

# **Intramyokardiale Transplantation MNP-beladener Zellen unter Verwendung spezieller Magnetfelder nach Herzschädigung**

## **Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Annika Ottersbach**

aus Siegburg

Bonn 2015



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

**Erstgutachter:** Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann

**Zweitgutachter:** Prof. Dr. Dieter O. Fürst

Tag der Promotion: 13.11.2015

Erscheinungsjahr: 2015

**In der Dissertation eingebunden:**

Zusammenfassung

Lebenslauf



Die vorliegende Arbeit wurde von März 2010 bis Oktober 2014 am Institut für Physiologie I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann erstellt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der Myokardinfarkt.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Herzinsuffizienz.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Die Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Zelluläre Ersatztherapie im Herzmuskel .....</b>	<b>7</b>
1.4.1 Hämatopoetische Stammzellen .....	8
1.4.2 Autologe Skelettmuskelzellen.....	10
1.4.3 Embryonale Kardiomyozyten .....	11
1.4.4 ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten .....	12
<b>1.5 Magnetische Nanopartikel .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6 Potential und Anwendung der MNP in der Biomedizin.....</b>	<b>16</b>
1.6.1 Wirkstoffpositionierung und Wirkstofffreisetzung.....	16
<b>1.7 Anforderungen an die MNP im biologischen System .....</b>	<b>17</b>
<b>1.8 Neue Anwendung in der Nanomedizin: MNP-basierte zelluläre Ersatztherapie ...</b>	<b>18</b>
<b>1.9 Zielsetzung.....</b>	<b>20</b>
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien .....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Medien und Chemikalien .....	23
2.1.2 Reagenziensätze und Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.3 Geräte .....	27
2.1.4 Software.....	30
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	30
2.1.6 Zusammensetzung von Zellkulturmedien.....	33
2.1.7 Eukaryotische Zelllinien .....	34
2.1.7.1 D3 mES-Zellen .....	34
2.1.7.2 ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten.....	34
2.1.8 Lentivirale Vektoren.....	34
2.1.8.1 Verpackungskonstrukte.....	35
2.1.8.2 Transgentransfervektoren.....	35
2.1.8.2.1 rrl-CMV-eGFP .....	35
2.1.8.2.2 rrl-CMV-veffLuc.....	36
2.1.9 Magnetische Nanopartikel (MNP) .....	37
2.1.10 Antikörper .....	39

2.1.10.1	Primäre Antikörper für Immunhistochemische Färbungen .....	39
2.1.10.2	Sekundäre Antikörper für Immunhistochemische Färbungen .....	40
2.1.11	Versuchstiere.....	40
2.1.11.1	Mausmodelle .....	40
2.1.11.2	Superovulation von Mäusen.....	41
<b>2.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
2.2.1	Auftauen von Zellen .....	41
2.2.2	Passagieren von Zellen .....	42
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl .....	42
2.2.4	Kultivierung und Differenzierung von ES-Zellen.....	43
2.2.4.1	Massenkultur .....	43
2.2.4.2	Hängende Tropfen.....	44
2.2.4.3	Differenzierung von $\alpha$ -PIG-Zellen zu ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten .....	44
2.2.4.4	Einzelzelldissoziation von EBS.....	45
2.2.5	Gewinnung und Kultivierung von Primärzellen.....	46
2.2.5.1	Präparation embryonaler Kardiomyozyten (eCM) .....	46
2.2.5.2	Dissoziation von eCM .....	46
2.2.5.3	Virustransduktion von eCM.....	47
2.2.5.4	Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen.....	48
2.2.6	Beladung der Zellen mit MNP .....	48
2.2.7	Vorbereitung der ES- und Primärzellen für eine intramyokardiale Injektion .....	49
2.2.8	Bestimmung der Eisenaufnahme und der Magnetisierungseffizienz von SO-Mag5- beladenen Zellen .....	50
2.2.8.1	Der Magnetständer .....	50
2.2.8.2	MPS-Messung von SO-Mag5-beladenen Zellen <i>in vitro</i> .....	50
2.2.8.3	MPS-Messung zur Bestimmung des Anteils von SO-Mag5-Partikel / SO-Mag5-beladenen Zellen in verschiedenen Organen der Maus.....	51
2.2.9	Lokale Positionierung von SO-Mag5-beladenen Zellen <i>in vitro</i> .....	52
2.2.10	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SO-Mag5-beladenen eCM.....	53
2.2.11	Elektrophysiologische Charakterisierung von SO-Mag5-beladenen eCM.....	53
<b>2.3</b>	<b>Operative Techniken .....</b>	<b>54</b>
2.3.1	Myokardiale Infarktmodelle .....	54
2.3.1.1	Kryoinfarkt, LAD-Ligation, Ischämie / Reperfusion.....	54
2.3.1.2	Operatives Vorgehen.....	55
2.3.2	Intraomyokardiale Zellinjektion mit und ohne Magnetfeld-Applikation .....	57



---

<b>2.4 Analyse der Herzfunktion .....</b>	<b>58</b>
2.4.1 Herzkatheteruntersuchung.....	58
2.4.2 Linksventrikuläre Katheteruntersuchung .....	59
2.4.2.1 Operative Technik der Linksventrikulären Untersuchung.....	60
2.4.2.2 LabChart Analyse.....	61
2.4.3 Elektrophysiologische Untersuchung.....	62
2.4.3.1 Operative Technik der EPU .....	62
2.4.3.2 Stimulationsprogramm der EPU.....	63
2.4.4 Biolumineszenz-Messungen.....	64
2.4.5 Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise.....	65
<b>2.5 Biochemische Methoden .....</b>	<b>66</b>
2.5.1 Toxizitäts-Analysen .....	66
<b>2.6 Immunhistochemische Methoden .....</b>	<b>67</b>
2.6.1 Herzentnahme bei Mäusen.....	67
2.6.1.1 Perfusion und Fixierung von Herzen .....	68
2.6.1.2 Kryokonservierung von Herzen .....	68
2.6.1.3 Anfertigung von Kryoschnitten .....	69
2.6.2 Fixierung von Zellen .....	69
<b>2.7 Immunhistochemische Färbung von Zellen und Herzschnitten .....</b>	<b>69</b>
2.7.1 Antigen-Retrieval .....	70
2.7.2 Preußisch-Blau-Färbung von Herzschnitten.....	70
2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	71
2.7.4 Quantitative Bestimmung der Zellzahl.....	72
2.7.4.1 Quantifizierung der intramyokardial injizierten Zellen .....	72
2.7.4.2 Quantifizierung apoptotischer und proliferierender Zellen.....	73
<b>2.8 Mikroskopie.....</b>	<b>74</b>
<b>2.9 Statistik.....</b>	<b>75</b>
<b>2.10 Von Kooperationspartnern durchgeführte Experimente im Überblick .....</b>	<b>75</b>
<b>3. Ergebnisse: .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1 Identifizierung geeigneter MNP und Anforderungen für eine optimale Zellbeladung <i>in vitro</i>.....</b>	<b>77</b>
3.1.1 MNP-Absorption und Beladungseffizienz von Zellen.....	77
3.1.2 Auswirkungen einer konzentrationsabhängigen SO-Mag5-Aufnahme auf die Magnetisierungseffizienz von Zellen.....	79

3.1.3	Toxizitätsanalysen verschiedener MNP.....	81
3.1.4	Elektrophysiologische Charakterisierung von SO-Mag5-beladenen eCM.....	84
3.1.5	Zelluläre Integration von SO-Mag5-Partikel.....	85
3.1.6	Lokale Zellpositionierung <i>in vitro</i> .....	87
<b>3.2</b>	<b>Intramyokardiale Injektion von MNP-beladenen Zellen mit und ohne Magnetfeld-Applikation <i>in vivo</i> .....</b>	<b>89</b>
3.2.1	Biolumineszenz-Analysen zur Detektion des Zellschicksals nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnet-Applikation .....	89
3.2.2	Auswirkungen der Applikationsdauer des Magnetfeldes auf die Zellintegration.....	91
3.2.3	Quantitative Analyse der integrierten Zellen im Myokard .....	94
3.2.4	Kurzzeit-Effekte nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen Zellen mit und ohne Magnetfeld-Applikation auf die Zellintegrationsrate .....	94
3.2.5	Langzeit-Effekte nach intramyokardialer Injektion von SO Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnetfeld-Applikation auf die Zellintegrationsrate .....	96
3.2.6	Kurz- und Langzeit-Auswirkungen einer Magnet-basierten Zellinjektion von SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM auf die Hämodynamik.....	98
3.2.7	Auslösbarkeit von ventrikulären Tachykardien nach Transplantation von SO-Mag5-Partikeln / SO-Mag5-beladenen eCM in ein infarziertes Myokard.....	105
3.2.8	Integration und Charakterisierung der intramyokardial injizierten SO-Mag5-beladenen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten .....	108
3.2.9	Analyse von Proliferation und Apoptose nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM im Zeitverlauf.....	113
3.2.10	Untersuchung des Verbleibs intramyokardial injizierter SO-Mag5-Partikel .....	120
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>123</b>
4.1	MNP-basierte zelluläre Ersatztherapie in Kombination mit einem geeigneten Magnetfeld .....	123
4.2	Mechanismus einer verbesserten Zellintegrationsrate nach MNP-Beladung und Magnetfeld unterstützter Transplantation .....	136
4.3	Ausblick .....	138
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>141</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>143</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>163</b>

---

<b>8. Anhang.....</b>	<b>167</b>
<b>8.1 Publikationsliste.....</b>	<b>167</b>
<b>8.2 Vorträge und Posterbeiträge auf Konferenzen .....</b>	<b>168</b>
<b>8.3 Danksagung .....</b>	<b>169</b>
<b>8.4 Lebenslauf .....</b>	<b>171</b>



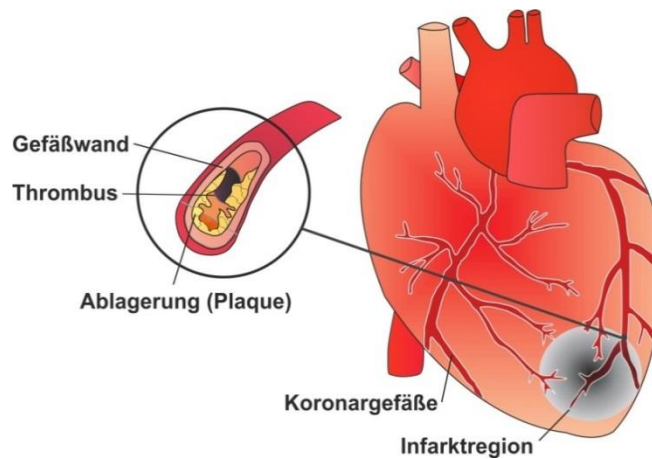
# 1. Einleitung

## 1.1 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt (MI) ist ein akutes und lebensbedrohliches Ereignis und bezeichnet das Absterben von Herzmuskelzellen aufgrund einer persistierenden Unterversorgung (Ischämie) des Myokards. Die Unterversorgung ist durch ein Blutgerinnsel (Thrombus) bedingt, was zu einer Okklusion der Herzkranzgefäße oder Koronargefäße führt (Køber und Torp-Pedersen, 1995). Laut Statistischem Bundesamt wurden im Jahr 2012 (Statistisches Bundesamt, 2012) insgesamt 40,2 % der Todesfälle in Deutschland durch Herz-Kreislaufkrankungen verursacht. Die häufigsten Todesursachen waren dabei chronisch ischämische Herzkrankheiten (8,2 % aller Todesfälle), Herzinsuffizienzen (5,3 % aller Todesfälle) und der MI (6,0 % aller Todesfälle). Innerhalb der ersten 48h nach einem MI besteht ein 15%iges Risiko, einen plötzlichen Herztod zu erleiden. Dieses Risiko fällt in den nächsten Tagen auf 3% ab (Kocovski und Fernandes, 2015). Daher stellen kardiovaskuläre Erkrankungen noch bis heute eine der Haupttodesursachen in den Industrienationen dar, wobei seit 1970 ein signifikanter Rückgang der Sterberate um 20 - 30 % durch eine verbesserte Diagnostik, perkutane Koronarintervention (PCI) und anti-thrombotischer Therapie zu verzeichnen ist (Jhund et al., 2009; McKee et al., 1971; McMurray, 2010).

Häufigste Ursache für einen AMI ist eine Gefäßverengung oder ein Verschluss aufgrund atherosklerotischer Ablagerungen (Plaques) in mindestens einem der großen Herzkranzgefäße (Koronararterien), welche als koronare Herzerkrankung (KHK) bezeichnet wird. Die Entstehung der KHK wird durch verschiedene Risikofaktoren begünstigt, welche im Jahr 2013 durch Boateng und Sanborn in drei Kategorien eingeteilt wurden: 1. Nicht-modifizierbare Risikofaktoren (Alter, Geschlecht und erbliche Faktoren), 2. modifizierbare Risikofaktoren (Rauchen, Alkoholkonsum, Bewegungsmangel, Adipositas, Stress, Diabetes, arterielle Hypertonie und Cholesterinerhöhung) und 3. neu entstehende Faktoren (C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen, Kalzifizierung der Koronararterien (CAC) und Lipoprotein(a)). Dabei ist das Risiko für die Entstehung einer KHK bzw. eines AMI umso höher, je stärker ein Risikofaktor ausgeprägt ist oder je mehr Faktoren gleichzeitig vorliegen.

Eine Ruptur von arteriosklerotischen Plaques kann die Bildung eines Thrombus begünstigen, was zu einer länger anhaltenden Durchblutungsstörung (Ischämie) des Herzmuskelgewebes führt (Boateng und Sanborn, 2013; Abb. 1).



**Abbildung 1: Der Myokardinfarkt**

Schematische Darstellung des MIs der Vorderwandspitze (graues Areal) nach einem Verschluss (Thrombus) des vorderen absteigenden Astes (LAD) der linken Herzkranzarterie, aufgrund einer atherosklerotischen Ablagerung (Vergrößerung links). Durch die länger anhaltende Durchblutungsstörung (Ischämie) des Herzmuskelgewebes kommt es zu einer Unterversorgung des Herzens mit Sauerstoff und Nährstoffen, was zu einem Untergang von Kardiomyozyten und zur Ausbildung einer fibrotischen Narbe führt.

In der ersten Phase (2 - 30 Minuten) ist die Schädigung noch reversibel, d.h. je schneller eine Therapie in diesem kurzen Zeitfenster eingeleitet wird, desto mehr Herzmuskelgewebe kann vor dem Untergang gerettet werden, weniger Komplikationen treten auf und die Gefahr einer chronischen Herzschwäche wird vermindert. Die Prognose hängt daher entscheidend davon ab, wie schnell der Notarzt eintrifft und wie weit der Patient von einem Krankenhaus entfernt ist. Problematisch ist jedoch, dass in rund 70-80% der Fälle die Ischämie vom Patienten nicht wahrgenommen wird und somit asymptomatisch verläuft („stummer Infarkt“). Bereits bei einer Hypoxie von mehr als 30 Minuten (Phase 2) kommt es zu einem Untergang von Kardiomyozyten (CM), was eine irreversible Schädigung der Herzwand oder des subendokardialen Myokards zur Folge hat (Di Diego und Antzelevitch, 2011). Im weiteren Verlauf beginnt der Körper mit einer Art „Heilungsprozess“, bei der Fibroblasten in den Infarktbereich einsprossen und abgestorbenes Herzmuskelgewebe durch eine stabilisierende, bindegewebige Narbe ersetzen. Dadurch kommt es jedoch zu einer Beeinträchtigung der Funktion des Myokards, da die Narbe selbst keine Kontraktionsfähigkeit aufweist (Braunwald und Pfeffer, 1991; Guan und Hasenfuss, 2007). Die umliegenden, funktionellen Muskelzellen können die verminderte Pumpleistung des Herzens durch das sogenannte *Remodeling* teilweise kompensieren (Olivetti et al., 1990; Shah et al., 2013). Dabei hypertrophieren die gesunden CM dauerhaft, was kurzfristig die

Herzfunktion verbessert, langfristig jedoch zu einer Herzinsuffizienz führen kann (Cheng et al., 1996; McMurray, 2010). Schon die TRACE-Studie (*Trandolapril Cardiac Evaluation*) aus dem Jahr 1994 konnte zeigen, dass > 50 % der Patienten nach einem AMI Symptome oder Anzeichen für eine Herzinsuffizienz aufwiesen (Køber und Torp-Pedersen, 1995; Køber et al., 1998). Eine häufige Begleiterscheinung des AMI sind ventrikuläre Arrhythmien (Herzrhythmusstörungen), Vorhofflimmern (Huikuri et al., 2001; Osmancik et al., 2008) und Kammerflimmern (Di Diego und Antzelevitch, 2011), sowie ventrikuläre Tachykardien (VTs). Dabei stellen die VTs die häufigste Todesursache infolge eines MIs dar (Henkel et al., 2006; Solomon et al., 2005). Viele Patienten entwickeln als weitere Komplikation nach einem AMI eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion (LVSD) (Cleland et al., 2005) und / oder eine verminderte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) (Hellermann et al., 2005). Alle Komplikationen führen langfristig zu einer Herzinsuffizienz und schlimmstenfalls zum Herzversagen (Møller et al., 2003). Doch bislang fehlen gezielte, kausale und kurative Therapiemöglichkeiten, welche eine Regeneration oder einen Ersatz von Herzmuskelzellen ermöglichen (Angert et al., 2011; Rubart und Zipes, 2005).

## 1.2 Die Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz - auch Herzmuskelschwäche genannt - ist heutzutage eine der häufigsten und kostenintensivsten chronischen Erkrankungen (Dickstein et al., 2008; Neumann et al., 2009). Nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die Herzinsuffizienz als verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung definiert. Eine Herzinsuffizienz liegt vor, wenn das Herz nicht in der Lage ist, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck bereitzustellen. Die Organe und Gewebe werden dadurch schlechter durchblutet und es kann zum Kreislaufversagen kommen. Zwei verschiedene Verlaufsformen können auftreten: eine akute Form (Verlauf von Stunden bis Tagen) und eine chronische, über mehrere Monate bis Jahre verlaufende Form (McMurray et al., 2012). Je nach Lokalisation unterscheidet man zwischen einer Links- und Rechtsherzinsuffizienz. Auch eine Kombination beider Formen ist möglich: die sogenannte globale Herzinsuffizienz. Bei dieser Form treten Beschwerden einer Links- und einer Rechtsherzschwäche auf.

Nach dem Schema der *New-York-Heart-Association (NYHA)* lässt sich die Herzinsuffizienz in vier Schweregrade einteilen (Goldman et al., 1981). Diese geben an, wie stark die

Beschwerden (z.B. Müdigkeit, Dyspnoe, Ödeme, Nykturie) vom Patienten mit Herzschwäche bei körperlicher Belastung wahrgenommen werden.

Zur Behandlung der Herzinsuffizienz stehen neben präventiven Strategien (Umstellung der Lebensumstände) medikamentöse Therapien durch Diuretika, Beta-Blocker und ACE-Hemmer (Levy et al., 2002), sowie operative oder interventionelle Reperfusionsmethoden bei vorliegender KHK zur Verfügung. Bei diesen Therapien stehen die Verbesserung und Sicherstellung der koronaren Durchblutung und somit eine Steigerung der Effizienz der Pumpfunktion des verbleibenden Restmyokards im Vordergrund. Auch antiarrhythmische Therapien können durch den Einsatz von Medikamenten, Herzschrittmachern, Defibrillatoren oder kardialen Resynchronisationssystemen durchgeführt werden (Hansky et al., 2009; Moss et al., 2002; Yadav et al., 2005).

Bei einer terminalen Herzinsuffizienz (Endstadium IV) verbleiben als letzte Behandlungsoption nur die Implantation eines mechanischen Kreislaufunterstützungssystems (Shah et al., 2011; Shreenivas et al., 2010) oder eine Herztransplantation (HTx). Beide Therapieoptionen sind zum einen aufgrund des Mangels an Spenderorganen und zum anderen aufgrund von Nebenwirkungen (Infektionen, Blutungs- und Embolieereignisse) nur begrenzt einsetzbar (Daneshvar et al., 2010). Da eine Abstoßungsreaktion auf jeden Fall unterdrückt werden muss, ist die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie lebenslang gegeben. Als Nebenwirkung wird jedoch das Immunsystem stark beeinträchtigt, sodass eine Immunsuppression das Risiko von Entzündungen und Infektionen birgt (Shah und Parameshwar, 2011). Obwohl, wie dargestellt, die Behandlungsmöglichkeiten heutzutage vielfältig und die Überlebensraten in den ersten Jahren nach einer HTx gemäß dem Register der *International Society for Heart and Lung Transplantation* recht gut sind (Überlebensraten nach HTx weltweit: erstes Jahr ca. 80 %; nach 5 Jahren ca. 60-70 %; nach 10 Jahren ca. 40-50 %; Benden et al., 2014), besteht permanent die Gefahr einer Abstoßungsreaktion. So können nur die Symptome, nicht jedoch die Ursache der Herzinsuffizienz, der Verlust von vitalen CM, behandelt werden (Imamura et al., 2013). Daher ist die Morbidität und Mortalität trotz zahlreicher Therapieansätze weiterhin hoch (Guan und Hasenfuss, 2007; Shah et al., 2013) und die Suche nach alternativen, möglichst kausalen Therapie-Ansätzen, essentiell.



### 1.3 Die Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels

Unabhängig von der Grunderkrankung (MI, KHK, Kardiomyopathie) kommt es bei kardiovaskulären Erkrankungen zu einem Untergang von funktionellen Kardiomyozyten (CM). Im Vergleich zu verschiedenen anderen Organen, wie beispielsweise der Haut oder den Skelettmuskeln, ist die Regenerationsfähigkeit des Herzens nur gering (Braunwald und Pfeffer, 1991; Jessup und Brozena, 2003), da es sich bei adulten Kardiomyozyten um terminal differenzierte Zellen handelt, die ihre Fähigkeit zur Teilung verloren haben. Die geringe Proliferationskapazität der residenten CM macht eine Erforschung endogener (körpereigener) Regenerationsmechanismen aber auch exogener Stammzell-basierter Therapieformen erforderlich, um zugrunde gegangenes Myokard zu regenerieren und die Ausprägung des Herzversagens reduzieren zu können (Segers und Lee, 2008).

Bei der Untersuchung endogener Regenerationsmechanismen konnten einige Studien zeigen, dass die Zahl sich neu bildender CM nur sehr gering ist (Soonpaa und Field, 1997; Walsh et al., 2010). Erkenntnis wurde auch durch eine humane Radiokarbon(<sup>14</sup>C)-Studie von CM-DNA bestätigt. So werden während eines gesamten menschlichen Lebens weniger als 50 % aller Herzmuskelzellen erneuert. Bei einem 20-Jährigen liegt die jährliche Erneuerung der Herzmuskelzellen bei nur ca. 1 %. Im Laufe des Lebens nimmt das regenerative Potential sogar stetig ab, sodass bei einem 75-Jährigen nur noch 0,3 % der CM erneuert werden, obwohl hier das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen am größten ist (Bergmann et al., 2009). Auch Studien im Mausmodell bestätigten das sehr geringe regenerative Potential der CM mit einer Regenerationsrate von nur 1,1 % (Porrello und Olson, 2010; Soonpaa und Field, 1997).

