima S, Yacoub MH, Terracciano CMN. Evaluation of frequency, type, and function of gap junctions between skeletal myoblasts overexpressing connexin43 and cardiomyocytes: relevance to cell transplantation. *FASEB J* 2006; 20: 744–746

Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2014. Wiesbaden: Destatis, 2014

Su JW, Tertoolen LG, Laat SW de, Hage WJ, Durston AJ. Intercellular communication is cell cycle modulated during early *Xenopus laevis* development. *J Cell Biol* 1990; 110: 115–121

Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000; 101: 2981–2988

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542–545

Thompson SA, Burridge PW, Lipke EA, Shablott M, Zambidis ET, Tung L. Engraftment of human embryonic stem cell derived cardiomyocytes improves conduction in an arrhythmogenic in vitro model. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53: 15–23

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD, Katus HA, Lindahl B, Morrow DA, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H, Underwood R, Bax JJ, Bonow RO, Pinto F, Gibbons RJ, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasché P, Ravkilde J, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghiade M, Filippatos G, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S. Third universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2012; 126: 2020–2035

Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: promise, uncertainties, and challenges. *Eur Heart J* 2011; 32: 1197–1206

Ursell PC, Gardner PI, Albala A, Fenoglio JJ, Wit AL. Structural and electrophysiological changes in the epicardial border zone of canine myocardial infarcts during infarct healing. *Circ Res* 1985; 56: 436–451

Wang L, Swirp S, Duff H. Age-dependent response of the electrocardiogram to K⁺ channel blockers in mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C73–80

Wehrens XHT, Kirchhoff S, Doevendans PA. Mouse electrocardiography. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 231–237

Wöhrle J, Merkle N, Mailänder V, Nusser T, Schauwecker P, von Scheidt F, Schwarz K, Bommer M, Wiesneth M, Schrezenmeier H, Hombach V. Results of Intracoronary Stem Cell Therapy After Acute Myocardial Infarction. *Am J Cardiol* 2010; 105: 804–812

Zimmer HG. The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers. *Physiology* 1998; 13: 203–210

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. K. Fleischmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit dieses spannende Dissertationsthema bearbeiten zu dürfen. Die hervorragenden Forschungsbedingungen in seinem Labor, sowie die wissenschaftliche Unterstützung, Förderung und Betreuung, weiß ich sehr zu schätzen.

Ich danke dem BONFOR-Forschungsförderprogramm der Medizinischen Fakultät für die finanzielle Unterstützung und die wissenschaftliche Weiterbildung.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinem Betreuer Jun.-Prof. Dr. med. Philipp Sasse. Er hatte für alle wichtigen und unwichtigen Fragen ein offenes Ohr und stets eine Lösung. Vielen Dank für das Engagement und die fachliche Kompetenz, die mir ein Vorbild ist.

Herzlichen Dank an Prof. Dr. Wilhelm Röhl und besonders auch an Alexandra Klein für die gute und harmonische Zusammenarbeit, sowie die Unterstützung bei und Durchführung von *in vivo* Experimenten. Dankeschön an Prof. Dr. med. A. Pfeifer sowie Dr. Andreas Hofmann und Dr. Katrin Zimmermann für die Generierung der viralen Konstrukte.

Bedanken möchte mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie I, besonders der AG Sasse, für die gute, freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors. Insbesondere möchte ich mich bei Frank Holst bedanken für die Unterstützung bei den kleinen und großen Problemen des Laboralltags, ohne die mir der Einstieg in die Forschung sicher nicht so leicht gefallen wäre. Dank gilt auch Henning Begerau für die Umsetzung des „Systole“ Programms in Eisen und Nullen. Bei Herrn Eixmann und Herrn Granitza bedanke ich mich ganz herzlich für die technische und handwerkliche Unterstützung.

Natürlich gilt ganz besonderer Dank meiner Freundin Alexandra für ihre großartige moralische und fachliche Unterstützung.

Nicht zuletzt gebührt auch meinen Eltern und meiner Familie großer Dank, die in vielerlei Hinsicht den Grundstein für meinen Weg gelegt haben.

8. Wissenschaftliche Beiträge

- 10/2010 **Becker TS**, Klein AM, Roell W, Pfeifer A, Fleischmann BK, Sasse P: Lentivirale Transduktion skelettaler Myoblasten mit Connexin 43 führt zur Bildung funktioneller Gap Junctions. *14. BONFOR-Symposium, Medizinische Fakultät der Universität Bonn, Vortrag*
- 03/2010 **Becker TS**, Klein AM, Roell W, Pfeifer A, Fleischmann BK, Sasse P: Lentivirus-based transduction of skeletal muscle cells with connexin 43 leads to the formation of functional gap junctions. *Joint Meeting of the Scandinavian and German Physiological Societies, Poster-Präsentation*