Neben dem regenerativen Potential ist auch die Herkunft der neu gebildeten Herzmuskelzellen essentiell, worüber bis heute noch kontrovers diskutiert wird (Gonzalez et al., 2008; Verfaillie et al., 2002). Während einige Studien nach einem Infarkt den Wiedereintritt adulter Herzmuskelzellen in den Zellzyklus extrapolierten (Quaini et al., 2002), zeigten andere Untersuchungen, dass residente kardiale Stamm- oder Progenitorzellen nach einer Ischämie zu CM ausdifferenzieren können (Marelli et al., 1992; Oh et al., 2003; Quaini et al., 2002). Daneben postulierte eine andere Studie, dass epikardiale Progenitorzellen durch die Behandlung mit Thymosin  $\beta$ 4 über das gleiche Potential verfügen, gesundes Herzgewebe zu bilden, wie embryonale Zellen. Nach Infarzierung des adulten Herzens der Maus konnten, unter Einfluss des Proteins Thymosin  $\beta$ 4, Progenitorzellen aus dem Epikard

dazu stimuliert werden, neue Blutgefäße zu bilden. Genauer gesagt kam es in dieser endogenen Zellpopulation zu einer Reaktivierung des embryonalen Programms, was zu einer Differenzierung in Koronarendothel und glatte Muskulatur führte (Smart et al., 2007). Auch eine Differenzierung in CM konnte verifiziert werden (Smart et al., 2011), jedoch ist der Anteil dessen im Verhältnis zur Anzahl der untergegangenen CM im Infarktareal nur sehr gering und reicht deshalb nicht aus, um das geschädigte Myokard regenerieren zu können. Zudem ist dieser Ansatz limitiert durch eine Vorab-Gabe von Thymosin  $\beta$ 4 vor dem Infarktereignis und daher klinisch nicht umsetzbar.

Daneben zeigten Transplantationsstudien von männlichen kardialen Spenderzellen in weibliche Empfängerherzen, dass sich einige Zellen mit Y-Chromosomen im Myokard und in den dort liegenden Arteriolen ansammelten. Diese Beobachtung erhärtet die Annahme, dass im Blut zirkulierende Zellen aus dem Knochenmark in den Herzmuskel integrieren und somit durch Mitose von Nachbarzellen oder Stammzellen untergegangene Herzmuskelzellen ersetzen können (Quaini et al., 2002).

Bei einem anderen Ansatz konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Sca-1<sup>+</sup>Stammzellen im gesunden Herz an einem kontinuierlichen Austausch von Herzmuskelzellen beteiligt sind. Zudem nimmt die Aktivität der Sca-1<sup>+</sup>Zellen im Falle einer Schädigung des Herzens zu und somit das Säugerherz prinzipiell dazu in der Lage ist, Regenerations- und Erneuerungsprozesse anzustoßen. Nachteilig ist jedoch, dass im Vergleich zur Masse der Herzmuskelzellen nur eine sehr geringe Anzahl der Zellen im Herz Sca-1<sup>+</sup>Zellen sind und diese bei einem MI die Schädigung des Herzens nicht ausreichend regenerieren können (Uchida et al., 2013).

Somit zeigen alle bisherigen endogenen Ansätze, dass der Herzmuskel prinzipiell zu regenerativen Prozessen befähigt ist, diese jedoch nicht ausreichen, um eine Herzschädigung teilweise oder sogar vollständig wiederherstellen zu können. Daher ist es einerseits notwendig, neue Wege zu finden, über welche die Bildung neuer Herzmuskelzellen aus den Herzstammzellen verbessert werden kann, um die Selbstheilungskräfte des Herzens zu stärken. Andererseits zeigt auch die exogene Zellersatztherapie einige essentielle Vorteile für eine Behandlung des Myokards nach einer Herzschädigung auf, welche im Nachfolgenden dargestellt und diskutiert wird.

## 1.4 Zelluläre Ersatztherapie im Herzmuskel

Die Regenerationsfähigkeit des Herzens – wenn auch gering ausgeprägt – ist heutzutage anerkannt, jedoch können kardiovaskuläre Erkrankungen durch die nur sehr geringe Proliferationskapazität der residenten CM nicht regeneriert werden (siehe Kapitel 1.3). Daher stellt die zelluläre Ersatztherapie eine wichtige und interessante experimentelle Therapieoption dar.

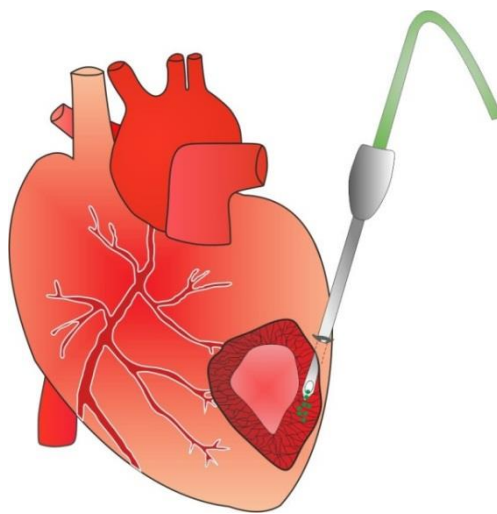
Dabei sind die Anforderungen an die für eine zelluläre Ersatztherapie in Betracht gezogene Zellpopulation sehr hoch, da eine leichte Zellgenerierung, hohe Zell- und Proliferationsrate ohne Tumorentwicklung im Infarktareal, sowie eine Immunverträglichkeit gewährleistet werden muss (Knuefermann et al., 2004). Außerdem sollten die eingebrachten Zellen die Bildung neuer Gefäße (Neovaskularisierung) ermöglichen, um eine ausreichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der neuen Zellen sicherstellen zu können (Murry, 2005; Strauer und Steinhoff, 2011). Besonders an die kardialen Zellen werden zudem essentielle Anforderungen in Bezug auf die kontraktile Eigenschaften zur Verbesserung der Herzfunktion sowie der elektrische Kopplung mit den umliegenden, vitalen CM gestellt. Des Weiteren beeinflusst und begrenzt auch das Infarktgewebe durch Bildung von Narbengewebe sowie dessen Umgebung (*border zone = Randbereich*) das Entwicklungsschicksal von transplantierten Zellen entscheidend (Jessup und Brozena, 2003; Laflamme und Murry, 2005; Murry, 2005).

Um nun die am besten geeignete Zellpopulation für eine Regeneration des geschädigten Myokards nach einem MI ermitteln zu können, wurden bereits zahlreiche tierexperimentelle Studien durchgeführt (Klopsch et al., 2011; Laflamme und Murry, 2005). Dabei wurden verschiedene exogene adulte Stamm- und Progenitorzellen, wie beispielsweise skelettale Myoblasten (SM), endotheliale Progenitorzellen und embryonale Kardiomyozyten (eCM) eingesetzt, bei denen eine Integration in das infarzierte Myokard nachgewiesen werden konnte (Dimmeler et al., 2005; Etzion et al., 2001; Roell et al., 2002a).

Bei einem exogenen Therapieansatz können die Zellen dabei über eine intrakoronäre Infusion oder perikardiale Injektion in das infarzierte Herzmuskelgewebe eingebracht werden (Hajjar et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode der intramyokardialen Zellinjektion (Abb. 2) angewendet. Hierbei werden Vorläufer- und / oder Stammzellen direkt in das geschädigte Myokard injiziert und in die Matrix eingelagert (Passier et al., 2008). Dieses Verfahren hat sich innerhalb der Arbeitsgruppe aufgrund seiner

hohen Erfolgsrate und Reproduzierbarkeit bei gleichzeitig niedriger Mortalitätsrate bewährt (Roell et al., 2002b).

In den nachfolgenden Abschnitten wird geschildert, wie Zellen aus dem Knochenmark, dem Skelettmuskel und aus embryonalen Herzen gewonnen, untersucht und transplantiert wurden, um die Regeneration des Myokards zu fördern. Auch CM, welche aus embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden, konnten erfolgreich transplantiert werden (Kolossoff et al., 2006; Laflamme und Murry, 2005). Es werden Chancen, aber auch limitierende Faktoren der einzelnen Zelltypen für eine mögliche Zellersatztherapie nach einem MI kritisch herausgearbeitet.



**Abbildung 2: Intramyokardiale Zellinjektion**

Die intramyokardiale Zellinjektion stellt eine mögliche Injektionstechnik für eine kardiale zelluläre Ersatztherapie *in vivo* dar. Hierbei werden isolierte Zellen mit Hilfe einer Injektionsnadel in die Wand des linken Ventrikels apexnah injiziert.

### 1.4.1 Hämatopoetische Stammzellen

Für die stetige Neubildung an neuen Blutzellen sind hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen verantwortlich. Hämatopoetische Stammzellen (*HSC = hematopoietic stem cells*) sind zur Zellteilung befähigt und können zudem in alle hämatopoetischen Zelllinien differenzieren. Die Hämatopoese von HSCs erfolgt im adulten Organismus fast ausschließlich im Knochenmark. Während der Differenzierung durchlaufen die HSC unterschiedliche Vorläuferstadien, ausgehend von Zellen mit multiplem Differenzierungspotenzial bis hin zu

unipotenten Vorläufern, die sich nur noch in eine Linie entwickeln können (Reya et al., 2001).

Schon sehr früh wurde das regenerative Potential dieser Zellen hinsichtlich einer Knochenmarkstransplantation bei Erkrankungen des blutbildenden Systems festgestellt (Becker et al., 1963). Daneben wurden Knochenmarkzellen (*BMC = bone marrow cells*), die den Stammzellfaktor-Rezeptor c-kit exprimieren (*c-kit<sup>+</sup>-BMC*), als adulte kardiale Progenitorzellen vorgeschlagen (Jackson et al., 2001; Orlic et al., 2001) und in klinischen Studien zur kardiovaskulären regenerativen Therapie eingesetzt (Ptaszek et al., 2012). Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Zellen nicht oder nur in sehr geringem Maße zu einer Transdifferenzierung in CM befähigt sind. So zeigte eine Studie von van Berlo et al., 2014, dass sich nur 0,03 % (oder weniger) der endogenen c-kit-exprimierenden kardialen Progenitorzellen zu neue CM im Mausmodell ausdifferenzierten. Auch bei einer Transplantation von Knochenmark-abgeleiteten hämatopoetischen Stammzellen in ein infarziertes Myokard konnte keine Transdifferenzierung in CM nachgewiesen werden (Balsam et al., 2004; Kolossov et al., 2006; Murry et al., 2004; Nygren et al., 2004; Orlic et al., 2001). Eher wird eine Ausschüttung parakriner Faktoren für das Überleben endogener kardialer Zellen und die positive Beeinflussung der Angiogenese verantwortlich gemacht (Loffredo et al., 2011).

Neben den HSC werden heutzutage auch mesenchymalen Stammzellen (*MSC = mesenchymal stem cells*), aufgrund ihrer hohen Plastizität experimentell zur Regeneration von Wunddefekten bei Haut-, Knorpel- oder Knochenschaden, aber auch bei Muskel- oder Herzmuskeldefekten untersucht. MSC stellen eine adulte Stammzellpopulation dar und können aus verschiedenen Geweben, wie dem Fettgewebe, der Nabelschnur, dem Nabelschnurblut oder dem Knochenmark gewonnen werden. Jedoch konnte bei einer Behandlung mit MSC innerhalb unserer eigenen Arbeitsgruppe ein großes Sicherheitsrisiko nach dessen Transplantation in ein infarziertes Myokard nachgewiesen werden (Breitbach et al., 2007). So zeigten Langzeit-Versuche, dass eine Injektion von MSC bei Mäusen zu einer Kalzifizierung und Knochenbildung innerhalb des Infarktareals führen kann. Auch bei Ratten (Ribeiro et al., 2006; Yoon et al., 2004) und einigen Patienten (Bloom und Peric-Golia, 1989; Mullens et al., 2006) wurden Kalzifizierungen festgestellt. Aufgrund ihrer Multipotenz besteht zudem die Gefahr einer Tumorbildung. Darüber hinaus konnten in klinischen Studien am Menschen sowie im Tiermodell nur kurzfristige und geringe Verbesserungen der kardialen Funktion, jedoch keine langfristigen Vorteile, festgestellt werden (Hatzistergos et

al., 2010). Möglicherweise sind die nachgewiesenen kurzzeitigen Effekte einer Behandlung mit MSC auf die kardiale Regeneration ebenfalls dem Einfluss parakriner Effekte zuzuschreiben (Gnecchi et al., 2005; Nagaya et al., 2005; Nakanishi et al., 2008). Basierend auf diesen Erkenntnissen ist bis heute noch kein ausreichend wirksamer therapeutischer Einsatz am Menschen zur Behandlung von Herzkrankheiten möglich (Martin-Rendon et al., 2008; Murry, 2005; Smith et al., 2008).

### 1.4.2 Autologe Skelettmuskelzellen

Die Transplantation von autologen Skelettmuskelzellen stellt eine weitere mögliche Quelle für eine klinische Zellersatztherapie am Herzen dar. Für den Einsatz im infarzierten Myokard konnte relativ problemlos Skelettmuskelgewebe über Biopsien vom Menschen entnommen werden. Die darin enthaltenen Präkursorzellen, die im ruhenden Zustand auch Satellitenzellen genannt werden, können aus dem adulten Muskelgewebe isoliert werden. Bei einer Beschädigung des Muskelgewebes sind diese Zellen in der Lage zu proliferieren und sich zu Skelettmuskelzellen auszudifferenzieren. Ab diesem Zeitpunkt werden sie auch als Myoblasten (Skelettale Myoblasten = SM) bezeichnet. Die leichte Zell-Generierung erlaubt schon sehr früh, über eine Anwendung dieser Zellen in der Zellersatztherapie nachzudenken. Bereits im Jahr 1992 wurden erstmals beim Hund myogene Zellen ins Myokard injiziert (Marelli et al., 1992). Die isolierten Zellen proliferierten vor der Injektion *in vitro* und zeigten keine tumoröse Entartung. Andere Studien legten dar, dass sich die SM zwar nicht in CM differenzieren können, aber die Fähigkeit besitzen, im Infarktareal zu Myozyten heranzuwachsen und sich in kontraktile Myotuben oder mesenchymale Zellen wie Fibroblasten, Osteoblasten oder Fettzellen auszubilden (Hutcheson et al., 2000; Reinecke, 2002; Segers und Lee, 2008). Aufgrund ihrer Kontraktionsfähigkeit und stabilisierenden Wirkung auf die verdünnte Ventrikelwand, verbesserte der Einsatz von Myotuben deutlich die Herzfunktion (Menasché et al., 2003; Reinecke et al., 2000). Positiv wirkte sich der Einsatz von SM auch auf das *kardiale Remodeling* in Verbindung mit einer Neovaskularisierung und abgeschwächten Fibrose aus (Shintani et al., 2009). Im Tierversuch und in ersten klinischen Studien schien die Injektion dieser autologen Zellen sehr erfolgversprechend zu sein (Van Den Bos und Taylor, 2003; Taylor, 2001; Zhang et al., 2013), auch aufgrund des Fehlens von ethischen und immunologischen Problemen, wie sie bei humanen embryonalen Zellen auftreten (Jain et al., 2001). Langfristig konnten allerdings die

Erwartungen einer andauernden verbesserten Herzfunktion nicht erfüllt werden, da SM nach einer Transplantation häufig Arrhythmien (z.B. ventrikuläre Tachykardien, VTs) via *Reentry* hervorriefen (Fernandes et al., 2006; Hagège et al., 2006; Murry, 2005; Smith et al., 2008). Diesen Patienten musste daher zusätzlich ein Defibrillator implantiert werden (Makkar et al., 2003). Die Ursachen für das häufige Auftreten von VTs lagen vermutlich in den unterschiedlichen Kontraktionseigenschaften (Murry et al., 1996) und der fehlenden elektrischen Interaktion / Kopplung zwischen den adulten SM und den ansässigen CM, aufgrund der fehlenden Expression von Connexinen bei adulten SM (Leobon et al., 2003; Reinecke, 2002). Dabei sind gerade die Connexine, besonders Connexin 43 (Cx43) das von CM exprimiert wird, für die Reizweiterleitung im Myokard essentiell. Bei einem MI gehen diese durch den Untergang der terminal differenzierten CM verloren. So konnte eine Studie aus unserer eigenen Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass nur eine Transplantation von genetisch veränderten Cx43-exprimierenden SM im Vergleich zu unbehandelten SM das Auftreten von VTs signifikant verringern konnte (Roell et al., 2007).

### **1.4.3 Embryonale Kardiomyozyten**

Embryonale Kardiomyozyten (eCM) werden, wie der Name schon sagt, aus embryonalen Herzen isoliert und für die Regeneration des ischämischen Myokards für eine Zellersatztherapie im Tiermodell eingesetzt. In Versuchen mit Ratten stellte die Injektion von neonatalen oder fetalen CM eine erfolgreiche Methode dar, weil die Zellen im geschädigten Gewebe anwachsen und sich positiv auf die Herzfunktion auswirkten (Huwer et al., 2003; Schuh et al., 2005). Nachdem andere Studien nur einen indirekten Hinweis für eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion aufzeigen konnten (Sakai et al., 1999; Taylor et al., 1998), zeigten Roell et al. im Jahr 2002, dass eCM nach einer intramyokardialen Injektion in ein infarziertes Mausherz zur Maturierung befähigt sind, physiologische Stabilität aufweisen und die Kontraktionseigenschaften des Herzens deutlich steigern. Dies führte zu einer regionalen und globalen Verbesserung der linksventrikulären Funktion (Roell et al., 2002a). Neben der Kontraktionssteigerung ist auch eine Kopplung der injizierten Zellen mit dem umliegenden nativen Myokard unerlässlich, um eine adäquate Reizweiterleitung gewährleisten zu können (Tang et al., 2003).

Der positive Einfluss von transplantierten eCM nach einem myokardialen Infarkt zeigte sich auch in einer verminderten linksventrikulären Dilatation, einer verringerten Ausdünnung des

Infarktareals sowie einer reduzierten myokardialen Dysfunktion (Etzion et al., 2001). Dies konnte in einer aktuelleren Studie bestätigt werden. Hier führte die Injektion der kontraktilen und elektrisch koppelnden eCM ins ischämische Myokard auch zu einer geringeren Infarktausdehnung mit weniger nachteiligem *Remodeling*. Darüber hinaus konnte ebenso eine verbesserte Hämodynamik sowie ein höheres LZ-Überleben der Mäuse verzeichnet werden (Paulis et al., 2013). Obwohl die Zellzahl graduell über einen längeren Zeitraum postoperativ abnahm, blieb die funktionelle Verbesserung erhalten. Diese Tatsache konnte auch von anderen Gruppen verifiziert werden (van der Bogt et al., 2008; Li et al., 2009). Des Weiteren zeigten Untersuchungen von implantierten eCM eine deutliche Reduktion von VTs bei einer erhöhten intrazellulären elektrischen Kopplung innerhalb des Infarktareals (Roell et al., 2007). Die Integration von Cx43-exprimierenden SM führte ebenso zu einer verbesserten Reizweiterleitung im Herzen und zu einem verminderten Auftreten von Post-Infarkt-Arrhythmien (Roell et al., 2007). Zusätzlich zu den eCM werden Fibroblasten und Endothelzellen aus dem embryonalen Herzen isoliert, die scheinbar für die Bildung der extrazellulären Matrix (ECM) verantwortlich sind. Ferner wurde beobachtet, dass transplantierte Zellen vorzugsweise in der *border zone* anwachsen. Bei diesem Phänomen wirken möglicherweise verschiedene Mechanismen mit (Paulis et al., 2013). Für eine klinische Anwendung ist der Einsatz von humanen eCM als Zellersatztherapie aus ethischen und rechtlichen Gründen nicht umsetzbar. Auch die Problematik der immunologischen Abstoßung dieser körperfremden Zellen spricht gegen eine Verwirklichung dieser Therapieoption (Roell et al., 2002a).

### **1.4.4 ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten**

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden während eines sehr frühen Stadiums der Embryonalentwicklung (Blastozystenstadium) aus Embryonen entnommen und weiter kultiviert. Aufgrund ihrer Pluripotenz können sie in Zellen aller drei Keimblätter, so auch CM, differenzieren und stellen daher eine interessante Option für eine zellbasierte Regeneration des MIs dar (Fernandes et al., 2010; Odorico et al., 2001). Bevor die ES-Zellen allerdings therapeutisch zum Einsatz kommen können, müssen verschiedene Hindernisse überwunden werden. So bedingt die Pluripotenz der undifferenzierten embryonalen Stammzellen bei fehlender Aufreinigung die Bildung von Teratomen (Erdö et al., 2003). Neben dem karzinogenen Potential besteht grundsätzlich, insbesondere für Muskelzellen (Kolosso



al., 2005), die Problematik der Generierung qualitativ hochwertiger Zellen in großer Anzahl, da die Entwicklungsrate von embryonalen Stammzellen zu CM mit nur ca. 1 % sehr gering ist (Guan und Hasenfuss, 2007; Kaushal et al., 2009). Bereits im Jahr 1996 konnten relativ reine Kulturen von CM aus differenzierten ES-Zellen generiert und in das Herzgewebe von Mäusen transplantiert werden (Klug et al., 1996). Die transplantierten Zellen werden jedoch nur über einen relativ kurzen Zeitraum nachbeobachtet.

Kolossov et al. gelang im Jahr 2006 durch Expression eines CM-spezifischen Antibiotika-Resistenzgens eine hochreine ES-Zell abgeleitete CM-Population (> 99 %) zu gewinnen. Die Identifizierung der ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten (ES-CM) erfolgte dabei über ein grün fluoreszierendes Protein (GFP), das an einen herzspezifischen Promotor gekoppelt wurde. Die Differenzierung und Anreicherung von ES-CM wurde in Suspensionskultur über die Bildung von *Embryoid Bodies* (Embryonalkörperchen, kurz EBs) und anschließender positiver genetischer Selektion der CM durch Zugabe des Antibiotikums Puromycin erreicht. Nach der Transplantation dieser Zellen in Kombination mit Fibroblasten, zeigten KZ- (Hodgson et al., 2004) sowie LZ-Versuche (4 - 5 Monate) eine verbesserte Pumpfunktion in infarzierten Mausherzen und eine weitgehend unterdrückte Tumorbildung (Kolossov et al., 2006). Im Jahre 2001 gelang erstmals die gezielte Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen zu Zellen, die ihrer Struktur und Funktionalität CM glichen. Diese Zellen exprimierten frühe kardiale Transkriptionsfaktoren wie GATA4, NKX2.5 und MEF, sowie spezielle Strukturproteine des Myokards, zeigten Spontanaktivität und hohe Proliferationsraten (Kehat et al., 2001; Menasché, 2009; Smits et al., 2005). Wie schon bei murinen ES-CM gezeigt werden konnte, können auch humane ES-CM reife, quergestreifte CM ausbilden, die dabei stabil über mehrere Monate nach der Injektion in der Narbe verbleiben (Laake et al., 2008; Laflamme et al., 2007). Ferner besitzen auch die humanen ES-CM die Fähigkeit, elektromechanisch durch Expression von Cx43 an adulte CM zu koppeln (Shiba et al., 2012). Weitere positive Auswirkungen betreffen die Herzfunktion und eine Abschwächung des klassischen Verlaufs des ventrikulären *Remodelings* (Caspi et al., 2007; Leor et al., 2007). Bei einem akuten MI führte eine Injektion humaner ES-CM in Kombination mit einem *pro-survival-cocktail* bei Ratten zu einer Erhaltung der kontraktiven Herzfunktion (Fernandes et al., 2010). Dagegen zeigte die gleiche Methode bei einem chronisch verlaufenden Infarktmodell keine verbesserte Herzfunktion und hatte ebenso keinen Einfluss auf das Einsetzen des nachteiligen *Remodelings*. Ferner berichteten van Laake et al. 2007 in LZ-Untersuchungen von einer nicht-anhaltenden Verbesserung der globalen Funktion unter

Verwendung humaner ES-CM im chronischen Infarktgewebe. Allerdings wurden diese Versuche in einem Xeno-Tx-Modell durchgeführt. Somit stellt auch der Zeitpunkt des Beginns einer zellulären Behandlung einen entscheidenden Faktor dar (Hu et al., 2007; Li et al., 2001). Der genaue Mechanismus für die dargestellten funktionalen Vorteile in der akuten, aber nicht chronischen Phase, ist bis heute nicht bekannt. Eine mögliche Hypothese umfasst erneut die Wirkung parakriner Faktoren (Shintani et al., 2009), die zum einen die Vaskularisierung (Kinnaird et al., 2004) oder Kontraktilität (Lee et al., 2009) begünstigen können und / oder zum anderen eine Degradierung der ECM (Mias et al., 2009) verhindern. Insgesamt hat sich die zelluläre Ersatztherapie durch ihr großes Potential als mögliche Behandlungsstrategie für eine Herzinsuffizienz sowie eine akute oder chronisch ischämische Herzerkrankung herausgestellt. Alle transplantierten Zellen unterliegen allerdings einem großen Problem: dem immensen Zellverlust während der intramyokardialen Injektion und der limitierten Zellüberlebensrate nach einer Transplantation (Fernandes et al., 2010; Yasuda et al., 2005). So zeigte eine Injektion von SM, dass bereits 10 Minuten nach der Transplantation nur noch ca. 60 % der anfänglich injizierten Myoblasten im Myokard nachzuweisen waren. Im Zeitverlauf erhöhte sich dieser Zellverlust kontinuierlich, so dass nach 24 Stunden nur noch 16 % und nach 72 Stunden lediglich 7,4 % der Myoblasten zu detektieren waren (Suzuki et al., 2004). Daher war das Ziel der vorliegenden Studie den enormen Zellverlust durch den Einsatz eines Magnetischen Nanopartikels in Kombination mit geeigneten magnetischen Feldern zu minimieren.

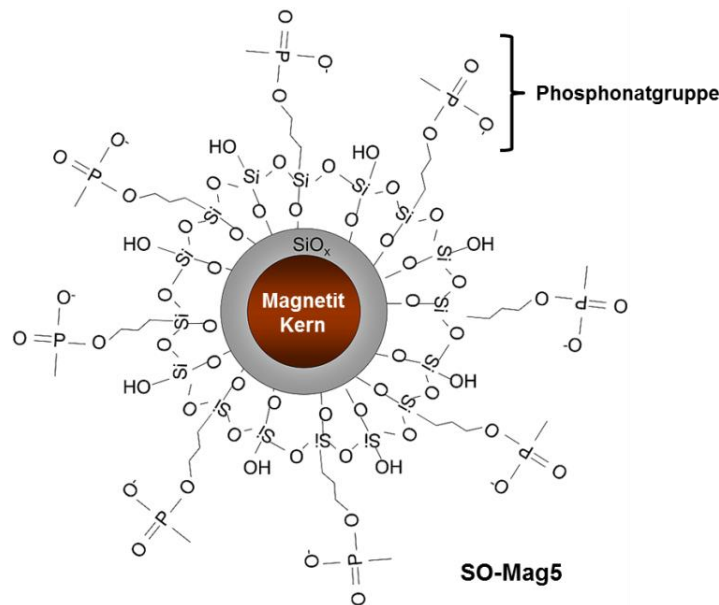
### 1.5 Magnetische Nanopartikel

Die Nanotechnologie ist innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte zu einem anerkannten und innovativen Forschungsgebiet herangereift, wodurch auch die Synthese, Charakterisierung und Modifikation von Nanopartikeln für die biomedizinische und diagnostische Anwendung vorangetrieben wurde (Bikram et al., 2007; Brazel, 2009; Gelbrich et al., 2006; Schmidt, 2007). In den frühen 60er Jahren gelang es erstmals Magnetische Nanopartikel (MNP) für einen begrenzten Zeitraum stabil in einer Flüssigkeit herzustellen und für die *in vitro* Diagnostik einzusetzen (Shinkai, 2002). Seitdem sind MNP für die Forschung und medizinische Anwendung von großem Interesse (Lai et al., 2007; Rieter et al., 2007). Aufgrund ihrer geringen Größe sind sie in der Lage, von Zellen aufgenommen zu werden und

beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen (Hoff et al., 2013; Schroeder et al., 1998).

MNP bestehen aus wenigen bis mehreren hundert Atomen oder Molekülen. Abhängig von der Art des Nanopartikels variieren der Kerndurchmesser (zwischen 5 und 200 nm) und die Zusammensetzung der Hüllschicht (Cushing et al., 2004; Niemeyer, 2001). SO-Mag5, ein MNP, der in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht beispielsweise aus einem 7 nm großen Partikelkern aus Magnetit (Eisen(II,III)Oxid =  $\text{Fe}_{2,3}\text{O}_4$ ) und wird von einer 1 nm dicken Siliziumoxid-Schicht und ca. 500 Phosphonatgruppen umhüllt (Abb. 3). Aufgrund der geringen Größe des Partikelkerns wird dieser MNP als paramagnetisch bezeichnet. Das bedeutet, dass in Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes die MNP praktisch keine magnetische Remanenz aufweisen und nur in einem externen Magnetfeld eine Magnetisierung zeigen (Chen et al., 2011; Gupta und Gupta, 2005; Kubinová und Syková, 2010). Eine Aggregation der Partikel kann so durch die fehlende Restmagnetisierung verhindert werden.

Durch eine variable, materialbedingte Oberflächenbeschaffenheit / Hülle können die MNP für verschiedene biomedizinische Anwendungen verwendet werden (Neuberger et al., 2005). Zu den vier wichtigsten Anwendungsgebieten in der Medizin zählen die Magnetresonanztomographie (MRT) für die Bildgebung, die Hyperthermie, das Transportsystem für medizinische Wirkstoffe und die magnetische Zellseparation (Berry und Curtis, 2003; Gupta und Gupta, 2005; Kubinová und Syková, 2010; Neuberger et al., 2005; Pankhurst et al., 2003; Shinkai, 2002; Torchilin, 2000). Im Nachfolgenden werden neben dem Einsatz in der Wirkstoffpositionierung auch die Anforderungen an die MNP bei einer Anwendung im biologischen System diskutiert, sowie die MNP-basierte zelluläre Ersatztherapie als neue Anwendung in der Nanomedizin vorgestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des MNP SO-Mag5**

Der paramagnetische Nanopartikel SO-Mag5 besteht aus einem 7 nm großen Magnetit-Kern und von einer ca. 1 nm dicken Siliziumoxidhülle umgeben. An jedem So-Mag5-Partikel sind ca. 500 Phosphonatgruppen gebunden.

## 1.6 Potential und Anwendung der MNP in der Biomedizin

### 1.6.1 Wirkstoffpositionierung und Wirkstofffreisetzung

Eine klassische und wirksame Methode der Krebsbehandlung stellt die Chemotherapie dar (Al-Quteimat und Al-Badaineh, 2013). Der Hauptnachteil bei dieser Behandlung ist die relativ unspezifische Wirkungsweise der eingesetzten Chemotherapeutika. Dabei werden neben den Krebs- und Tumorzellen auch gesunde Zellen, die sich ähnlich schnell teilen wie Krebszellen geschädigt. Hierzu gehören die Schleimhautzellen in Mund und Verdauungstrakt, die aufgrund ihrer hohen mechanischen Beanspruchung ständig ersetzt werden müssen. Ebenfalls betroffen sind die Haarwurzeln und die blutbildenden Zellen im Knochenmark. Diese Beeinträchtigung erklärt einen Teil der typischen Nebenwirkungen vieler Chemotherapien (Coates et al., 1983). Um diese Nebenwirkungen zu minimieren und die Wirkstoffe möglichst gezielt und lokal einsetzen zu können, werden MNP bereits seit Ende der 70er Jahre als Target zur Wirkstoffpositionierung und Freisetzung untersucht (Kaiser et al., 2006; Mosbach et al. 1979; Senyei et al 1978.). Auf diese Weise sollen die Effektivität der Wirkung erhöht und gleichzeitig systemische Nebenwirkungen verringert werden (Alexiou et al., 2000; Trueck et al., 2012). Heutzutage wird diese Therapieform auch als „Drug Targeting“ bezeichnet (Sandhiya et al., 2009; Torchilin, 2000).

Die medizinischen Wirkstoffe können reversibel über chemische Bindungen an die Oberfläche der MNP gebunden werden oder in das Innere der Partikel eingebracht werden. Nach Injektion der Dispersion in die Blutbahn werden die magnetischen Träger mit Hilfe äußerer Magnetfelder in die betroffene Region lokal aufkonzentriert (Lübbe et al., 2001; Neuberger et al., 2005; Rudge et al., 2001). Durch enzymatische Aktivität oder Änderung der physiologischen Bedingungen wie pH-Wert, Osmolarität oder Temperatur wird die Wirkstofffreisetzung induziert (Alexiou et al., 2000; Pankhurst et al., 2003).

Zusätzlich können die MNP durch biokompatible Polymere umhüllt werden, um einerseits Fließeigenschaften zu verbessern und andererseits die Hülle für die Kopplung medizinischer Wirkstoffe oder Antikörper ausnutzen zu können (Barratt, 2003; Ruenraroengsak et al., 2010; Veiseh et al., 2010). Wichtig für eine systemische Injektion ist die Kapillargängigkeit der MNP, um embolisch bedingte Gefäßverschlüsse verhindern zu können (Huang et al., 2013). Nach Datenlage beträgt die optimale Partikelgröße für eine intravenöse Applikation zwischen 10 nm - 100 nm (Kaiser et al., 2006), wobei auch physikalische Faktoren, wie Feldstärke und Gradient des Magnetfeldes und hydrodynamische Parameter, wie die Blutflussrate die Effektivität dieses Verfahrens beeinflussen.

## 1.7 Anforderungen an die MNP im biologischen System

Für die Anwendung im biologischen System müssen die Nanomaterialien bestimmte Anforderungen erfüllen (Desai, 2012). Grundlegende Bedingungen betreffen die Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit der MNP, um möglichst homogen mit der Umgebung in Wechselwirkung treten zu können (Sun und Zeng, 2002). Eine monodisperse Größenverteilung der Partikel wird angestrebt, da die physikalischen, biologischen und chemischen Eigenschaften der MNP stark von ihrer Größe abhängig sind (Sun et al., 2000). Monodisperse MNP haben darüber hinaus den großen Vorteil, dass sie in Flüssigkeiten nicht zur Agglomeration neigen (Brazel, 2009). Dies ist essentiell, um wie bereits erwähnt eine Kapillargängigkeit und Embolien vermeiden zu können (Gupta et al., 2007). Um eine systemische Injektion durchführen zu können, muss der durchschnittliche hydrodynamische Teilchendurchmesser klein genug sein ( $< 100$  nm) (Gessner et al., 2000; Moghimi und Szabeni, 2003). Sphärische Partikel weisen hierfür die besten hydrodynamischen Eigenschaften in der vorliegenden wässrigen Dispersion auf (Brazel, 2009). Ferner sollte der Eisenkern der Partikel über eine ausreichend hohe Fähigkeit zur Magnetisierung verfügen,

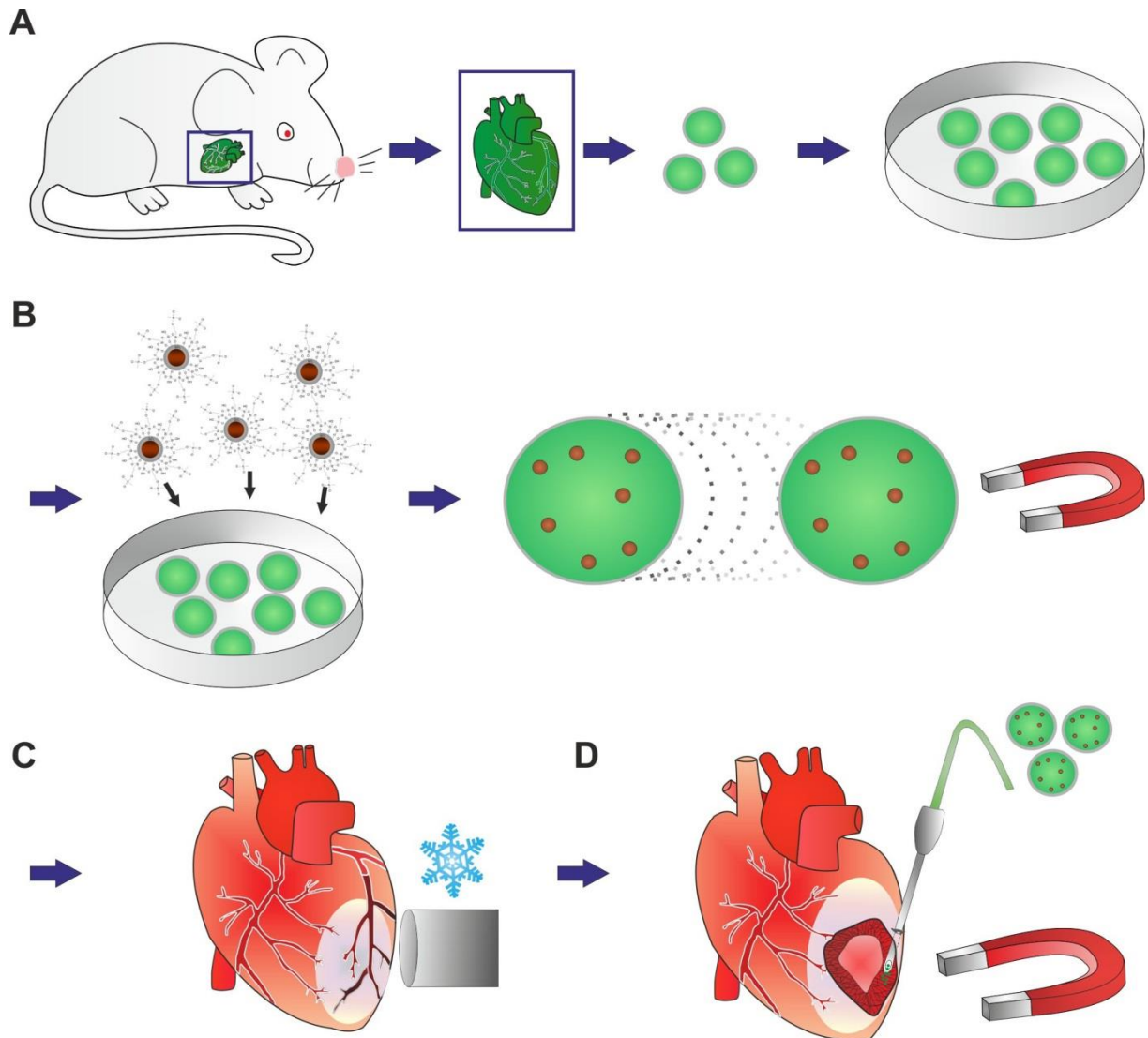
damit von außen wirkende Magnetfelder die MNP gegen den Blutstrom bewegen und fixieren können (Neuberger et al., 2005). Auch sind die Sedimentationseigenschaften der MNP im Trägermedium *in vitro* wichtig, damit eine möglichst homogene direkte oder indirekte Zellbeladung erfolgen kann (Bhirde et al., 2011; Gupta und Gupta, 2005; Ponomarev, 2009).

### **1.8 Neue Anwendung in der Nanomedizin: MNP-basierte zelluläre Ersatztherapie**

Der zelluläre Gewebeersatz stellt eine aussichtsreiche neue Therapieform zur Regeneration von myokardialen Narbengewebe dar (Wollert und Drexler, 2005). Ein großes Hindernis stellt der enorme Zellverlust während der intramyokardialen Injektion dar, unabhängig vom Zelltyp oder vom Infarktmodell (Fukushima et al., 2007). So konnten in der akuten Phase und zwei Wochen nach einer Injektion weniger als 10 % der transplantierten Zellen im Myokard nachgewiesen werden (Robey et al., 2008; Roell et al., 2007; Yasuda et al., 2005). Der dafür zugrundeliegende Mechanismus ist bis heute noch unklar, jedoch scheint eine Immunreaktion alleine nicht dafür verantwortlich zu sein (Kanoh et al., 1999). So wurde in früheren Studien die Apoptose aufgrund des hypoxischen und phlogistischen Infarktareals für die geringe Zellüberlebensrate verantwortlich gemacht (Ye et al., 2007; Zhang et al., 2001). Neuere Studien sehen jedoch in dem Verlust von injizierten Zellen über den Stichkanal sowie das Koronarsystem einen weiteren Hauptgrund für die limitierte Zellintegration (Cheng et al., 2010; Suzuki et al., 2004; Teng et al., 2006; Terrovitis et al., 2009). Andere Studien befanden die Injektionsmethode selbst als Ursache für den großen Zellverlust, bedingt durch die entstandene mechanische Verletzung beim Einstich in das Myokard und der daraus resultierenden Entzündungsreaktion (Müller-Ehmsen et al., 2002; Reinecke et al., 1999). Um diese Problematik beheben zu können, wurde der Stichkanal der Nadel mit Hilfe eines Fibrin-Klebers verschlossen oder Zellen während der intrakardialen Injektion von einer viskösen Matrix umhüllt (Terrovitis et al., 2009; Wang et al., 2008). Beide Ansätze hatten jedoch die Nachteile, dass einerseits der Zell-Reflux umgehend nach Entfernung der Injektionsnadel einsetzt und andererseits die visköse Matrix die wichtige Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten behindert.

Daher repräsentiert die MNP-basierte Zellersatztherapie einen nichtinvasiven Ansatz, um die Zellintegrationsrate und die Herzfunktion für eine Kurz- und Langzeit-Therapie nach einem

MI verbessern zu können. Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Vorgehensweise ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4: Schematische Zusammenfassung der Vorgehensweise von der Isolierung und MNP-Beladung von eCM, bis hin zur intramyokardialen Injektion mit und ohne Magnetfeld-Applikation**

(A) Die eCM wurden aus einer transgenen  $\alpha$ -Aktin-eGFP-Mauslinie gewonnen. (B) Nach Isolierung und Ausplattierung der Zellen erfolgte die Beladung mit dem MNP SO-Mag5 über Nacht *in vitro*. Durch die MNP-Beladung konnten die Zellen so stark magnetisiert werden, dass sie sich durch geeignete Magnetfelder anziehen ließen. (C) Bei den Transplantationsexperimenten wurden die Herzen von CD1-WT Mäusen mit Hilfe eines in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Kupferstempels kryoinfarziert und die SO-Mag5-beladenen eCM nach Ablösung von der Zellkulturschale mit und ohne Magnetfeld-Applikation intramyokardial in das Infarktareal injiziert (D).

## 1.9 Zielsetzung

Die zelluläre Ersatztherapie stellt eine interessante experimentelle Therapieform zur Regeneration von myokardialen Narbengewebe dar. Es ist jedoch seit längerem bekannt, dass es während und unmittelbar nach der intramyokardialen Zellinjektion zu einem immensen Zellverlust kommt, der sich in einer geringen Zellintegrationsrate im Infarktareal widerspiegelt. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, durch Einsatz spezifischer MNP in Kombination mit geeigneten Magnetfeldern die Zellintegrationsrate von intramyokardial injizierten Zellen kurz- und langfristig zu verbessern.

Zunächst wurde *in vitro* der am besten geeignete MNP für die Beladung verschiedener Zelltypen (BMC, eCM und ES-CM) identifiziert, um eine maximale Magnetisierung der Zellen zu ermöglichen. Daran anschließend wurde die lokale Positionierung der MNP-beladenen Zellen unter dem Einfluss speziell designter Magnetfelder *in vitro* untersucht und die experimentellen Ergebnisse mit numerischen Simulationen verglichen. Darüber hinaus wurde auch die Zelltoxizität der MNP untersucht und die MNP-beladenen Zellen elektrophysiologisch charakterisiert. Die zelluläre *in vitro* Integration der MNP wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen ermittelt.

Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro*-Vorversuche, wurden die MNP-beladenen Zellen *in vivo* mit und ohne Applikation eines Magnetfeldes in kryoinfarzierte Herzen injiziert. Um die transplantierten Zellen postoperativ bereits im nativen Myokard identifizieren zu können, wurden transgene Mäuse und Stammzelllinien verwendet, die das Reporter-gen eGFP bzw. DS-Red exprimieren. Über das Fluoreszenzsignal sollte hierbei eine qualitative und quantitative Analyse der Zellintegrationsrate ermöglicht werden. Um die Anzahl der integrierten Zellen nach der Transplantation zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgen zu können, wurden die Zellen präoperativ zusätzlich mit einem Luciferase-Virus transduziert und die operierten Tiere postoperativ mit Hilfe von Biolumineszenz-Scans zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Zusätzlich wurde die kardiale Funktion durch das Verfahren der links- und rechtsventrikulären Katheterisierung sowie die elektrische Vulnerabilität ermittelt. Angestrebt wurden Kurz- (14 Tage) und Langzeit- (56 Tage) Studien. Ferner sollten verschiedene immunhistochemische Färbungen ( $\alpha$ -Aktinin, CD45, Mac2, PCM1, Pecam, Vimentin) Aufschluss über den Charakter und die Expression der Zellen geben. Mittels Preußisch-Blau-Färbungen wurde die Beladung und Verteilung der MNP innerhalb der Zellen und des Myokards nachgewiesen. Mit Hilfe der Proliferationsmarker Ki-67 und PHH3 sowie



der Apoptosemarker Caspase3 und TUNEL konnte untersucht werden, ob eine intramyokardiale Injektion unter Applikation eines Magnetfeldes Auswirkungen auf die Proliferation und Apoptose der injizierten eGFP<sup>+</sup>-CM zu verschiedenen Zeitpunkten hat. MPS-Analysen von verschiedenen Organen gaben über das Schicksal der injizierten MNP im Myokard zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten Aufschluss.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Medien und Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant
Ammonium-Acetat ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$ )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Agarose	Carl Roth (Karlsruhe, D)
2-Propanol	AppliChem (Darmstadt, D)
Ammonium Fe(II) Sulfat Hexahydrat ( $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_6$ )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
$\beta$ -Merkaptoethanol	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
DEPC Wasser	Life Technologies (Darmstadt, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
D-Luciferin	Appllichem (Darmstadt, D)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Eindeckmedium auf Polyvinylalkoholbasis (Fluka)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Entellan <sup>®</sup>	Merck (Darmstadt, D)
Eosin G-Lösung (0,5 %), wässrig	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Eserserum	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Ethanol, 70 %	Fischar (Saarbrücken, D)
Ethanol, 100 %	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Evans Blue	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Fibronektin (0,1 %)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FSH (Follikelstimulierendes Hormon) Intergonan <sup>®</sup>	Intervet GmbH (Tönisvorst, D)
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech (Aidenbach, D)
Gelatine	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)

## Material und Methoden

---

Geneticindisulfat (Neomycin, G418)	Life Technologies (Darmstadt, D)
Immersionsöl Immersol 518F	Zeiss (Jena, D)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Hämatoxylin Quick Stain	Vectorlaboratories (Burlingame, USA)
<i>Hanks Balanced salt solution</i> (HBSS <sup>++</sup> ), mit Calcium und Magnesium	Life Technologies (Darmstadt, D)
hCG (Humanes Choriongonadotropin)	Schering- GmbH (Berlin, D)
HCl (2 mol/l)	Fluka (Seelze, D)
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm (Ulm, D)
Hoechst 33342 (1 mg/ml)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Hydroxylaminhydrochlorid (H <sub>4</sub> ClNO)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (IMDM)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Kaliumhexacyanoferrat(II) (K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> )	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Kollagenase B	Roche (Mannheim, D)
Kollagenase Typ II	Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NY, USA)
Magnetische Nanopartikel (MNP)	Dr. Olga Mykhaylyk (TU München)
Matrigel (10 mg/ml)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck über VWR (Darmstadt, D)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA, MEM)	Life Technologies (Darmstadt, D)
Nuclear Fast Red Solution	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Darmstadt, D)
RNaseZap	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Saccharose 99 %	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Salzsäure, rauchend	AppliChem (Darmstadt, D)
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	07208 Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sekura Finetek Europe B.V. (Zoeterwoude, NL)
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Triton-X100	Sigma Aldrich (Taufkirchen, D)
Trypsin / EDTA 0,05% (w/v)	Life Technologies (Darmstadt, D)

### 2.1.2 Reagenziensätze und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Lieferant
Aclar Folie (20,3 cm x 31,8 cm, Dicke 0,198 mm)	Plano GmbH (Wetzlar, D)
Deckgläser	VWR (Darmstadt, D)
Dreiwegehahn Discifix C-3	Braun (Melsungen, D)
Dumont Pinzette, gerade	Plano (Wetzlar, D)
Einwegskalpelle Nr. 10	Feather Saftey Razor (Osaka, Japan)
Filterpapier	VWR (Darmstadt, D)
Furene®	Abbott GmbH&CoKG (Wiesbaden, D)
Gase: Sauerstoff, Lachgas, flüssiger Stickstoff	Linde Gas Therapeutics GmbH und CoKG (Unterschleißheim, D)
Hamilton 10 µl Spritze	Hamilton (USA)
Heidelberger Verlängerungen	Fresenius Kabi (Bad Homburg, D)
Insektennadeln	Plano (Wetzlar, D)
Irisschere	Plano (Wetzlar, D)
Kanüle BD Microlance 3, versch. Größen	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Kollagen Schale (BD Collagen Type IV, 35 mm)	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Kryoröhrchen: 1,8 ml	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Küvetten für Photometer	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Kugeln, Stainless Steel Beads, 7 mm	Qiagen (Hilden, D)
Leukosilk®	BSN Medical GmbH (Hamburg, D)
Leukofix®	BSN Medical GmbH (Hamburg, D)
Med Comfort Einwegrasierer	AMPri GmbH (Stelle, D)

## Material und Methoden

---

Mikroarrays MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip Kit	Illumina (San Diego, USA)
Mikro-Löffelspatel (Edelstahl 18/10, antimagnetisch)	VWR (Darmstadt, D)
Nitrocellulosemembran Protran BA 85	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, D)
Nylon-Filter (Cell Strainer): 40 µm, 100 µm	BD Falcon (Gräfeling-Lochnam, D)
Objektträger Super Frost	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Objektträger Histobond	Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
Omnifix Luer Lock solo Spritze, 10 ml	Braun (Melsungen, D)
Original Perfusor-Leitung	B. Braun Melsungen (Melsungen, D)
Präparierschale, 6 cm, Boden bedeckt mit Silikon	eigene Herstellung
Perfusorspritzen-Spritzen, 50 ml	Braun (Melsungen, D)
Peroxidase Substrate Kit AEC	Vectorlaboratories (Burlingame, USA)
Petrischalen	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Pipettenspitzen mit Filter	Nerbe Plus (Winsen/Luhe, D)
Schlauch, PVC Tygon R3607 (ID: 1,52 mm, Wand: 0,86 mm), Gelb-Blau	VWR (Darmstadt, D)
Schlauch, PVC PharMed BPT (ID: 2,06 mm, Wand: 0,80 mm), Lila-Lila	VWR (Darmstadt, D)
Schlauch für Hamilton zur Zellinjektion (Portex Time Bore, Polythene Tubing 30 m)	Smiths Medical International (Grasbrunn, D)
Schlauchverbinder Übergangsstück PP	VWR (Darmstadt, D)
Silikonschlauch 2 x 1mm, transparent	VWR (Darmstadt, D)
PCR-Gefäße: 0,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Präparationsbesteck für OPs	F.S.T. (Heidelberg, D); Plano (Wetzlar, D); World Precision Instruments (Inc. Sarasota, USA)
Prolene Nahtmaterial	Johnson & Johnson (Livington, Schottland)

Reaktionsgefäß: 0,2 ml, 0,5 ml	VWR (Darmstadt, D)
Reaktionsgefäß: 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reaktionsgefäß, 2 ml mit abgerundetem Boden	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Schere	Plano (Wetzlar, D)
Schnappdeckeldosen	Kartell Spa Labware Division (Noviglio, IT)
Serologische Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner bio-one (Frickenhausen, D)
TRIzol™	Invitrogen/Life Technologies, (Darmstadt, D)
Vapor für Isofluran	Drägerwerk AG (Lübeck, D)
Vasofix®Safety 22G	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, D)
Vanna's Mikroschere, gerade	Plano (Wetzlar, D)
Vectastain ABC Kit, Rabbit IgG	Vectorlaboratories (Burlingame, USA)
Zählkammer: Thoma	VWR (Darmstadt, D)
Zellkulturflasche: 25 cm <sup>2</sup>	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Zellkulturplatte: 6-Well, 24-Well, 96-Well	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Zellkulturplatte, 96-Well mit Glasboden (265300)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturschale, 10 cm; 15 cm	BD Biosciences (Heidelberg, D)
Zellkulturschale mit Folienboden, 3 cm	Lumox 35 mm, Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zentrifugierröhrchen 15 ml, 50 ml	

### 2.1.3 Geräte

Gerät	Hersteller
ApoTome	Zeiss (Jena, D)
AxioCam MRm	Zeiss (Jena, D)
Bioanalyzer 2100	Aligent (Boeblingen, D)

## Material und Methoden

---

CIB'ER Mouse™ Electrophysiology Catheter	NuMED, (New York, USA)
Conductance Interface Aria	Millar Instruments (Houston, USA)
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 240	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Feinwaage	Mettler Toledo (Gießen, D)
Fluoreszenzlampe ebq 100	Leica (Wetzlar, D)
Fluoreszenzlampe XBO 75	Zeiss (Jena, D)
Fluoreszenz Stereomikroskop Leica MZ 16F	Leica (Wetzlar, D)
Gefrierschränke (-20°C, -80°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Glasperlensterilisator Steri250	Simon Keller (Burgdorf, Schweiz)
Heizplatte für Mäuse	Eigene Herstellung
HERAguard Reinluftwerkbank HPH4	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	VWR (Darmstadt, D)
Horizontalschüttler	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, D)
Injektionshilfe	Eigene Herstellung
Isolated Pulse-Stimulator Modell 2100	A-M-Systems (USA)
Kaltlichtquelle KL1500LCD	Leica (Wetzlar, D)
Kühlschränke (4°C)	Liebherr (Biberach an der Riss, D)
Kryotom CM3050S	Leica (Wetzlar, D)
LED Lichtquelle für Stereolupe LED3000SLI	Leica (Wetzlar, D)
LötKolben WHS 40D	Weller (Besigheim, D)
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & CoKG (Schwabach, D)
Magnetplatten	Chemicell (Berlin, D)
Magnetspitzen	Eigene Herstellung
Magnetständer	Eigene Herstellung, Magnete: N44 Quadermagnet (QM-20x05x02-N), N50 Quadermagnet (QM10x04x02G), <a href="http://www.magnet-shop.de">www.magnet-shop.de</a>



---

Mikroskop Axiovert 200 M	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Observer Z1	Zeiss (Jena, D)
Mikroskopkamera ProgRes C10+	Jenoptik (Jena, D)
Mikrowelle	KOS Microwave HistoSTATION (Milestone, D)
Millar 1,4 F Minipress Katheter	Millar Instruments (Houston, USA)
MiniVent Type 845	Hugo Sache Elektronik, Harvard Apparatus, (March, D)
NanoDrop 100 Spektrometer	Peqlab, Erlangen
Photometer SmartSpec 3000	BioRAD (München, Deutschland)
pH-Meter 765 Calimatic	Knick (Berlin, D)
Pipetten	Gilson (Limburg, D)
Pipettierhilfe	Integra Bioscience (Fernwald, D)
Plattenlesegerät Infinite M200 Pro	Tecan (Männedorf, Schweiz)
PowerLab 16/30	AD Instruments, Pty LTD (Australia)
ProgRes C10 Plus	JenOptik AG (Jena, D)
Rollerpumpe Minipuls 3	Gilson International B.V. (Limburg- Offheim, D)
Stabmagnet, 1,3 Tesla	Neodymium Magnet-Zylinder, HKCM Engineering e.K (Eckernfoerde, D)
Stereolupe M651	Leica (Wetzlar, D)
Stereolupe M3 und M8	Wild Heerbrugg (Heerbrugg, Schweiz)
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stickstofftank	TecLab
Thermomixer HLC	Ditabis (Pforzheim, D)
Tischzentrifuge 5424R (mit Kühlfunktion)	Eppendorf (Hamburg, D)
Tissue Lyser LT	Qiagen (Hilden, D)

## Material und Methoden

---

Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, D)
Verstärker für EKG	Eigene Herstellung
Vortexer	VWR (Darmstadt, D)
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft GmbH (D)
Wippe Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, D)
Xenogen IVIS 200	Caliper Life Sciences (Hopkinton, USA)
Zentrifuge Multifuge 4KR	Heraeus (Hanau, D)

### 2.1.4 Software

#### Bezeichnung

#### Lieferant

Axio Vision Release 4.8	Zeiss (Jena, D)
Capture Pro Image Acquisition Software	JenOptik AG (Jena, D)
CorelDRAW Graphics Suite X5	Corel Corporation (München, D)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (La Jolla, USA)
LabChart 7	AD Instruments Pty LTD (Australia)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Unterschleißheim, D)
PVAN Analysis Software	Millar Instruments (Houston, USA)
ProgRes Image Capture Software	Jenoptik (Jena, D)
Stimulus 3.4	AG Sasse (von Henning Begerau entwickelt)
WCIF ImageJ	Wayne Rasband, National Institute of Mental Health (Bethesda, USA)

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

#### Puffer und Lösungen

#### Zusammensetzung

Ammoniumacetat Puffer	25 g Ammoniumacetat 70 ml Essigsäure 110 ml H <sub>2</sub> O bidest.
-----------------------	--

Custodiol (Brettschneider-Lösung)	<p>15,0 mmol/l Natriumchlorid            9,0 mmol/l Kaliumchlorid            4,0 mmol/l Magnesiumchlorid (6 H<sub>2</sub>O)            18,0 mmol/l Histidin HCl (H<sub>2</sub>O)            180,0 mmol/l Histidin            2,0 mmol/l Tryptophan            30,0 mmol/l Mannitol            0,015 mmol/l Calciumchlorid (2 H<sub>2</sub>O)            1,0 mmol/l Kaliumhydrogen-2-            ketoglutarat</p>
DPBS	<p>2,67 mM KCl            1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            137,93 mM NaCl            8,06 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></p>
Eisen-Standard-Lösung	<p>392,8 ml Ammonium Fe(II) Sulfat            Hexahydrat            2 ml konzentrierte Schwefelsäure            Natriumpermanganat            ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest.</p>
Einfriermedium	<p>20 % DMSO            80 % FCS</p>
Fibronektin-Lösung (0,001 %)	<p>Fibronektin-Stammlösung (0,1 %) in            PBS</p>
Gelatine-Lösung (1 %)	<p>1 g Gelatine in 100 ml PBS            Autoklavieren</p>
Gelatine-Lösung (0,1 %)	<p>1 % Gelatine 1:10 mit PBS verdünnen</p>
HBSS <sup>++</sup>	<p>1,26 mM CaCl<sub>2</sub>            5,56 mM Glukose            5,33 mM KCl            0,441 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            137,93 mM NaCl            4,17 mM NaHCO<sub>3</sub>            0,338 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            0,493 mM MgCl<sub>2</sub>            0,407 mM MgSO<sub>4</sub></p>

## Material und Methoden

---

Hoechst-Lösung	1 ml Hoechst 33342 999 ml PBS
KB-Lösung	85 mM KCL 30 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 mM MgSO <sub>4</sub> 1 mM EDTA 5 mM Na <sub>2</sub> ATP 5 mM Pyruvat 5 mM Kreatin 20 mM Taurin 20 mM Glucose Mit KOH auf pH 7,2
LIF	10 <sup>6</sup> U / ml Stocklösung Endkonzentration 10 <sup>3</sup> U / ml
Neomycin, G418 (Geneticindisulfat)	300 mg / ml Stocklösung in PBS Endkonzentration 300 µg / ml
Paraformaldehyd (0,2 %)	4 g PFA 100 ml Reinstwasser NaOH + Wärme zum Lösen HCL zum Neutralisieren Sterilfiltrieren
Säurelösung für die Nicht-Häm-Eisen-Bestimmung	3 M HCl 0,61 M TCA
Triton-X-100-Lösung	100 µl Triton-X-100 49,9 ml PBS

## 2.1.6 Zusammensetzung von Zellkulturmedien

### Bezeichnung

15 % DMEM

(→ Kultivierung undifferenzierter embryonaler Stammzellen)

20 % IMDM

(→ Differenzierung embryonaler Stammzellen)

10 % RPMI

(→ Kultivierung von Knochenmarkzellen)

### Zusammensetzung

15 % (v/v) FKS

1 % (100 U/ml) Penicillin /

(100 µg/ml) Streptomycin

1 % (0,1 mM) nicht-essentielle

Aminosäuren (NEAA)

0,1 % (0,1 mM) β-Merkaptoethanol

82,9 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

20 % (v/v) FKS

1 % (100 U/ml) Penicillin /

(100 µg/ml) Streptomycin

1 % (0,1 mM) nicht essentielle

Aminosäuren (NEAA)

0,1 % (0,1 mM) β-Merkaptoethanol

77,9 % IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)

10 % (v/v) FKS

1 % (100 U/ml) Penicillin /

(100 µg/ml) Streptomycin

89 % RPMI (Roswell Park Memorial Institute)

## **2.1.7 Eukaryotische Zelllinien**

### **2.1.7.1 D3 mES-Zellen**

Bei der D3-Zelllinie handelt es sich um murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen), die aus der Blastocyste einer 129 S4/SvPas-Maus isoliert wurden. Die Mauslinie wurde 1985 von Doetschman et al. etabliert. Bestellt wurde diese Zelllinie bei *American Type Culture Collection* (ATCC, Manssas, USA).

### **2.1.7.2 ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten**

Zur Generierung von ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten wurden murine embryonale Stammzellen (D3-Zelllinie) verwendet. Es wurde eine etablierte, mit einem  $\alpha$ -MHC-Puro-IRES-eGFP-Konstrukt transfizierte D3-Zelllinie ( $\alpha$ -PIG) verwendet. Der  $\alpha$ -PIG-Vektor besteht aus einer Expressionskassette mit einem Puromycin-Resistenzgen, einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) und dem Reporter gen eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) unter Kontrolle des herz-spezifischen Promotors  $\alpha$ -MHC ( $\alpha$ -Myosin). Zur Differenzierung wurde der Klon  $\alpha$ -PIG44 verwendet (Kolossoff et al., 2006).

## **2.1.8 Lentivirale Vektoren**

Verwendet wurden selbst inaktivierende (SIN), VSV.G pseudotypisierte lentivirale Vektoren (LVs) der dritten Generation, basierend auf pRRL-SIN18 (Pfeifer und Hofmann, 2009). Der Transgentransfervektor liegt bei LVs dieser Generation getrennt von den Plasmiden mit den Struktur- und Verpackungssequenzen (pMDLg/pRRE, RSV-rev, pMD.G) vor. Somit basiert das Virus auf der Sequenz des HI-Virus, wodurch Zellen durch Reverse Transkription ihrer RNA und Integration der so entstehenden DNA in das Genom der Zielzelle effizient transduziert werden können. Durch Entfernung zahlreicher reproduktionsrelevanter Elemente und Verpackungsproteine kann jedoch eine infektiöse Reproduktion des Virus in der Zielzelle ausgeschlossen werden (Dull et al., 1998). Die Virusherstellung und Titration wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Trueck et al., 2012). Dabei wurde der biologische und / oder physikalische Titer der LV, je nach Vorhandensein einer Expressionskassette für eGFP, bestimmt. Der biologische Titer, der die Anzahl der infektiösen Viruspartikel (IPs) pro ml angibt, wurde über das im Transgentransfervektor enthaltene eGFP-Gen bestimmt. Ohne

Fluoreszenzgen konnte nur der physikalische Titer, der die Viruspartikel (VP) pro ml angibt, anhand der aktiven viralen Reversen Transkriptase (RT) mit Hilfe eines kolorimetrischen RT-ELISAs (ng RT pro  $\mu$ l Virussuspension) ermittelt werden. Mit der Formel aus Trueck et al., 2012 wurden anschließend aus der Konzentration aktiver viraler RT und unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes sowie der Avogadro-Zahl die Viruspartikel pro ml (VP / ml) bestimmt.

Alle LVs wurden von den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie, der Universität Bonn nach einem bereits etablierten Protokoll (Zimmermann et al., 2011) generiert und zusammen mit den ermittelten Titern zur Verfügung gestellt. Die lentiviralen Plasmide sowie die Verpackungsplasmide wurden ursprünglich von Dr. Inder M. Verma (*The Salt Lake Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics, La Jolla, San Diego, USA*) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.8.1 Verpackungskonstrukte

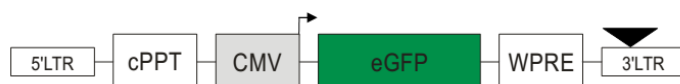
Das Verpackungskonstrukt pMDLg/pRRE exprimiert die HIV-Gene *gag* und *pol* unter Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV)-Promoters. Eine Expression des *regulator of expression of virion proteins (rev)* unter Kontrolle des Rous-Sarkom-Virus (RSV)-Promoters liegt bei dem Verpackungskonstrukt RSV-*rev* vor. Als drittes Konstrukt wurde pMD.G verwendet. Dieses codiert für das Hüllprotein (*env*) VSV.G unter Kontrolle des CMV-Promoters. Diese Verpackungskonstrukte waren für alle verwendeten Viren identisch, die Transgentransfervektoren hingegen variabel.

#### 2.1.8.2 Transgentransfervektoren

##### 2.1.8.2.1 rrl-CMV-eGFP

Bei diesem Vektor wird das Reportergen eGFP unter Kontrolle des ubiquitären CMV-Promoters exprimiert (Abb. 5).

#### Konstrukt:



Vektorkarte:

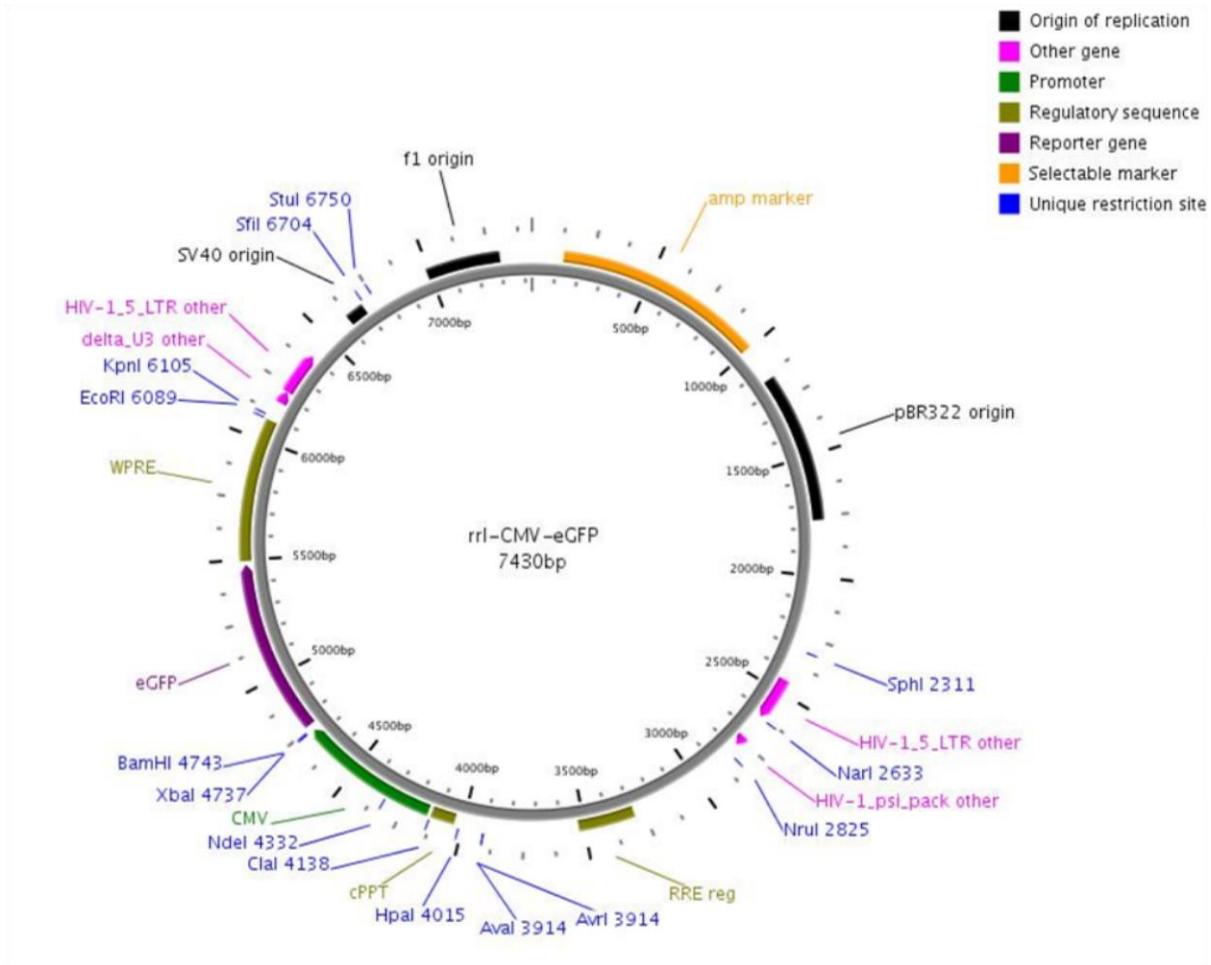


Abbildung 5: Lineare schematische Darstellung des Konstrukts rrl-CMV-eGFP mit Vektorkarte

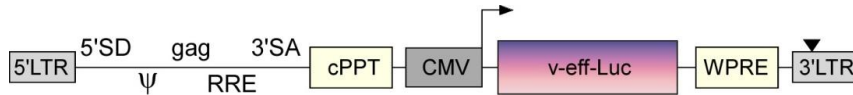
LTR = long terminal repeat, cPPT = central polyurine tract, CMV = Promotor des Cytomegalievirus, eGFP = enhanced GFP, WPRE = posttranslationell regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus. Schwarzes Dreieck im Konstrukt = Mutation in der 3'LTR-Region, für eine Selbstinhibierung des Virus (SIN-Vektor).

2.1.8.2.2 rrl-CMV-veffLuc

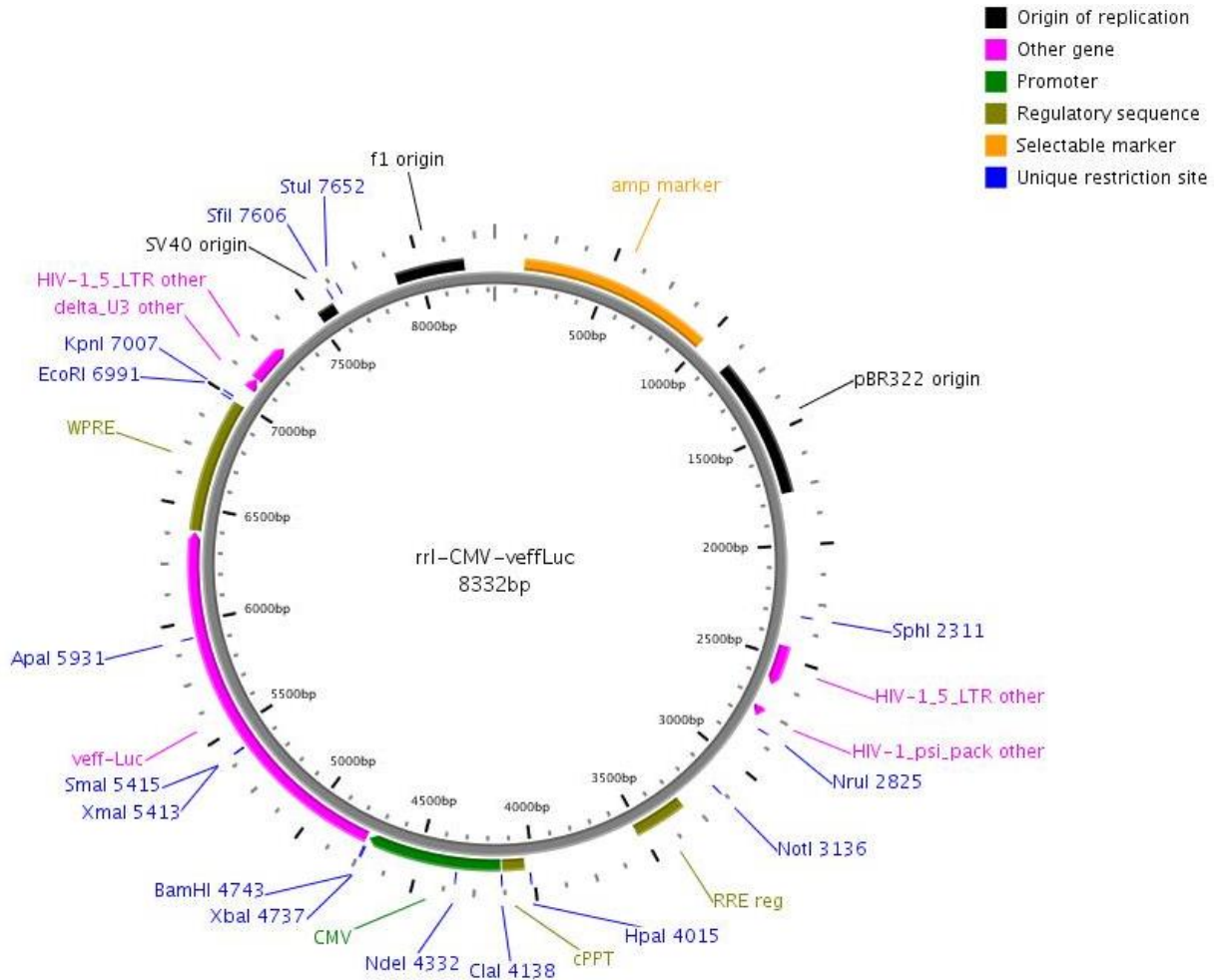
Bei diesem Vektor wird eine verstärkte, Codon-optimierte firefly Luciferase (veffLuc) unter dem CMV-Promoter exprimiert. Das Transgen veffLuc wurde freundlicherweise von Dr. Patrick Hwu (University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, USA) zur Verfügung gestellt (Rabinovich et al., 2008) und von Dr. Katrin Zimmermann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) in den Leervektor rrl-SIN18 kloniert (Abb. 6).



**Konstrukt:**



**Vektorkarte:**



**Abbildung 6: Lineare schematische Darstellung des Konstrukts rri-CMV-veff-Luc mit Vektorkarte**

LTR = long terminal repeat, cPPT = central polyurine tract, CMV = Promotor des Cytomegalievirus, v-eff-Luc = optimierte firefly Luciferase, WPRE = posttranslationell regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis Virus. Schwarzes Dreieck im Konstrukt = Mutation in der 3'LTR-Region, für eine Selbstinhibierung des Virus (SIN-Vektor).

**2.1.9 Magnetische Nanopartikel (MNP)**

Alle in dieser Arbeit verwendeten MNP wurden durch Dr. Olga Mykhaylyk (Arbeitsgruppe von Prof. Plank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) hergestellt und näher charakterisiert.

Der Partikelkern besteht aus Magnetit (Eisen(II,III)Oxid,  $\text{Fe(II)Fe(III)}_2\text{O}_4$ ) und wird von einer Siliziumoxid-Schicht und von Phosphonatgruppen umhüllt. Aufgrund der geringen Größe der Partikelkerne von ca. 4 bis 12 nm können die MNP als paramagnetisch bezeichnet werden. In Abwesenheit eines externen magnetischen Feldes zeigen die MNP eine sehr geringe Magnetisierung, jedoch eine relative hohe Magnetisierung bei einem angelegten magnetischen Feld. Abhängig von der Art des Nanopartikels variieren der Kerndurchmesser und die Zusammensetzung der Hüllschicht. In Tabelle 1 sind die wichtigsten physikalischen Eigenschaften verschiedener MNP dargestellt.

**Tabelle 1: Physikalische Eigenschaften der MNP**

Eigenschaften	SO-Mag5	PEI-Mag2	NDT-Mag1	PALD2-Mag1	TF-HES-Mag
<b>Kerndurchmesser [nm]</b>	6,8	9	11,6	4	10
<b>Hüllschicht</b>	Siliziumoxid mit Phosphonatgruppen (SiO <sub>x</sub> /Phosphonate)	Zonyl FSA mit verzweigtem Polyethylenimin (25 kDa)	1,9-Nonandithiol mit Zonyl FSA	Palmytoyl-dextran mit Zonyl FSA	Hydroxyethyl mit humanen Transferrin
<b>Magnetisches Moment</b> $m_{\text{eff}}$ [A m <sup>2</sup> ]	$3,3 \times 10^{-19}$	$8,7 \times 10^{-20}$	$2,2 \times 10^{-19}$	$6,45 \times 10^{-16}$	$1,9 \times 10^{-19}$
<b>Elektrokinetisches Potential in HBSS<sup>++</sup> [mV]</b>	$- 9,2 \pm 0,4$	$+ 13,4 \pm 1$	$- 7,5 \pm 1,3$	$- 8,8 \pm 0,3$	$- 3,1 \pm 0,4$
<b>Hydrodynamischer Partikeldurchmesser in HBSS<sup>++</sup> [nm]</b>	$40 \pm 14$	$63 \pm 36$	$42,6 \pm 6,2$	$55 \pm 11$	$90,5 \pm 56$
<b>Publikation</b>	Mykhaylyk et al., 2012a	(Mykhaylyk et al., 2007, 2009, 2010; Tresilwised et al., 2010)	Mykhaylyk et al., 2009	Mykhaylyk et al., 2009, 2012a; Trueck et al., 2012	/

## 2.1.10 Antikörper

### 2.1.10.1 Primäre Antikörper für Immunhistochemische Färbungen

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
$\alpha$ -Aktinin	Maus IgG1	1:400	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
$\alpha$ -smooth muscle-actin	Maus IgG1	1:400	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
CD31 / PECAM1	Ratte IgG <sub>2A</sub>	1:400	BD Biosciences (Heidelberg, D)
CD45 Ab-6	Ratte IgG	1:1000	Chemicon, Merck Millipore (Darmstadt, D)
Cleaved Caspase3	Kaninchen IgG	1:50	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, D)
GFP (1-16)	Ziege IgG	1:50	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Ki-67	Kaninchen IgG	1:400	Zur Verfügung gestellt von J. Gerdes Nr.24, 03.07.97 (Kiel, D)
Mac2 / CD11b	Ratte IgG	1:400	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching, D)
NCL-Ki-67p	Kaninchen IgG	1:100	Novocastra, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
PCM1	Kaninchen IgG	1:200	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, D)
PHH3 (ser10)	Kaninchen IgG	1:100	Cell Signaling Technology, New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, D)
TUNEL	<i>In Situ</i> , Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Version 17		Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Vimentin	Huhn IgG	1:800	Chemicon GmbH (Limburg, D)

**2.1.10.2 Sekundäre Antikörper für Immunhistochemische Färbungen**

Reaktivität	Fluorochrom	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Maus IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Maus IgG	Cy5	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ratte IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ratte IgG	Cy3	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ratte IgG	Cy5	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Kaninchen IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Kaninchen IgG	Cy5	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ziege IgG	Cy2	Esel	1:50	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)
Ziege IgG	Cy3	Esel	1:400	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England)

**2.1.11 Versuchstiere**

**2.1.11.1 Mausmodelle**

Alle primären Zellen wurden aus transgenen Mausmodellen gewonnen. Für die Isolierung eCM wurde die  $\alpha$ -Aktin-eGFP-Mauslinie verwendet, die sowohl auf CD1- als auch auf C57BL/6- Hintergrund zur Verfügung steht (Fleischmann et al., 1998). Diese transgene Mauslinie exprimiert das Reporter-gen eGFP unter dem  $\alpha$ -Aktin-Promotor. Hierbei ermöglicht der muskelspezifische Promotor die Expression von eGFP in CM, was eine Detektion der transplantierten Zellen im Nativgewebe von Empfängertieren ermöglicht. Zur Gewinnung von Knochenmarkzellen (BMC) wurde die Tg(ACTB-DsRed\*MST)1Nagy-Mauslinie auf CD1-Hintergrund verwendet, die von Vintersten et al., 2004 generiert wurde. Das rot fluoreszierende Protein (DsRed.T3) unter Kontrolle des CAG-Promotors erlaubt die Detektion

der BMC im Nativgewebe. Als Empfängertiere wurde der Auszuchtstamm CD1 Wild-Typ (CD1-WT) sowie die Inzuchtstämme C57BL/6 (Bl6) und 129S2/SvPasCrl (SV129) verwendet, die über Charles River (Sulzfeld, D) bezogen wurden. Für die Transplantationsversuche (siehe 2.3.2) wurden 10 Wochen alte CD1-WT Weibchen, 12 Wochen alte Bl6 Weibchen und 12 Wochen alte SV129 Männchen verwendet.

### **2.1.11.2 Superovulation von Mäusen**

Aufgrund der art eigenen geringen Anzahl von Embryonen wurden weibliche Bl6 Mäuse superovuliert, um eine Synchronisation des sexuellen Zyklus und eine Erhöhung der Zahl ovulierter Oozyten zu erreichen. Die Superovulation ermöglicht eine Verpaarung zu einem festgelegten Zeitpunkt und somit Gewinnung von Embryonen in einem definierten Entwicklungsstadium. Whittingham et al. erstellten 1972 das heute traditionell angewandte Schema zur Superovulation weiblicher In- und Auszuchtstämme, bei dem die Mäuse exogen mit den Gonadotropinen FSH (Follikelstimulierendes Hormon) zur Stimulation der Follikelreifung und hCG (humanes Choriongonadotropin) zur Ovulationsauslösung behandelt werden. Die Injektion des ersten Hormons FSH erfolgte intraperitoneal (i.p., 0,1 ml / Maus) vor Beginn der Dunkelphase. Das zweite Hormon hCG wurde 48 Stunden später ebenfalls i.p. (0,1 ml / Maus) injiziert und die Tiere direkt danach verpaart.

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Auftauen von Zellen**

Alle beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellkulturen wurden in einem Stickstofftank bei  $-155^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um das in Einfriermedium enthaltene Dimethylsulfoxid (DMSO) zügig verdünnen zu können, wurden die Gefrier Röhrchen im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  kurz angewärmt und die Zellsuspension in 5 ml 15 % DMEM überführt. Die Zellen wurden anschließend für 5 Minuten bei  $210 \times g$  zentrifugiert und der DMSO-haltige Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml 15 % DMEM resuspendiert und auf eine Zellkulturflasche gegeben, die mit proliferationsinhibierten murinen Fibroblasten beschichtet war ( $1,3 \times 10^6$  Fibroblasten pro  $25 \text{ cm}^2$  Zellkulturschale). Um eine Differenzierung der Zellen zu verhindern,

wurde zusätzlich 5 µl LIF pro Zellkulturflasche hinzugegeben. Ein Tag nach dem Auftauen erfolgte der erste Mediumwechsel (5 ml 15 % DMEM) sowie die Zugabe von G418-Sulfat / Neomycin (1 µl / ml Medium) zur Selektion stabil transfizierter ES-Zellen.

### 2.2.2 Passagieren von Zellen

Unter einer Passage (auch Zellsplitting und Subkultivierung genannt) versteht man das Aufteilen von Zellen in mehrere Aliquots und Überführen der Tochterzellen in neue Kulturgefäße. Bei regelmäßiger Passage können Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, da dieser Prozess die Alterung der Zellen verhindert, die nach einer längeren Zeit bei hoher Zelldichte einsetzt. Die ES-Zellen wurden alle drei Tage auf neue Fibroblastennährzellen umgesetzt, bei einer Konfluenz von 70 %, um eventuelle Differenzierungsprozesse verhindern zu können.

Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe des proteolytischen Agens Trypsin / EDTA vom Kultursubstrat gelöst. Zuvor musste das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen werden. Die Zellen wurden danach für 3 – 5 Minuten bei 37°C mit 1 ml 0,125 % Trypsin / EDTA inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 5 ml 15 % DMEM gestoppt, um den Schaden an der Zellmembran gering zu halten. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem 15 ml Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei 210 x g zentrifugiert. Der Trypsin-haltige Überstand wurde abgesaugt und 1 ml Medium zum Zellpellet hinzugegeben. Die Zellzahl konnte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer in einer von 1:10 Verdünnung bestimmt werden, wobei der Anteil der abgelösten Nährzellen (ca.  $1 \times 10^6$ ) berücksichtigt und abgezogen werden musste. Eine kleine Menge ( $0,2 \times 10^6$ ) der abgelösten ES-Zellen wurde in 5 ml 15 % DMEM resuspendiert und auf eine mit Nährzellen beschichtete 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät, während der Rest verworfen wurde. Wie zuvor beschrieben, wurde dem Medium LIF und G418 zugesetzt. Die Zellkulturflasche wurde im Inkubator bei 37°C und bei 5 % CO<sub>2</sub> sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert.

### 2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde unter Verwendung einer Thoma-Zählkammer lichtmikroskopisch quantifiziert. Hierzu wurden 2 x je 10 µl Zellen aus dem Stock entnommen und auf die Thoma-Zählkammer pipettiert. Die vorgezeichneten Quadrate

wurden nach Anleitung der Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert aus beiden Zählungen gebildet. Die Zellzahl pro Volumeneinheit (ml) errechnet sich durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor  $1 \times 10^4$ . Wurde zusätzlich ein Verdünnungsfaktor gewählt, musste dieser ebenfalls durch Multiplikation mit einberechnet werden.

#### **2.2.4 Kultivierung und Differenzierung von ES-Zellen**

Aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) können sich unter bestimmten Kulturbedingungen Aggregate von Zellen, die sogenannten *Embryoid Bodies* (Embryonalkörperchen, EBs) bilden. Die Zellaggregation zu EBs findet statt, wenn ES-Zellen ohne Kontakt zu einer Oberfläche, in ausreichender Zelldichte und ohne die differenzierungshemmende Substanz LIF kultiviert werden. Dabei nehmen die Aggregate runde Formen an und rekapitulieren in einem begrenzten Maße die embryonale Entwicklung, da sie Zelltypen aller drei Keimblätter enthalten (Smith, 2001). In dieser Arbeit wurden EBs aus differenzierten  $\alpha$ -PIG-Zellen ( $\alpha$ -MHC-Pur-IRES-eGFP) des murinen Klon  $\alpha$ -PIG44 generiert (siehe 2.2.4.3).

##### **2.2.4.1 Massenkultur**

Die Massenkultur zur Differenzierung von ES-Zellen begann wie eine Passage, d.h. die Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und ausgezählt. Eine 10 cm Zellkulturschale wurde mit 10 ml Differenzierungsmedium (20 % IMDM) vorbereitet und  $3 \times 10^6$  Zellen hineingegeben. Die Schale wurde daraufhin für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf einem Horizontalschüttler (75 – 85 rpm) im Inkubator geschüttelt. Nach zwei Tagen wurde die Massenkultur vom Schüttler genommen und die Zellaggregate auf 1000 EBs pro 10 cm Zellkulturschale verdünnt. Dazu wurden die Aggregate in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nach 3 - 6 Minuten waren die EBs sedimentiert, so dass der Überstand vorsichtig abgesaugt werden konnte. Zur Bestimmung der EB-Anzahl wurden 5  $\mu$ l von den sedimentierten EBs entnommen und die Anzahl in diesem Tropfen ausgezählt. Die errechnete EB-Anzahl wurde in 10 ml 20 % IMDM aufgenommen und in eine Zellkulturschale (100 - 200 EBs / Schale) überführt. Insgesamt konnten je nach Anzahl der EBs 2 bis 5 neue Schalen angelegt und wie zuvor beschrieben inkubiert werden. Alle 2 – 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Nach

6 – 7 Tagen ließen sich die ersten schlagenden Areale in den EBs detektieren. Bei Verwendung des  $\alpha$ -PIG-Klons wurde nach 9 – 10 Tagen mit der Aufreinigung der CM durch Zugabe von Puromycin (2  $\mu$ l / ml Medium) begonnen. Alle zwei Tage wurde das Medium mit den sich darin befindenden apoptotischen Zellen gewechselt, damit eine ausreichende Nährstoffversorgung gewährleistet werden konnte.

### **2.2.4.2 Hängende Tropfen**

Die Methode der Hängenden Tropfen zur Differenzierung von ES-Zellen wurde von Wobus et al., 1991 etabliert. Hierbei differenzieren ES-Zellen unter Ausnutzung der Schwerkraft in einer definierten Anzahl. Das Protokoll der Hängenden Tropfen begann wie eine Passage. Nach Ablösen der Stammzellen wurden  $0,2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml 20 % IMDM überführt, so dass in einem Tropfen ca. 400 Zellen enthalten sind. Mit einer Multi-Step-Pipette wurden 20  $\mu$ l-Tropfen in den Deckel einer 10 cm Zellkulturschale pipettiert. Anschließend wurden 5 ml PBS in den Boden der Zellkulturschale gegeben, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Der Deckel wurde vorsichtig auf den Boden aufgesetzt, so dass sich die Zellen in der Spitze des Tropfens sammeln und zu EBs aggregieren konnten. Aus 10 ml Zellsuspension konnten 4 - 5 Zellkulturschalen angesetzt werden. Die Inkubationszeit (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) betrug 2 Tage im Brutschrank. Hiernach wurden die entstandenen EBs mit 5 ml 20 % IMDM pro Schale abgespült, wobei zwei Schalen Hängende Tropfen in einer 10 cm Zellkulturschale gesammelt wurden. Die EBs konnten nun unter Medienwechsel für ca. 3 – 7 Tage auf einem Horizontalschüttler im Inkubator weiterwachsen, ähnlich wie bei der Massenkultur. Nach der Inkubationszeit erfolgte an Tag 7 das Ausplattieren der EBs auf 24-Well-Platten, die mit runden 12 mm Deckgläsern bestückt und mit 0,1 % Gelatine oder 0,1 % Fibronectin beschichtet wurden. Jedes Well wurde mit 0,5 ml 20 % IMDM überschichtet und jeweils 2 - 4 EBs möglichst mittig auf die Glasplättchen platziert und zum Anwachsen in den Inkubator gestellt.

### **2.2.4.3 Differenzierung von $\alpha$ -PIG-Zellen zu ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten**

Zur Differenzierung von  $\alpha$ -PIG-Zellen ( $\alpha$ -MHC-Pur-IRES-eGFP) wurde der murine Klon  $\alpha$ -PIG44 verwendet, welcher das Puromycin-Resistenzgen sowie eGFP unter Kontrolle des



herzspezifischen Promotors  $\alpha$ -MHC exprimiert (Kolossoff et al., 2006). Nach Ablösen der ES-Zellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 10 ml 20 % IMDM in eine 10 cm Zellkulturschale pipettiert und auf den Horizontalschüttler im Inkubator gestellt. Nach zwei Tagen wurden zwei 500 ml Spinnerflaschen mit jeweils 200 ml 20 % IMDM gefüllt und die sich gebildeten EBs (Embryonalkörperchen, siehe 2.2.4) in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nachdem die EBs auf den Boden abgesunken waren, wurde der Überstand bis auf 2 ml entfernt und nach dem Resuspendieren jeweils 1 ml der EB-Suspension in eine Spinnerflasche überführt. Die Flaschen wurden auf ein Magnetrührsystem im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gestellt. An Tag 7 wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem nach absiedeln der EBs am Flaschenboden 70 ml altes Medium gegen 70 ml neues 20 % IMDM ausgetauscht wurde. Sofern die EBs eine eGFP-Fluoreszenz aufwiesen, konnte mit der Puromycin- Aufreinigung an Tag 9 begonnen werden. Hierzu wurden 400  $\mu$ l Puromycin pro Flasche (2  $\mu$ l / ml) zugefügt. Drei Tage nach der Puromycin-Zugabe erfolgte die EB-Dissoziation (siehe 2.2.4.4).

#### **2.2.4.4 Einzelzelldissoziation von EBs**

Zur Gewinnung von ES-CM mussten die EB-Aggregate wieder vereinzelt (dissoziiert) werden. Hierzu wurde der Überstand bis auf 25 ml aus den Spinnerflaschen abgesaugt und die EBs in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Jede Flasche wurde anschließend mit 10 ml PBS ausgewaschen, um die restlichen EBs aufnehmen zu können. Nach zwei Waschschritten mit jeweils 10 ml PBS wurden die EBs zentrifugiert (210 x g, 5 Minuten) und das PBS entfernt. Dem EB-Pellet wurden 4 ml Trypsin / EDTA (2 ml / Flasche) zugefügt und das Reaktionsgefäß für 3 – 5 Minuten auf einen Schüttler (600 rpm) bei 37°C gestellt. Die Reaktion wurde nach Trübung der Suspension mit 5 ml 20 % IMDM abgestoppt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml 20 % IMDM resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Je nach Experiment wurden unterschiedliche Zellzahlen auf mit 0,1 % Fibronectin beschichtete 24- bzw. 6-Well-Zellkulturschalen ausgesät. Für Toxizitäts-Analysen wurden  $0,25 \times 10^5$  Zellen pro 24-Well ausgesät, für intramyokardiale Zellinjektionen  $1 \times 10^6$  Zellen pro 6-Well. Zur weiteren Selektion erfolgte nach dem Ausplattieren eine Zugabe von 2  $\mu$ l Puromycin / ml Medium.

## **2.2.5 Gewinnung und Kultivierung von Primärzellen**

### **2.2.5.1 Präparation embryonaler Kardiomyozyten (eCM)**

Der optimale Zeitpunkt zur Isolierung embryonaler Kardiomyozyten (eCM) sind die Schwangerschaftstage E 13.5 -15.5 nach Verpaarung von CD1-WT oder C57BL/6 Weibchen mit  $\alpha$ -Aktin-eGFP Männchen. Die schwangeren Muttertiere wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und die Bauchdecke mit 70 % Ethanol desinfiziert. Nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden wurden die Tiere auf dem Rücken liegend mit Kanülen auf einer Styropor-Unterlage fixiert und die Abdominalhöhle mittels einer medianen Laparotomie eröffnet. Mit einer Pinzette wurde das distale Ende des Uterushorns gefasst, mitsamt der eingelagerten Embryonen aus der Bauchhöhle entfernt und in eisgekühlter PBS-Lösung gelagert. Unter der Stereolupe wurden die Embryonen von der Plazenta und der Fruchtblase getrennt. Aufgrund der Verpaarung mit heterozygoten Männchen sind nach dem Vererbungsschema nach Mendel nur etwa 50 % der Nachkommen eGFP<sup>+</sup>. Um diese identifizieren zu können, wurden alle Embryonen unter einer Stereolupe mit integrierter Fluoreszenzlampe abgeleuchtet und nach nativen und eGFP<sup>+</sup>-Embryonen sortiert. Für die intramyokardiale Injektion wurden nur die eGFP<sup>+</sup>-Herzen verwendet. Die nativen Herzen konnten für Toxizitäts-Analysen, elektrophysiologische Untersuchungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen *in vitro* herangezogen werden. Zur Isolierung der Herzen wurde der Kopf der Embryonen mit einer Schere vom Rumpf entfernt und der Thorax mit Hilfe von zwei Pinzetten eröffnet. Aufgrund des frühen Entwicklungsstadiums der Embryonen war dieser Vorgang leichtgängig und das Herz, umgeben von dem Lungenpaket, frei zugänglich. Das Herz wurde unter Verwendung einer feinen Pinzette an der Basis gefasst und aus dem Thorax entnommen. Alle Herzen wurden in einer kleinen Schale, gefüllt mit eisgekühltem PBS, gesammelt.

### **2.2.5.2 Dissoziation von eCM**

Jeweils 8 – 10 Herzen der zuvor isolierten Herzen wurden in ein Reaktionsgefäß, das mit einer Kollagenase B-Lösung (1 mg / ml) gefüllt war, überführt. Mit Hilfe einer feinen Federschere wurden die Herzen im Gefäß zerkleinert und auf einem Schüttler (400 rpm) bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Herzen vorsichtig durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren zusätzlich resuspendiert. Anschließend erfolgte die

Zentrifugierung der Suspension bei 1000 rpm für 4 Minuten und die Entfernung der Kollagenase B-Lösung. Jeweils 600 µl KB-Lösung wurden hiernach in die Reaktionsgefäße pipettiert und diese für 25 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in einem Becherglas mittels eines Rührfisches bewegt. Danach wurde die Suspension erneut resuspendiert, so dass die embryonalen Herzen als Einzelzellen vorlagen. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde die KB-Lösung entfernt und alle Zellen in einem 15 ml Röhrchen, gefüllt mit 20 % IMDM, vereint. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zwei Proben (jeweils 10 µl) entnommen und die restlichen Zellen erneut zentrifugiert. Die so erhaltenen CM und Fibroblasten konnten nun kultiviert werden. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen auf eine mit Kollagen vorbeschichtete 3,5 cm Schale plattiert. Jeweils 2 ml 20 % IMDM wurden auf eine Schale gegeben und die Zellen bei 37°C für mindestens 6 Stunden inkubiert, damit sie adhären auf der Kollagenbeschichtung anwachsen konnten.

### 2.2.5.3 Virustransduktion von eCM

Für die *in vivo* Detektion der intramyokardial injizierten Zellen, wurden eCM mit einem Luciferase-Virus vor der Injektion transduziert. Durch die Transduktion exprimieren die Zellen das Enzym Luciferase, welches infolge der Verwendung eines konstitutiven Promotors permanent in den Zellen exprimiert wird. Die Funktion der Luciferase besteht darin, die Oxidation des Substrates D-Luciferin zu katalysieren. Dabei wird ein Biolumineszenz-Signal freigesetzt, wodurch auf die Zellzahl zurückgeschlossen werden kann. Vor der *in vivo*-Anwendung wurde jedoch in einer *in vitro*-Zellkontrolle die Transduktionseffizienz des LVs rrl-CMV-veffLuc überprüft. Hierzu wurden jeweils  $3 \times 10^4$  eCM in einer 24-Well Platte ausgesät und mit dem Luciferase-Virus rrl-CMV-veffLuc ( $3 \times 10^4$  Zellen  $\approx$  2,79 ng RT) transduziert. 48 Stunden nach der Transduktion wurde die Biolumineszenz im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (eCM ohne Transduktion) detektiert.

Bei der intramyokardialen Zellinjektion erfolgte zunächst 16 Stunden vor der Virus-Transduktion die MNP-Beladung der Zellen mit SO-Mag5 (200 pg Fe / Zelle) über Nacht. Dabei wurde die errechnete Gesamt-MNP-Menge so aufgeteilt, dass die Haupt-Eisenmenge (ca. 70 %) zur Magnetisierung der Zellen diente und mit den restlichen 30 % sich die Zellen am darauffolgenden Tag transduzieren ließen. Die Zellen wurden mit dem Luciferase-Virus (rrl-CMV-veffLuc,  $1 \times 10^6$  Zellen  $\approx$  93 ng RT) transduziert. Zunächst wurde

der Virus zusammen mit SO-Mag5 für 30 Minuten in 600  $\mu$ l HBSS<sup>++</sup> bei RT inkubiert, damit eine Komplexbildung beider Komponenten erfolgen konnte. Im Anschluss wurden die MNP-Virus-Komplexe auf die eCM ( $1 \times 10^6$  Zellen pro 35 mm Kollagenschale) in 1 ml 20 % IMDM pipettiert und eine Magnetplatte unter die Zellkulturschale für 30 Minuten im Inkubator bei 37°C gestellt. Hiernach wurden die überschüssigen LVs durch mehrmaliges Waschen mit PBS von der Platte entfernt und durch frisches Medium (20 % IMDM) ersetzt. Dann erfolgte die Vorbereitung der Zellen für die intramyokardiale Injektion.

### **2.2.5.4 Isolierung und Kultivierung von Knochenmarkzellen**

Zur Gewinnung von BMC wurden 12 – 14 Wochen alte weibliche  $\beta$ -Aktin-DS-Red Mäuse verwendet. Nach zervikaler Dislokation wurden die Mäuse mit 70 % Ethanol eingesprüht und die Ober- und Unterschenkelknochen der Hinterbeine frei präpariert und gründlich von anhängendem Fett- und Muskelgewebe gereinigt. Danach wurden die Ober- und Unterschenkelknochen mit 70 % Ethanol abgerieben und in eine mit eisgekühltem PBS gefüllte 10 cm Schale überführt. Unter einer Sterilbank konnten nun Ober- und Unterschenkelknochen voneinander getrennt und an jeweils beiden Enden mittels einer groben, sterilen Schere eröffnet werden. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer 27G Kanüle unter Verwendung von insgesamt 40 – 50 ml auf Eis gekühltem PBS aus den Ober- und Unterschenkelknochen herausgespült. Dabei konnten die Zellen durch mehrfaches Einsaugen in die Spritze und anschließendem Ausspülen vereinzelt und zur Entfernung größerer Zellaggregate und Knochensplitter durch einen Nylonfilter (40  $\mu$ m) in ein 50 ml Falcon pipettiert werden. Anschließend wurden die BMC für 5 Minuten bei 300 rpm abzentrifugiert, um anschließend das PBS absaugen zu können. Die Zellen wurden daraufhin in 10 % RPMI überführt. Die Zellzahl wurde wie unter 2.2.3 beschrieben ausgezählt. Es konnten bis zu  $3 \times 10^7$  Zellen aus beiden Hinterbeinen generiert werden. Jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen wurden auf eine mit 10 % RPMI gefüllte 6-Well-Platte (2 ml / Well) pipettiert und die Zellen in Suspension bei 37°C inkubiert.

### **2.2.6 Beladung der Zellen mit MNP**

Bei der Beladung der drei verwendeten Zelltypen wurde SO-Mag5 (Mykhaylyk et al., 2012b) als Partikel der Wahl eingesetzt. Dabei wurden die drei verwendeten Zelltypen BMC, eCM

und ES-CM mit einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle beladen. Die für jede Zellzahl berechnete SO-Mag5-Menge wurde ca. 6 Stunden nach Aussäen der Zellen in das jeweilige Medium pipettiert. Durch vorsichtiges Schwenken konnten die MNP möglichst gleichmäßig auf die adhärent vorliegenden eCM und ES-Cs und die sich in Suspension befindenden BMC verteilt werden. Die SO-Mag5-Partikel sanken bedingt durch die Schwerkraft im Medium ab und konnten aufgrund ihrer geringen Größe leicht von den Zellen aufgenommen werden. Die SO-Mag5-Aufnahme erfolgte über Nacht oder mittels Magnetplatte (im 24-Well Design), die unter die Zellkulturschale für 30 Minuten gestellt wurde.

### **2.2.7 Vorbereitung der ES- und Primärzellen für eine intramyokardiale Injektion**

Alle verwendeten Zellen wurden ca. 12 Stunden nach der SO-Mag5-Beladung für die intramyokardiale Injektion vorbereitet. Bei eCM und ES-CM wurde hierzu das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen mit 2 – 3 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 2 ml Kollagenase Typ II (560 U / Schale) auf jedes Well pipettiert und die Zellen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach in 20 % IMDM überführt, um die Wirkung der Kollagenase durch das enthaltene fötale Kälberserum zu inaktivieren. Durch mehrmaliges Pipettieren und Abspülen von der Zellkulturplatte konnten die Zellen abgelöst und in ein 15 ml Falcon überführt werden. Die Zellen wurden mittels Thoma-Zählkammer (siehe 2.2.3) ausgezählt. Hierzu wurden dem Zellstock 10 µl Zellsuspension entnommen. Die restliche Suspension wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Als Suspensionszellen mussten die BMC lediglich in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert werden.

Für die intramyokardiale Injektion wurden alle drei Zelltypen in einer Konzentration von  $40 \times 10^4$  -  $50 \times 10^4$  Zellen / µl in 20 % IMDM in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zusätzlich wurde der Zellsuspension blaue Lebensmittelfarbe in einer Konzentration von 0,8 µg / µl zugesetzt, um bei der intramyokardialen Injektion eine optische Kontrolle zu haben. Die Lagerung der Zellen erfolgte bis zur intramyokardialen Injektion auf Eis. Alle postoperativ verbliebenden kardialen Zellen wurden erneut auf eine mit Glasplättchen (22 x 22 mm) ausgelegte und mit 0,1 % Fibronectin (10 mg / ml) beschichtete 24-Well Zellkulturschale ausplattiert, um die Zellvitalität und Kontraktionskraft makroskopisch am Folgetag beurteilen zu können. Zu Dokumentationszwecken wurden mikroskopische

Aufnahmen durchgeführt und die Zellen anschließend verworfen oder für immunhistochemische Analysen mit 4 % Paraformaldehyd fixiert.

### 2.2.8 Bestimmung der Eisenaufnahme und der Magnetisierungseffizienz von SO-Mag5-beladenen Zellen

#### 2.2.8.1 Der Magnetständer

Für die konzentrationsabhängige Bestimmung der SO-Mag5-Aufnahme von Zellen wurde ein Magnetständer (Abb. 7) verwendet. Hierzu wurden eCM und ES-CM (je  $1 \times 10^5$  Zellen) und BMC (je  $5 \times 10^5$  Zellen) mit 20 und 200 pg SO-Mag5 / Zelle über Nacht beladen (siehe 2.2.6). Am Folgetag wurden die Zellen abgelöst und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, die mit jeweils 1 ml 20 % IMDM bzw. 10 % RPMI gefüllt waren. Danach wurden die Reaktionsgefäße für 2 Minuten in den Magnetständer gestellt und die Zellsuspension den Magnetfeldern homogener Quadermagneten ausgesetzt. Der Überstand wurde entfernt und die Zellzahl der durch das Magnetfeld angezogenen Zellen bestimmt.



**Abbildung 7: Der Magnetständer**

Kunststoffständer für 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße, ausgekleidet mit homogenen Quadermagneten zur Bestimmung des magnetischen Moments der SO-Mag5-beladenen Zellen.

#### 2.2.8.2 MPS-Messung von SO-Mag5-beladenen Zellen *in vitro*

Um überprüfen zu können, ob die eingesetzte Eisenmenge mit dem Magnetisierungsgrad der Zellen korreliert, wurde im Vergleich zum Magnetständer (2.2.8.1), die wesentlich sensitivere MPS-Messmethode (*magnetic particle spectroscopy*) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Trahms (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin) eingesetzt. Es wurden die gleichen Zell- und SO-Mag5-Konzentrationen wie unter 2.2.8.1 beschrieben verwendet und die MNP-beladenen Zellen im Magnetständer von den unbeladenen Zellen separiert. Nach der Anziehung durch das Magnetfeld wurden die Zellen mit 4 % PFA für 20 Minuten fixiert, zentrifugiert ( $210 \times g$ , 5 Minuten) und jeweils in mit 3 % Gelatine gefüllte

0,5 ml-PCR-Gefäße eingebettet. Hiernach wurden die MNP-beladenen Zellen zur MPS-Messung nach Berlin versendet.

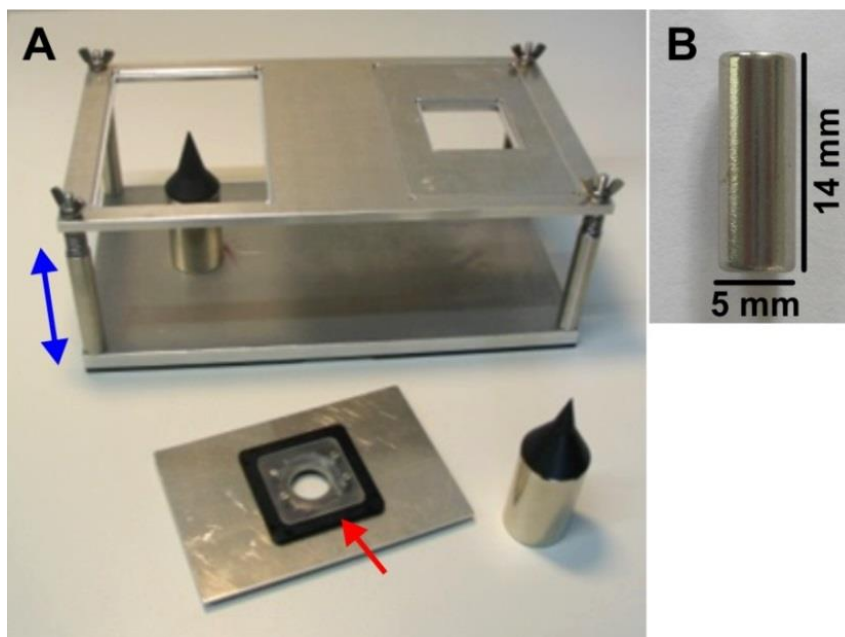
### **2.2.8.3 MPS-Messung zur Bestimmung des Anteils von SO-Mag5-Partikel / SO-Mag5-beladenen Zellen in verschiedenen Organen der Maus**

Mit Hilfe der MPS-Messmethode wurde in einem ersten Experiment die Verteilung der intramyokardial injizierten SO-Mag5-Partikel / SO-Mag5-beladenen eCM bzw. ES-CM an Tag 14 und 56 in verschiedenen Organen der Maus bestimmt (siehe 2.2.8.2). Hierzu wurden SO-Mag5-Partikel sowie SO-Mag5-beladene eCM / ES-CM, jeweils in 5 µl 20 % IMDM gelöst, in kryoinfarzierte Mauserzen (CD1-WT) wie unter 2.3.2 beschrieben injiziert. Die Injektion wurde jeweils mit (10 Minuten) und ohne Magnetfeld-Applikation durchgeführt. Die MNP-Konzentration betrug bei einer isolierten SO-Mag5-Injektion 2 µg SO-Mag5-Partikel / Maus und orientierte sich dabei an den Ergebnissen der zuvor durchgeführten MPS-Messung zur Bestimmung der SO-Mag5-Aufnahme von eCM *in vitro* (2.2.8.2). Nach 14 und 56 Tagen wurde neben dem Herzen (linker Ventrikel = Injektionsstelle; rechter Ventrikel = unbehandelte Kontrolle), die Lunge, die Leber, die Nieren und die Milz entnommen. Alle Organe wurden für 24 Stunden in 4 % PFA fixiert und in speziell für die MPS-Messung geeignete 0,5 ml-PCR-Gefäße überführt. Aufgrund der relativ geringen Größe der Messgefäße mussten die Organe zerschnitten und auf mehrere PCR-Gefäße verteilt werden. Die Einzel-Messwerte wurden bei der Auswertung wieder zu einem Wert aufsummiert. Als Kontrollgruppe dienten Organe von unbehandelten CD1-WT-Mäusen.

In einem zweiten Experiment wurde mit Hilfe der MPS-Messmethode der mechanische Effekt einer Magnet-basierten Zellinjektion untersucht. Hierzu wurde vor der Zellinjektion ein kleines Stück Zellstoff unter dem Herzen positioniert, um die während der Injektion verloren gegangenen MNP-beladenen Zellen auffangen zu können. Die Injektion der SO-Mag5-beladenen eCM erfolgte mit und ohne Magnetfeld-Applikation wie unter 2.3.2 beschrieben. 10 Minuten nach der Zellinjektion erfolgten die Exzision des Herzens sowie die Zellstoffentnahme. Die Proben wurden in jeweils 0,5 ml-PCR-Gefäße überführt und an die Arbeitsgruppe Trahms (2.2.8.3) zur MPS-Messung geschickt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der SO-Mag5-Partikel von der Ausgangsmenge bestimmt.

### 2.2.9 Lokale Positionierung von SO-Mag5-beladenen Zellen *in vitro*

Zur lokalen Positionierung von MNP-beladenen Zellen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, IMETUM, Technische Universität München) spezifische Permanentmagnete mit verschiedenen Eisenspitzen konstruiert (Kilgus et al., 2012). Um die Zellverteilung in Abhängigkeit vom magnetischen Feld bestimmen zu können, wurden BMC wie unter 2.2.5.4 beschrieben isoliert und mit SO-Mag5-Partikel (200 pg Fe / Zelle) über Nacht beladen. Die MNP-beladenen Zellen ( $1,5 \times 10^6$  Zellen / ml) wurden in je 1 ml HBSS<sup>++</sup> in eine 3 cm Zellkulturschale mit Folienboden überführt und ein 1,3 Tesla Stabmagnet ( $\varnothing$ : 5 mm; Abb. 8 B) direkt (ca. 200  $\mu$ m) oder in 5 mm Abstand zentral unter der Schale positioniert. Der gesamte Aufbau (Abb. 8 A) wurde auf einem Horizontalschüttler für 16 Minuten bei 100 Zyklen / min geschüttelt, wobei die Zellkulturschale alle 4 Minuten um 45° gedreht wurde. Die qualitative und quantitative Analyse der Zellverteilung erfolgte anhand von Hellfeldaufnahmen mittels des Axiovert 200 M Mikroskops und der Software WCIF ImageJ wie bei Kilgus et al., 2012 beschrieben.



**Abbildung 8: Darstellung des Aufbaus für eine *in vitro* Zell-Positionierung**

(A) Speziell designter Aufbau mit zwei Einsätzen für jeweils eine 3 cm Zellkulturschale mit Folienboden (roter Pfeil). Die gesamte Apparatur ist in der Vertikalebene höhenverstellbar (blauer Pfeil), um eine optimale Ausrichtung des Magneten unter die Zellkulturschale ermöglichen zu können. (B) Darstellung des 1,3 Tesla Stabmagneten ( $\varnothing$ : 5 mm).



### **2.2.10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SO-Mag5-beladenen eCM**

Zur Untersuchung der MNP-Lokalisation innerhalb der Zellen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. W. Bloch (Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln) Elektronenmikroskopische (EM) Untersuchungen von SO-Mag5-beladenen eCM *in vitro* durchgeführt (Bloch et al., 2000). Für die *in vitro*-Analysen wurden eCM wie unter 2.2.5.1 beschrieben gewonnen und auf mit 0,1 % Fibronectin beschichtete Aclar-Folien im 24-Well ausplattiert wurden. Hiernach erfolgte die SO-Mag5-Beladung über Nacht bei 200 pg Fe / Zelle. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 4 % PFA für 20 Minuten fixiert und in PBS bei 4°C bis zur EM-Aufnahme gelagert.

### **2.2.11 Elektrophysiologische Charakterisierung von SO-Mag5-beladenen eCM**

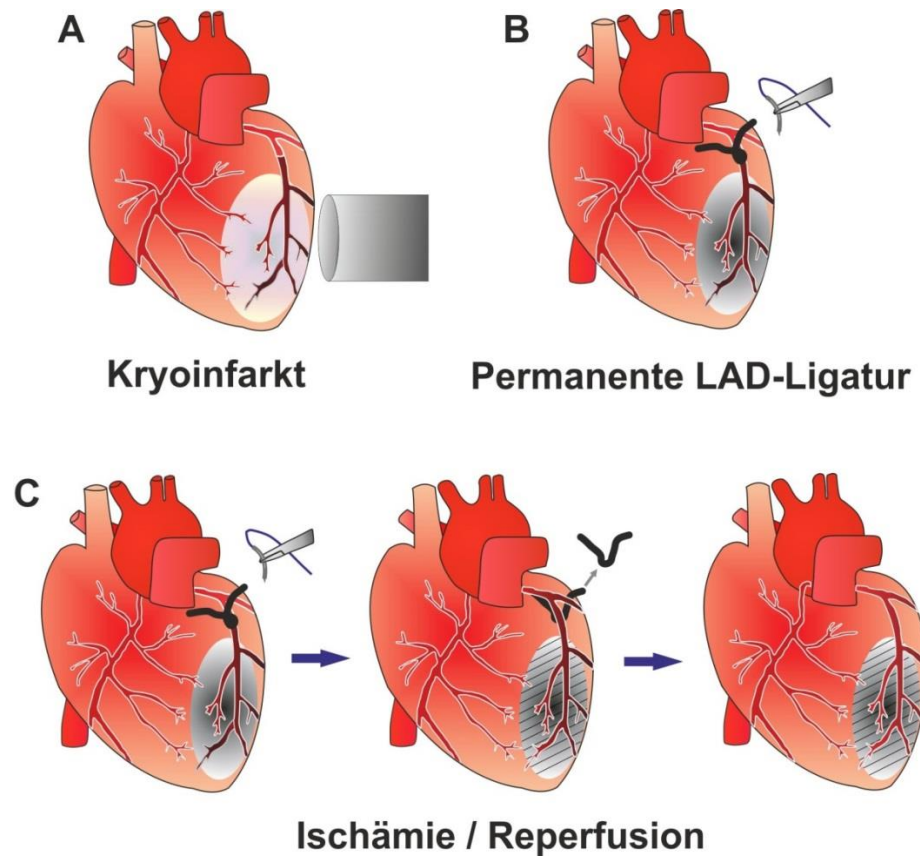
Mit der Patch-Clamp-Technik als elektrophysiologische Messmethode lassen sich Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle in der Membran einer Zelle darstellen. Um die Auswirkungen einer MNP-Beladung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von eCM zu untersuchen, wurden Patch-Clamp-Analysen von unbeladenen (nativen) und SO-Mag5-beladenen eCM in Kooperation mit Dr. Tobias Brüggemann (Arbeitsgruppe Sasse, Institut für Physiologie I, Universität Bonn) durchgeführt. Hierzu wurden eCM wie unter 2.2.5.1 beschrieben gewonnen und auf eine 24-Well-Platte, die mit 0,1 % Fibronectin beschichteten Deckgläschen (12 x 12 mm) ausgelegt war, überführt. Es wurden jeweils  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  und  $2 \times 10^4$  Zellen ausgesät und die Hälfte der Zellpräparate mit SO-Mag5-Partikeln über Nacht (siehe 2.2.6) beladen. Um sicherzustellen, dass nur SO-Mag5-beladene eCM gepatcht werden, wurden die eCM 12 Stunden nach der SO-Mag5-Beladung mit Trypsin / EDTA (1 - 3 min) von den Deckgläschen abgelöst und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße, gefüllt mit je 1 ml 20 % IMDM, überführt. Hiernach wurden die Reaktionsgefäße für 1 Minute in einen Magnetständer (siehe 2.2.8.1) gestellt, um so die beladenen von den unbeladenen Zellen trennen zu können. Nach Entfernung des Überstandes konnten die SO-Mag5-beladene eCM erneut auf mit 0,1 % Fibronectin beschichtete Deckgläschen (12 x 12 mm) ausplattiert werden. Bei den unbeladenen eCM wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Patch-Clamp-Analysen wurden nach weiteren 24 Stunden, wie bei Brüggemann et al., 2010 beschrieben, durchgeführt.

## 2.3 Operative Techniken

### 2.3.1 Myokardiale Infarktmodelle

#### 2.3.1.1 Kryoinfarkt, LAD-Ligation, Ischämie / Reperfusion

Zur Generierung eines murinen MIs sind innerhalb der Arbeitsgruppe derzeit drei verschiedene Infarktmodelle etabliert. Eine Gewebenekrose wird mittels lokaler Kälteapplikation erzeugt (Kryoinfarkt, KI). Ischämische Läsionen werden mittels permanenter oder passagerer Koronarokklusion generiert (vgl. Abb. 9). Bei einem KI wird durch Aufsetzen einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Kupfersonde die freie linksventrikuläre Herzwand lokal geschädigt, so dass konsekutiv ein transmurales Narbenareal entsteht. Der große Vorteil hierbei liegt in einer gut reproduzierbaren Größe und Lokalität des MIs (van den Bos et al., 2005) und einer daraus resultierenden geringen intra- und postoperativen Mortalität. Allerdings entspricht der KI nicht der klassischen Infarktphysiologie. Hier liegt der große Vorteil von Ischämie-Reperfu-sions-Modellen, da sie physiologisch gesehen mit MI, wie sie beim Menschen vorkommen, vergleichbar sind. Bei der permanenten LAD-Ligatur wird durch eine Okklusion des Hauptversorgungsgefäß des linken Ventrikels, des sogenannten *Ramus interventricularis anterior* (RIVA, engl.: *left anterior descending coronary artery*, LAD) der *Arteria Coronaria Sinistra*, eine akute Ischämie in der Vorderseitenwand der linken Herzkammer generiert. Die Infarktgröße kann jedoch individuell verschieden sein, da die Ausdehnung und Transmuralität der Ischämie von der Koronaranatomie sowie der Kollateralisation abhängt. Dadurch ist bei diesem Läsionsverfahren im Vergleich zur Kryoläsion eine höhere peri- und postoperative Mortalität der Tiere zu beobachten (Kanno et al., 2002; Zolotareva and Kogan, 1978). Bei der temporären LAD-Ligatur (Ischämie / Reperfusion) wird die LAD nur für einen gewissen Zeitraum (in der vorliegenden Arbeit eine Stunde) okkludiert (Ischämie) und danach wieder eröffnet (Reperfusion). Die Minderdurchblutung führt zur Ischämie des linken Ventrikels. Mit diesem Infarktmodell lässt sich so die Reperfusion des Gewebes nach einem Infarkt und die damit verbundene Apoptose von Herzmuskelzellen darstellen und zu verschiedenen Zeitpunkten untersuchen. Aber auch hier zeigt sich eine deutliche Varianz der Infarktausdehnung und erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zu einem KI.



**Abbildung 9: Myokardiale Infarktmodelle**

Ein MI kann durch drei verschiedene Verfahren im Mausmodell generiert werden. (A) Bei einem KI wird eine in flüssigem Stickstoff gekühlte Kupfersonde dreimal hintereinander für jeweils 15 s lateral auf den linken Ventrikel apexnah aufgesetzt. (B) Bei einer permanenten LAD-Ligatur wird die LAD durch Unterbindung mit einem Faden dauerhaft okkludiert. (C) Bei einer Ischämie / Reperfusion erfolgt auch wie bei der LAD-Ligatur eine Okklusion der LAD, jedoch ist diese auf eine bestimmte Zeit (hier 1 Stunde) festgesetzt. Danach wird der Faden entfernt und die LAD reperfundiert.

### 2.3.1.2 Operatives Vorgehen

Zur Einleitung der Inhalationsnarkose wurden die Mäuse in eine Einleitungsbox gesetzt, die mit einem Narkose-Gasgemisch bestehend aus 0,6 l / min Sauerstoff, 0,4 l / min Lachgas ( $N_2O$ ) und 4 Vol % Isofluran befüllt wurde. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Tiere aus der Einleitungsbox entnommen und endotracheal intubiert. Als Tubus diente eine weiche 27 G Venenverweilkanüle, die an ein Beatmungsgerät (Typ Minivent) angeschlossen wurde. Die Beatmungsfrequenz betrug 150 - 180 Züge pro Minute bei einem Atemzugvolumen von 200 – 300  $\mu$ l. Intraoperativ wurde die Isoflurankonzentration auf 1.0 - 2.0 Vol % reduziert und die  $N_2O$ -Gabe nach Eröffnung des Thorax beendet. Alle Operationen wurden auf einer 20 x 30 cm großen Wärmeplatte (37°C) unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Die Mäuse wurden auf dem Rücken liegend fixiert und mit

70 % Ethanol desinfiziert. Dann erfolgte auf der linken Seite des Thorax die Haarentfernung unter Verwendung eines Einmalrasierers. Nach erneuter Desinfizierung wurde eine anterolaterale Thorakotomie durchgeführt, indem ein 1.5 cm langer Hautschnitt am Übergang vom mittleren zum distalen Thoraxdrittel durchgeführt und beide darunter liegenden Brustmuskelschichten mit einer Schere durchtrennt wurden. Die linke Thoraxhöhle wurde im drittletzten Interkostalraum (ICR) ohne Verletzung der *Arteria thoracica interna* eröffnet und mit einem kleinen Rippenspreizer so geweitet, dass ein direkter Zugang zum linken Ventrikel möglich war. Das Perikard konnte nun mit einer stumpfen Pinzette angehoben und längs inzidiert werden. Zur Induktion eines KIs wurde, wie unter 2.3.1.1 bereits beschrieben, eine in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Kupfersonde (ca. -196°C) mit einem Durchmesser von 3.5 mm dreimal hintereinander für jeweils 15 s auf die freie Wand des linken Ventrikel apexnah gesetzt. Das gefrorene Myokard ließ sich leicht durch eine farblich Veränderungen vom nativen Gewebe identifizieren (Abb. 9 A; 10 C). Bei permanenter Koronarokklusion wurde die LAD im Bereich distal des linken Atriums dargestellt und mit einem 8/0 Prolene Faden unterstochen und ligiert. Augenblicklich nach Okklusion der LAD konnte das ischämische Areal distal der Koronarligatur anhand der Blässe des Gewebes sowie der bald einsetzenden Hypokontraktilität identifiziert werden. Bei Ischämie / Reperfusion-Versuchen wurde ein kleines 2 mm langes Röhrchen auf den 8/0 Prolene geschoben und durch Zug die LAD für eine Stunde okkludiert. Danach wurde das Röhrchen samt Faden entfernt, um eine Reperfusion zu ermöglichen. Auch hier konnte eine leichte Myokardblässe distal der Ligatur festgestellt werden.

Wie unter 2.3.2 beschrieben, erfolgte nach erfolgreicher Infarktinduktion die intraoperative Zellinjektion mit und ohne Applikation eines Magnetfeldes. Bei Kontrolltieren wurde 20 %-iges Medium injiziert. Nach der Zellinjektion wurde der Thorax mit einer fortlaufenden Naht (6/0 Prolene) in drei Schichten geschlossen. Zunächst wurden nach Einlage einer Thoraxdrainage (Venenverweilkanüle 27G) die Rippen readaptiert. Danach wurden die oberflächlichen und tiefen Brustmuskelschichten sowie die Haut luftdicht durch eine fortlaufende Naht verschlossen und Sog an der Thoraxdrainage angelegt. Schon während der letzten Nahtreihe wurde die Isofluran-Konzentration reduziert und die Tiere anschließend mit reinem Sauerstoff versorgt. Die so bis zur Narkoseausleitung beatmeten Tiere wurden peri- und postoperativ durch subkutane Injektion von 100 mg / kg Cefuroxim und 100 mg / kg Metamizol (Novaminsulfon) zusätzlich antibiotisch und analgetisch versorgt. Nach Einsetzen der Spontanatmung konnten die Tiere extubiert werden. Zeitgleich wurde

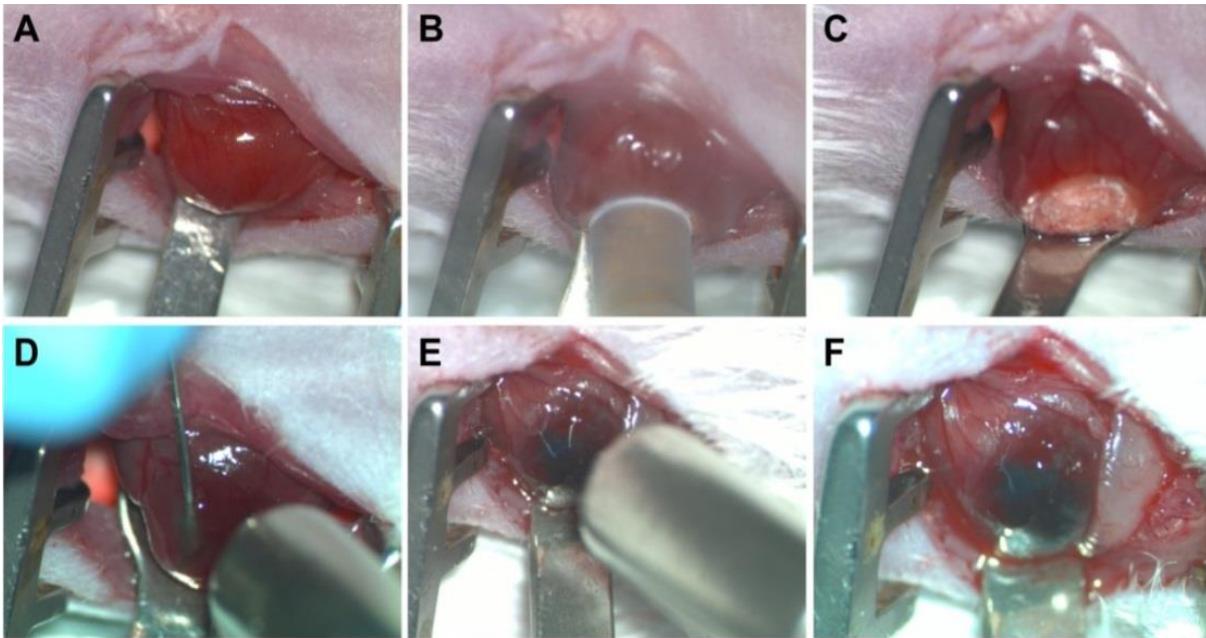
die Thoraxdrainage luftdicht entfernt und die Tiere unter einer Wärmelampe in einem Käfig überwacht. Nach einer ausreichenden Nachbeobachtungszeit wurden die Tiere zurück in den Tierstall gebracht.

### **2.3.2 Intraomyokardiale Zellinjektion mit und ohne Magnetfeld-Applikation**

Die geringe Größe des murinen Herzens (Längsdurchmesser ca. 1 cm, Wanddicke des linken Ventrikelmyokards ca. 1 mm) ermöglicht bei einer intramyokardialen Injektion lediglich eine Volumenaufnahme von 5  $\mu$ l. In diesem Volumen wurden  $2 \times 10^5$  bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen (Konzentration  $4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$  Zellen /  $\mu$ l; Gesamtvolumen 4 – 5  $\mu$ l) suspendiert und anschließend injiziert. Für eine möglichst präzise Applikation wurde eine Hamilton Spritze, mit einem Fassungsvermögen von 10  $\mu$ l, über einen Polyurethanschlauch (0,28 mm ID, 0,61 mm OD) mit einer 29 G Insulinnadel verbunden. Das Injektionssystem wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit sterilem PBS gefüllt. Vor der Zellaufnahme ins Injektionssystem wurde 1  $\mu$ l Raumluft in die Spritze aufgezogen, um zu gewährleisten, dass die Zellen nicht mit der PBS-Lösung in Berührung kommen und so verdünnt werden. Anschließend wurde die Hamilton Spritze in eine Injektionshilfe gegeben, die über Fußpedale auslösbar ist. Das Herz konnte mit einem kleinen, antimagnetischen Löffel ( $\varnothing$ : 5 mm) zur Thoraxapertur hin luxiert werden, so dass sich die Läsion des linken Ventrikels gut darstellen ließ. Bei optimaler Herzlage wurde die Injektionsnadel vorsichtig im flachen Winkel in die Infarktregion intramyokardial eingeführt und 1 - 2 mm vorgeschoben. Es erfolgte eine definierte Zellinjektion, wobei sich eine kleine Tasche im Myokard bildete, in der die Zellen lokal platziert und durch die Lebensmittelfarbe (siehe 2.2.7) visuell validiert werden konnten (Abb. 10 D, E). Die Nadel wurde in einer kleinen, mit sterilem PBS gefüllten Schale, zwischen den Injektionen aufbewahrt.

Wurde die Injektion unter Applikation eines Magnetfeldes durchgeführt, befand sich ein 1,3 Tesla Stabmagnet ( $\varnothing$ : 5 mm, Abb. 8 B) in einem Abstand von ca. 5 mm über dem schlagenden Herz (Abb. 10 E). Der Magnet war an einer höhenverstellbaren Vorrichtung fixiert, um eine exakte Positionierung zu ermöglichen. Nach Anlage des Magnetfeldes erfolgte die Zellinjektion wie oben bereits beschreiben. In Anlehnung an Cheng et al., 2010 wurde der Magnet während und 10 Minuten nach der Injektion über dem schlagenden Herz positioniert. Außerdem wurden in dieser Arbeit noch zwei weitere Magnetzeiten (5 und 30 Minuten) untersucht. Nach der Injektion wurden der Magnet und die

Stabilisierungshilfe des Herzens entfernt und der Situs wie unter 2.3.1.2 beschrieben geschlossen.



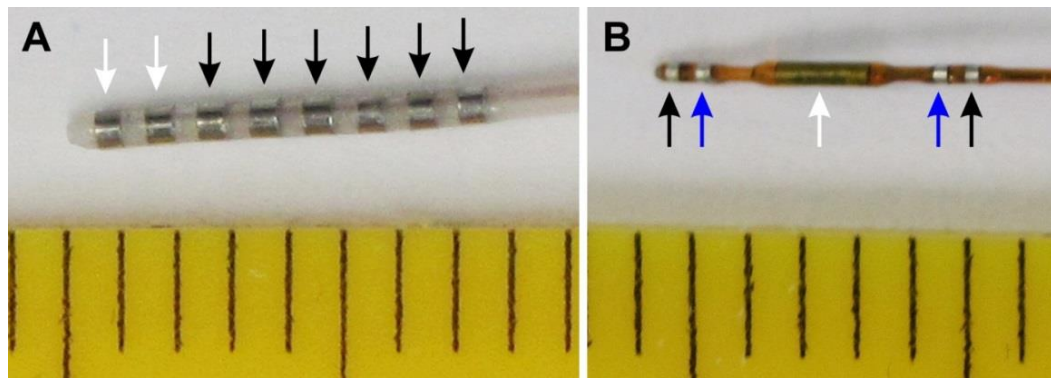
**Abbildung 10: Infarktinduktion und intramyokardiale Zellinjektion**

(A) Luxiertes Mauserz nach Thorakotomie. (B) Induktion eines KIs durch Aufsetzen einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Kupfersonde (ca.  $-196^{\circ}\text{C}$ ) auf den linken Ventrikel apexnah. (C) Vereistes linksventrikuläres Myokard nach der Infarktinduktion. (D, E) Zellinjektion unter Magnetfeld-Applikation in das linke Ventrikelmyokard. (F) Die Zellinjektion konnte durch Beimischung von blauer Lebensmittelfarbe visuell validiert werden.

## 2.4 Analyse der Herzfunktion

### 2.4.1 Herzkatheteruntersuchung

Die Herzkatheteruntersuchung ist eine minimalinvasive medizinische Untersuchung des Herzens über einen Katheter, der über venöse oder arterielle Gefäße eingeführt werden kann. Je nach Untersuchungsziel werden unterschiedliche Stellen im Herzen bzw. in den Herzkranzgefäßen angesteuert. Die Lage des Zieles bestimmt auch die Wahl des Zugangs, man spricht vom Rechtsherzkatheter (RHK) (Abb. 11 A), wenn der Bereich der rechten Herzkammer untersucht werden soll, entsprechend vom Linksherzkatheter (LHK) bei der Untersuchung der linken Herzkammer (Abb. 11 B).



**Abbildung 11: Darstellung des RHK und LHK**

(A) Aufbau des oktapolaren, 2 F starken RHK. Die schwarzen Pfeile markieren die sechs Aufnahmeelektroden, die weißen Pfeile das für die Stimulation verwendete Elektrodenpaar apexnah. (B) Aufbau des 1,4-French Druck-Volumen-Katheter (LHK). Der weiße Pfeil markiert die Druckeinheit, die blauen Pfeile die zwei Messelektroden und die schwarzen Pfeile deuten auf die Sendeelektroden hin.

#### 2.4.2 Linksventrikuläre Katheteruntersuchung

Bei der linksventrikulären Katheteruntersuchung wurde über einen Druck-Volumen-Katheter ( $\emptyset$  1,4 French, Abb. 11 B) gleichzeitig Druck (in mmHg) und Volumen (in  $\mu$ l) des linken Ventrikels gemessen. Der intrakardiale Druck wird hierbei direkt über ein Miniaturbarometer aufgezeichnet. Vor und hinter dem Barometer befinden sich jeweils zwei Platinelektroden, die das innerventrikuläre Volumen registrieren. Dabei wurde von den beiden äußeren Elektroden ein elektrisches Feld mit einer Stromstärke von 40  $\mu$ A und einer Frequenz von 20 kHz ausgegeben. Die beiden inneren Elektroden dienen als Messelektroden (vgl. Abb. 11 B). Veränderungen der elektrischen Leitfähigkeit des Blutes, bedingt unter anderem durch den Blutfluss und die Füllung des Ventrikels, können so als Änderungen der Signalstärke detektiert werden. Dabei unterscheidet sich das blutgefüllte Herz deutlich in seiner Leitfähigkeit von der umgebenden luftgefüllten Lunge.

Der LHK wurde über einen Verstärker an einen Computer angeschlossen, an dem sich die Druck-Volumen-Messung mittels der LabChart Software live detektieren ließ. Dabei konnte der Druck direkt in mmHg abgelesen werden. Das Volumen wurde in relativen Volumeneinheiten (RVU) angegeben und nach einer Kalibrierung in  $\mu$ l umgerechnet. Die Kalibrierung des Katheters erfolgte über eine Volumeneichung, bei der fünf Zylinder von definierter, ansteigender Volumengröße mit Blut der zu untersuchenden Mäuse gefüllt wurden.

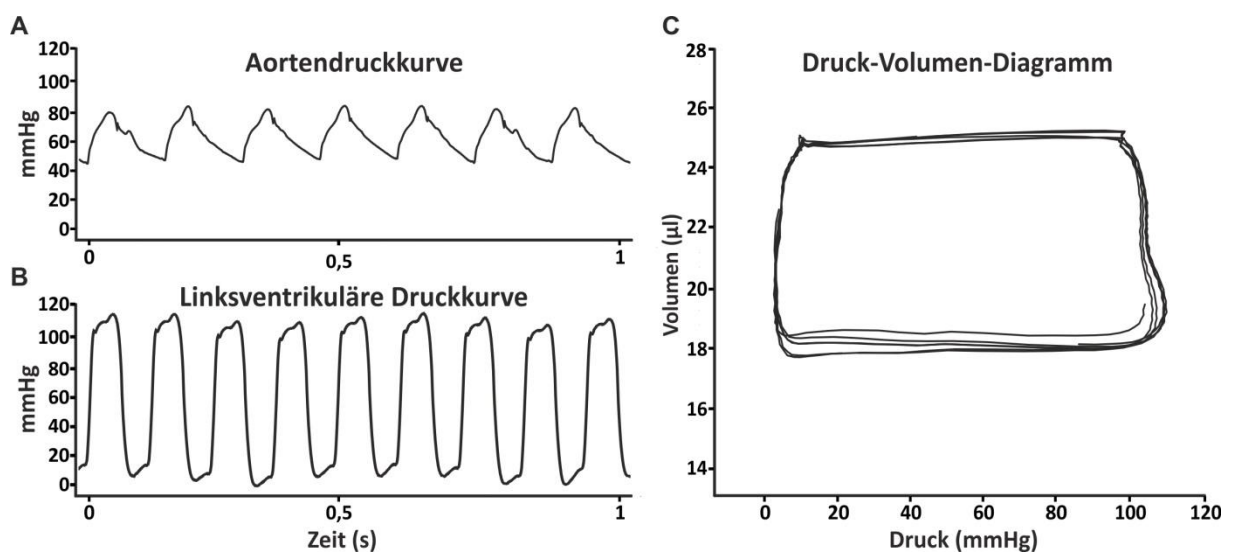
Die LHK erfolgte an Tag 14 (Kurzzeit, KZ) oder an Tag 56 (Langzeit, LZ) nach der intraoperativen Zellinjektion (vgl. 2.3.2). Für die KZ-Untersuchungen wurden zum einen SO-Mag5-beladenen eCM in weibliche CD1-WT Mäuse mit und ohne Magnet-Applikation injiziert. Daneben erfolgten KZ-LHK Untersuchungen an männlichen SV129 Mäusen, welchen SO-Mag5-beladenen ES-CM mit und ohne Magnet-Applikation injiziert wurden. Für LZ-Studien wurden SO-Mag5 beladene eCM in Bl6 Mäuse mit und ohne Magnetfeld-Anwendung transplantiert. Als Kontrollgruppen dienten kryoinfarzierte Mäuse des entsprechenden Mausstamms (CD1-WT, SV129 oder Bl6), welchen 20 % IMDM injiziert wurden, sowie Tiere mit thorakotomierten Herzen ohne KI und ohne Injektion.

### **2.4.2.1 Operative Technik der Linksventrikulären Untersuchung**

Die Tiere wurden für den LHK wie unter 2.3.1.2 beschrieben inhalativ narkotisiert und auf dem Rückend liegend fixiert. Eine Intubation wie bei der Infarktinduktion wurde nicht benötigt, da der Thorax für die LHK-Untersuchung nicht eröffnet werden musste. Die Beatmung erfolgte über eine Maske (abgeschnittene 5 ml Spritze). Nach Desinfektion (70 % Ethanol) des Halsbereichs wurde ein medianer, cervikaler Hautschnitt durchgeführt und auf der linken Seite die *Vena jugularis externa* freipräpariert, in die im späteren Verlauf eine 10 %-ige Kochsalz-Lösung appliziert wurde. Nach Verdrängung der Speicheldrüse wurde die darunter liegende Muskelschicht mit Hilfe eines Fadens retrahiert, um einen besseren Zugang zur darunter liegende *Arteria carotis communis* zu bekommen, in die der Katheter später eingeführt wurde. Zuvor musste aber das Gefäß vorbereitet werden, indem der angrenzende *Nervus vagus* abpräpariert und die *A.carotis* mit zwei Fäden umschlungen wurde. Der distal verlaufende Faden wurde verschlossen, was zu einer Ligatur des Gefäßes führte. Der proximal verlaufende Faden wurde angeschlungen und mit einer Klemme so angespannt, dass ein Rückfluss von Blut bei der Eröffnung der *A.carotis* verhindert werden konnte. Mit einer feinen Federschere wurde die *A.carotis* quer inzidiert, der Katheter eingeführt und vorsichtig in Richtung Herz vorgeschoben. Hierbei konnte der Aortendruck (Abb. 12 A) so lange registriert werden, bis der Katheter die Aortenklappe passiert hatte und sich der ventrikuläre Druck (Abb. 12 B) detektieren ließ. Befand sich der Katheter in einer optimalen Position, wurden Druck und Volumen für ca. 5 Minuten mit der LabChart Software aufgezeichnet (Abb. 12 C). Zum Ende der Messung wurden ohne Veränderung der Katheterposition 10 µl einer 10 %-igen NaCl-Lösung in die linke Jugularvene mit Hilfe des



unter 2.3.2 beschriebenen Hamilton-Injektionssystem injiziert. Dies führte zu einer kurzzeitigen Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit innerhalb des Ventrikels, was zu einem Anstieg der Volumenkurve führte, die sich über den Katheter registriert ließ. Dieser zusätzliche Eingriff war notwendig, da der Katheter nicht nur das Volumen im linken Ventrikel, sondern auch das Volumen im Myokard erfasst. Somit musste das Füllungsvolumen der Herzkammer durch Subtraktion des Myokardvolumens vom Gesamtvolumen errechnet werden. Zum Schluss wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und das Herz für weitere histologische Untersuchungen entnommen.



**Abbildung 12: Charakteristische Druckverläufe sowie Druck-Volumen-Diagramm der Maus**

(A) Repräsentativer Druckverlauf in der Aorta und (B) im linken Ventrikel, aufgezeichnet durch einen Druck-Volumen-Katheter. (C) Zusätzliche im Katheter integrierte Leitfähigkeitselektroden ermöglichen eine Volumenmessung, wodurch sich das Druck-Volumen-Diagramm der Maus darstellen lässt. Drücke in mmHg, Volumen in µl, Zeit in Sekunden.

#### 2.4.2.2 LabChart Analyse

Durch die LHK-Untersuchung lassen sich verschiedene hämodynamische Parameter wie z.B. die Ejektionsfraktion (EF) bestimmen. Hierzu wurde der durch die Kochsalzinjektion bedingte Volumenanstieg im LabChart markiert und als sogenannte „Saline Calibration“ in die Analysesoftware „PVAN“ exportiert. Pro Maus wurden vier optimale Druck-Volumen-Bereiche (mindestens 20 Schläge) in der fünfminütigen Aufnahme ausgewählt und ebenfalls in PVAN exportiert. Mittels entsprechender Analysesoftware konnten aus diesen Rohdaten

u.a. folgende Hämodynamik-Parameter bestimmt werden: die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF, %), das Herzzeitvolumen (HZV, ml/min), das Schlagvolumen (SV,  $\mu$ l), das Enddiastolische Volumen (EDV,  $\mu$ l), der Enddiastolischer Druck (EDP, mmHg) und die Herzfrequenz (HF, bpm).

### **2.4.3 Elektrophysiologische Untersuchung**

Die elektrophysiologische Untersuchung (EPU) ist ein invasives Verfahren, bei dem spezielle Katheterströme aus dem Herzininneren abgeleitet werden, aber auch das Myokard punktuell stimuliert werden kann. Als Katheter wurde ein oktapolarer, 2 F starker Katheter verwendet (vgl. Abb. 11 A), der via der rechten *Vena jugularis* über die Trikuspidalklappe hinweg in die Spitze des rechten Ventrikels vorgeschoben wurde. Über die vier Elektrodenpaare lassen sich bipolar intrakardiale EKG-Signale auf Vorhof-, HIS-Bündel- und Ventrikel Ebene ableiten. Die Stimulation erfolgte über das am weitesten distal gelegene Elektrodenpaar apexnah. Die EPU erfolgte mittels etablierter Extrastimulus- und Burst-Stimulus-Protokolle (Roell et al., 2007). Zusätzlich zu den intrakardialen Elektroden des Katheters, wurden die Tiere über ein Oberflächen-Extremitäten-EKG auf Herzrhythmusstörungen hin überwacht.

Die EPU erfolgte 14 Tage nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-Partikeln / SO-Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnet-Applikation in zuvor kryoinfarzierte Herzen (vgl. 2.3.1.2). Als Kontrolle dienten unbehandelte CD1-WT Mäuse.

#### **2.4.3.1 Operative Technik der EPU**

Die Narkoseeinleitung für den RHK erfolgte wie unter 2.3.1.2 beschrieben, wobei die Isofluran Konzentration so reduziert wurde, dass sich der RR-Abstand im EKG zwischen 120 ms und 150 ms einstellte. Über vier Nadelelektroden, die in die Extremitäten eingeführt wurden, konnte das Oberflächen-EKG und somit die Herzfrequenz abgeleitet werden. Nach Desinfektion (70 % Ethanol) des Halsbereichs wurde ein medianer, cervikaler Hautschnitt durchgeführt und auf der rechten Seite die *Vena jugularis externa* freipräpariert, die distal und proximal mittels eines dünnen Fadens umgeschlungen wurde. Der distal verlaufende Faden wurde verschlossen, was zu einer Ligatur des Gefäßes führte. Mit einer feinen Federschere wurde die Jugularvene inzidiert, der Katheter eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorsichtig vorgeschoben. Bei optimaler Katheterlage, welche anhand der

intramyokardialen Signale überprüft wurde, konnte mit der Stimulation begonnen werden (siehe 2.4.3.2).

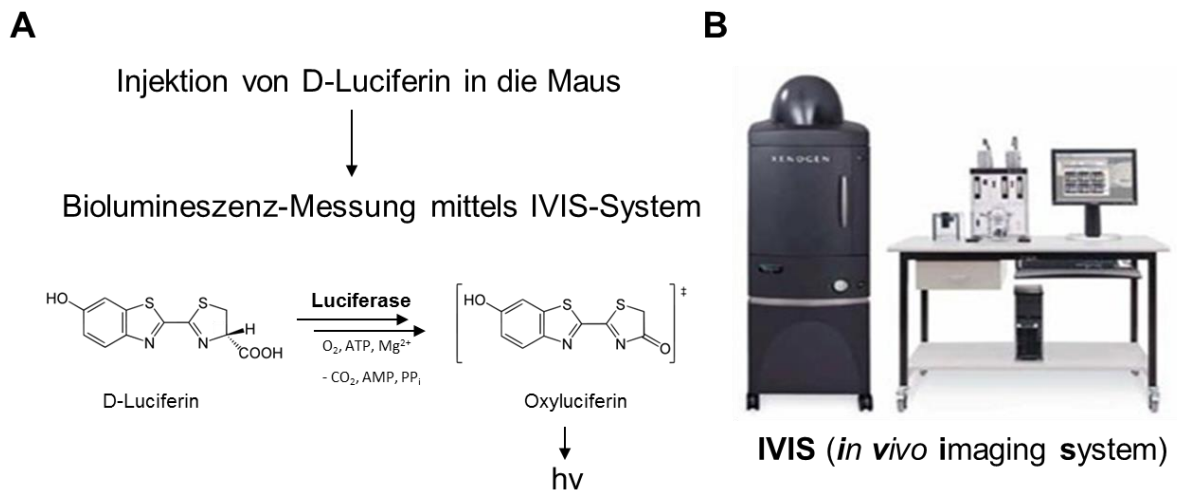
#### 2.4.3.2 Stimulationsprogramm der EPU

Das Stimulationsprogramm wurde durch eine sogenannte „festfrequente Stimulation“ gestartet. Hierbei wurde über die am weitesten distal gelegenen Elektroden 1 und 2 ein Impuls ausgegeben, auf den das Mauserz mit einer Herzkontraktion antworten musste. Dieser Vorgang wurde als „Capture“ bezeichnet. War dies gewährleistet konnte eine sogenannte „programmierte Stimulation“ erfolgen. Hierbei wurden 7 Stimuli in einem festen Abstand ausgegeben, ein achter Stimulus folgte in verkürztem Abstand (- 5 ms / Stimulationszyklus). Der zeitliche Abstand zwischen den ersten 7 Stimuli betrug 120 ms. Beim achten Stimulus begann das Intervall bei 90 ms und verkürzte sich um jeweils 5 ms pro Zyklus auf 10 ms. Danach wurde der Abstand der ersten Stimuli auf 110 ms manuell eingestellt, in einem dritten Zyklus auf 100 ms reduziert. Der achte Stimulus erfolgte bei allen drei Durchgängen immer gleich. Nach einer Erholungsphase von einer Minute wurde die „programmierte Stimulation“ erweitert, indem zu den sieben festfrequenten Stimuli mit einem Intervall von 120 ms und einem achter Stimulus mit 50 ms ein neunter Stimulus folgte. Dieser neunte Stimulus begann wie oben beschrieben bei 90 ms und verkürzte sich um jeweils 5 ms bis auf 10 ms. Zuletzt folgten sieben festfrequente Stimuli mit einem 120 ms Intervall zwei Stimuli mit 50 ms. Ein weiterer zehnter Stimulus wurde variabel abgegeben, begann aber ebenso bei 90 ms und reduzierte sich um jeweils 5 ms bis auf 10 ms. An die „programmierte Stimulation“ schloss sich die sogenannte „Burst-Stimulation“ an. Hierbei wurde das Herz dreimal hintereinander für jeweils 1 Sekunde mit einem Stimulusabstand von 50 ms stimuliert. Danach wurde der Abstand auf 40 ms reduziert und das Herz erneut dreimal hintereinander für jeweils 1 Sekunde stimuliert. Der Abstand wurde erneut um 10 ms verringert, so dass zum Schluss der Abstand nur noch 10 ms betrug. Bei der „Burst-Stimulation“ wurde zuerst eine Stromstärke von 1 mA angelegt, diese jedoch im zweiten Durchgang auf 2 mA erhöht. Nach der Stimulation wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet und das Herz wurde für weitere histologische Untersuchungen entnommen.

#### 2.4.4 Biolumineszenz-Messungen

Als Biolumineszenz bezeichnet man die Fähigkeit von Lebewesen, selbst oder mit Hilfe von Symbionten Licht zu erzeugen. Sie basiert auf chemischen Prozessen, bei denen freiwerdende Energie in Form von Licht abgegeben wird, es handelt sich also um eine spezielle Form der Chemilumineszenz. Für diesen chemischen Prozess wird das Enzym Luciferase benötigt, das die exergone Oxidation des Substrates D-Luciferin zu Oxyluciferin unter molekularem Sauerstoff katalysiert (vgl. Abb. 13 A). Dabei entstehen energiereiche, instabile Dioxetane, welche unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid zerfallen und die gespeicherte Energie in Form von Licht ( $\sim 562$  nm) freisetzen. Mit Hilfe einer geeigneten Kamera lassen sich diese Photonen am narkotisierten Tier *in vivo* detektieren. Die Intensität des detektierten Signals ist hierbei von der umgesetzten Substratmenge abhängig und somit von der Menge der von den Zellen produzierten Luciferase.

Um die intramyokardial injizierten Zellen (eCM) *in vivo* identifizieren zu können, wurden diese zuvor lentiviral mit einem Luciferase-Virus transduziert und anschließend transplantiert. Zur Messung des Biolumineszenz-Signals mussten den Zellen *in vitro* und Mäusen *in vivo* D-Luciferin verabreicht werden. Bei den Zellen konnte das D-Luciferin (5 mg in PBS gelöst) einfach auf die Zellen pipettiert werden. Mäusen hingegen musste das D-Luciferin i.p. injiziert werden (25 mg / Maus, in PBS gelöst), so dass es über den Blutkreislauf zu den Luciferase-exprimierenden Zellen gelangen konnte. Die Tiere wurden anschließend auf dem Rücken liegend unter leichter Narkose (1 – 1.5 Vol % Isofluran) in das Biolumineszenz-Messgerät Xenogen IVIS2000 (Abb. 13 B) gelegt und dort fixiert. Maximal konnten fünf Tiere nebeneinander platziert werden. Mit der dazugehörigen Software „*Living Image*“ wurden die Signale dokumentiert. Nach Einstellung des Fokus (Zellen 0,5 cm; Mäuse 1,5 cm) wurde zuerst eine Durchlichtaufnahme unter normalen Belichtungsverhältnissen mit einer Belichtungszeit von 0,2 s durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurde das Biolumineszenz-Signal, das unter völliger Dunkelheit der Kammer aufgenommen wurde, über das erste Bild gelegt. Verschiedene Belichtungszeiten konnten eingestellt werden. Bei Zellen wurde eine Belichtungszeit von 1 Minute gewählt, bei Mäusen wurden drei aufeinanderfolgende Messungen mit 1, 2 und 3 Minuten Belichtungsdauer durchgeführt.



**Abbildung 13: Biolumineszenz-Detektion *in vivo***

(A) Zur Messung des Biolumineszenz-Signals der Luciferase transduzierten und intramyokardial injizierten eCM wurde den Mäusen D-Luciferin i.p. injiziert (25 mg / Maus, in PBS gelöst). Hierbei katalysiert das aus dem Leuchtkäfer isolierte Enzym Firefly-Luciferase die exergone Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin, bei welcher Luciferol, ATP und Sauerstoff zu Kohlendioxid, AMP und Licht reagieren. Genauer gesagt entstehen energiereiche, instabile Dioxetane, die unter Abgabe von Kohlenstoffdioxid zerfallen und die gespeicherte Energie in Form von Licht ( $\sim 562$  nm) freisetzen. (B) Die behandelten Tiere wurden zur Biolumineszenz Detektion in das Biolumineszenz-Messgerät Xenogen IVIS2000 (*in vivo imaging system*) mit On-board Isofluran Anästhesie überführt.

#### 2.4.5 Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise

Die schematische Darstellung gibt einen zusammenfassenden Überblick über die gesamte experimentelle Vorgehensweise (Abb. 14). Die Zellgenerierung und SO-Mag5-Beladung erfolgte einen Tag vor der Kryoinfarzierung und Zellinjektion mit und ohne Magnetfeld-Applikation. Sieben Tage nach der Transplantation wurden Biolumineszenz-Messungen der mit Luciferase-transduzierten eCM unter Verwendung des IVIS-Systems durchgeführt. Bei Kurzzeit-Studien (KZ) wurde an Tag 14 eine erneute Biolumineszenz-Messung vorgenommen, anschließend erfolgte eine LHK- oder RHK-Untersuchung. Danach wurde das Herz entnommen und für weitere histologische Ausarbeitungen fixiert und kryokonserviert. Für Langzeit-Studien (LZ) wurden nur LHK-Untersuchungen 56 Tage nach der Zelltransplantation durchgeführt. Ebenso wie bei den KZ-Studien wurde das Herz für histologische Untersuchungen entnommen und fixiert.

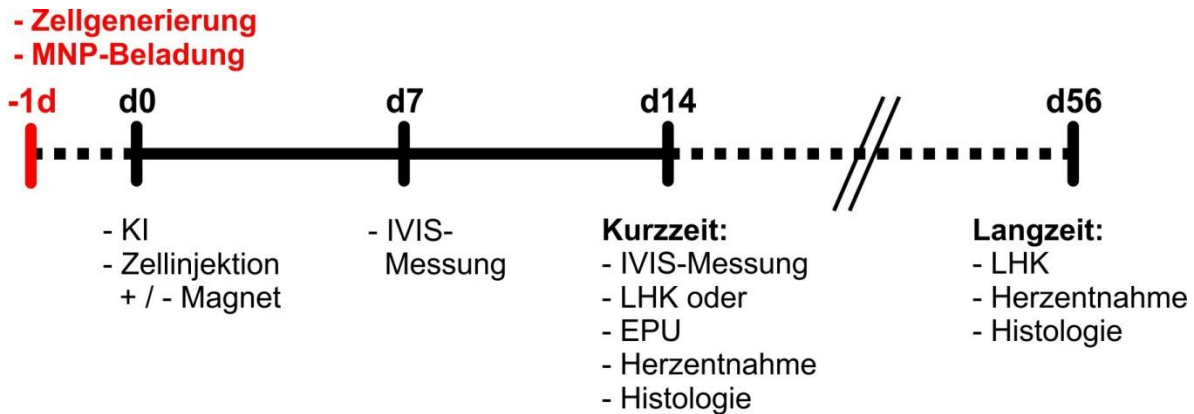


Abbildung 14: Zeitverlauf der experimentellen Vorgehensweise

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Toxizitäts-Analysen

Mit Hilfe von Toxizitäts-Analysen wird die Schädlichkeit / Giftigkeit eines Stoffes untersucht. Zur Bestimmung der Toxizität verschiedener MNP auf die Zell-Viabilität von BMC, eCM und ES-CM wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) Toxizitäts-Analysen durchgeführt. Für adhärenzte Zellen (eCM und ES-CM) wurde eine L-Lactatdehydrogenase- (LDH) Analyse und ein MTT-Test durchgeführt. Bei der LDH-Analyse katalysiert das Enzym L-Lactatdehydrogenase die Oxidation von L-Laktat zu Pyruvat mit der gleichzeitigen Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} / \text{H}^+$ . Da diese Reaktion praktisch in allen Zellen stattfindet, zeigt ein erhöhter LDH-Wert eine Gewebsschädigung an (Rae, 1975). Der MTT-Test wurde erstmals 1983 von Mosmann beschrieben. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ist ein membrangängiger Farbstoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen metabolisiert wird, was schließlich zur Bildung von dunkelblauen Formazan-Kristallen führt. Diese Kristalle sind nicht mehr membrangängig und akkumulieren in proliferierenden, ungeschädigten Zellen. Nach Lyse der Zellen und Solubilisierung der Kristalle kann der Farbstoff anschließend durch kolorimetrische Messung bei 550 nm in einem Multiwell-Spektrophotometer (ELISA-Reader) quantifiziert werden. Für beide Toxizitäts-Analysen wurden eCM und ES-CM wie unter 2.2.5.1 und 2.2.4.3 beschrieben gewonnen und auf eine mit 0,1 % Fibronectin beschichtete 24-Well-Platte in je 1 ml 20 % IMDM ( $3 \times 10^4$  / Well) ausplattiert. Nach 6 Stunden erfolgte die MNP-Beladung bei einer

Konzentration von 20 und 200 pg Fe / Zelle. Als MNP wurden die in Tabelle 1 beschriebenen MNP verwendet. Am darauffolgenden Tag erfolgten die Toxizitäts-Analysen.

Für Suspensionszellen (BMC) wurde ein WST-1-Test durchgeführt (Peskin und Winterbourn, 2000). Der WST-1-Test (*water soluble tetrazolium*) dient zum Nachweis der intakten Atmungskette in Zellen. Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase System bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat) in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer gemessen und ausgewertet werden. Die BMC wurden wie unter 2.2.5.4 beschrieben isoliert und  $1 \times 10^5$  bzw.  $2 \times 10^5$  Zellen in jeweils 100  $\mu$ l 10 % RPMI in einen 96-Well-Platte überführt. Anschließend erfolgte die MNP-Beladung mit SO-Mag5, Pald2-Mag1 und TF-HES-Mag bei Konzentrationen von 20 und 200 pg Fe / Zelle. Nach 24 Stunden erfolgte die Toxizitäts-Analyse. Als Positivkontrolle dienten Zellen die durch Zugabe der Detergens Triton-X (1%) vollständig lysiert wurden, als Negativkontrolle Zellen in HBSS<sup>++</sup>.

## 2.6 Immunhistochemische Methoden

### 2.6.1 Herzentnahme bei Mäusen

Die Herzentnahme erfolgte direkt nach der invasiven elektrophysiologischen und hämodynamischen Untersuchung an Tag 14 und 56. Zur Bestimmung des Anteils der intramyokardial injizierten Zellen, die sich in einem apoptotischen / proliferierenden Zustand befanden, wurden die Herzen ohne vorangegangene elektrophysiologische und hämodynamische Untersuchung an Tag 2, 3, 6 und 14 entnommen. Für die MPS-Messung der SO-Mag5-Partikel in verschiedenen Organen wurden die Mäuse 10 Minuten nach der Zellinjektion geopfert. Die Mäuse wurden noch in Narkose durch zervikale Dislokation getötet und auf ein Styropor-Brettchen mittels Injektionskanülen fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Mit einer groben Schere wurde die Haut und Muskulatur unterhalb des Thorax aufgeschnitten und das Zwerchfell über eine mediane Inzision dargestellt und dicht an den Rippen abgelöst. Danach wurden die Rippen zu beiden Seiten lateral durchtrennt, so dass der Brustkorb kranial hochgeklappt und ebenfalls fixiert werden konnte. Das Herz konnte nach Entfernung von eventuellen Verwachsungen am Brustkorb entnommen und in eine mit eisgekühltem PBS gefüllte 10 cm Schale überführt werden. Eine

Stereolupe mit integrierter Fluoreszenzlampe und einer Mikroskop-Kamera, in Kombination mit der entsprechenden ProgRes Image Capture Software, ermöglichte eine Visualisierung und Dokumentierung des infarzierten Areals und der eGFP<sup>+</sup>-transplantierten Zellen.

### **2.6.1.1 Perfusion und Fixierung von Herzen**

Nach der Herzentnahme wurde die Aorta mittels einer 20 G Kanüle kanüliert und das Gefäß mit Garn abgedichtet fixiert. Zuvor wurde eine 2 ml Spritze luftblasenfrei an die Kanüle angeschlossen. Das kanülierte Herz konnte nun an eine Perfusionsanlage angeschlossen und mit 10 ml PBS (4°C) perfundiert werden. Zur Fixierung des Herzens wurden 10 ml 4 %-iger Paraformaldehyd-Lösung (4 % PFA) verwendet, die nach der Perfusion in einem 15 ml Falcon aufgefangen wurden. Das Herz wurde ebenso in dieses Falcon überführt und über Nacht zur weiteren Fixierung bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde das 4 %-ige PFA entfernt und das Herz dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen. Gleichzeitig zum Waschschrift wurde eine 20 %-ige Saccharose-Lösung angesetzt, in der das Herz für eine weitere Nacht bei 4°C gelagert wurde. Die Saccharose bewirkte eine Entwässerung des Gewebes.

### **2.6.1.2 Kryokonservierung von Herzen**

Das Einfrieren der Herzen erfolgte einen Tag nach der Entwässerung in 20 %-iger Saccharose. Hierzu wurde ein Becherglas mit Isopentan (2-Methylbutan) gefüllt und auf Trockeneis gestellt. Das Herz wurde unterdessen in ein Schnappdeckelgefäß, das mit Tissue-Tek Einfriermedium luftblasenfrei befüllt wurde, mittig mit der Spitze nach unten platziert, bis es völlig vom Medium bedeckt war. Das Gefriergefäß wurde dann in ein Becherglas mit Isopentan gestellt, so dass das Herz im Tissue-Tek in wenigen Minuten einfrieren konnte. Der Gefriervorgang ermöglicht eine jahrelange Lagerung der Herzen bei -80°C.



### **2.6.1.3 Anfertigung von Kryoschnitten**

Mit Hilfe des Kryotoms lassen sich Gefrierschnitte von verschiedenen Geweben herstellen. Hierzu wurde das Herz im Gefriergefäß aus  $-80^{\circ}\text{C}$  ins Kryotom überführt und in der Mitte des Schnittstempels durch Anfrieren mit Tissue-Tek befestigt. Der Stempel konnte so auf dem Schneidearm des Kryotoms gesteckt werden. Die Schnittdicke betrug  $10\ \mu\text{m}$ . Für optimale Schneidebedingungen wurde die Kammertemperatur zwischen  $-21^{\circ}\text{C}$  und  $-22^{\circ}\text{C}$  gewählt und die Objekttemperatur lag mit  $-18^{\circ}\text{C}$  und  $-19^{\circ}\text{C}$  geringfügig darunter. Die gefertigten Schnitte wurden auf speziell beschichtete Objektträger ( $76 \times 26 \times 1\ \text{mm}$ ) aufgezogen und für weitere immunhistochemische Färbungen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.6.2 Fixierung von Zellen**

Für die Fixierung von Zellen und Gewebestrukturen wurde PFA in einer Konzentration von 4 % verwendet. Dabei werden Proteine durch Methylbrücken reversibel miteinander vernetzt. Hierzu musste zuerst das jeweilige Medium entfernt und die Zellen mit PBS mehrfach gewaschen werden, um alle Reste des fötalen Kälberserums, welches im Medium enthalten ist, zu entfernen. Hiernach wurden die Zellen mit 4 %-igem PFA bedeckt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. Das 4 %-ige PFA wurde anschließend entfernt und überschüssige Reste durch dreimaliges Waschen mit PBS abgetragen. Bei Bedarf konnten die Zellen direkt im Anschluss für Färbungen verwendet oder mit einer ausreichenden PBS-Beschichtung für mehrere Wochen bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

## **2.7 Immunhistochemische Färbung von Zellen und Herzschnitten**

Für Fluoreszenzfärbungen von Zellen und Gewebeschnitten wurde zuerst eine „feuchte Kammer“ angelegt. Hierzu wurden feuchte Zellstofftücher in einen leeren Schnittkasten ausgelegt. Bei Zellfärbungen wurde der Kasten zusätzlich mit Parafilmstreifen versehen, auf die 24-Well-Plättchen gelegt werden konnten. Zur Färbung von Gewebeschnitten erfolgte zunächst eine Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift, was ein Verlaufen der verwendeten Lösungen verhinderte und die einzusetzende Menge an Lösungen so gering wie möglich hielt. Hiernach wurden Zellen und Gewebeschnitte kurz mit PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten identisch. Zuerst wurden die Schnitte mit einer 0,2 %-igen

Triton-Lösung (Triton-X 100, in PBS) für 10 Minuten permeabilisiert und nochmals mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren, wurden die Schnitte / Zellen in 5 %-igem Eselserum für 20 Minuten behandelt. Danach erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern für 2 Stunden bei RT oder alternativ für zwölf Stunden bei 4°C. Hiernach schlossen sich erneut drei weitere 10-minütige Waschschrte mit PBS an.

Der fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper, der sich stets gegen die Spezies richtet, aus der der Primärantikörper stammt, wurde in eine 1 : 1000 verdünnten Hoechst-Färbelösung pipettiert und für einen Stunde bei RT inkubiert. Hoechst interkaliert in die DNA der Zellen und färbt diese blau an. Anschließend wurden die Schnitte / Zellen dreimal für jeweils zehn Minuten mit PBS gewaschen und schließlich mit einem Eindeckmedium auf Wasserbasis (Fluka) eingedeckt. Die Schnitte wurden über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet und Fluoreszenzaufnahmen erfolgten unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops.

### **2.7.1 Antigen-Retrieval**

Mit der Methode des Antigen-Retrievals können in der Immunhistochemie die verlorengegangene Immunreaktivität von formalin-fixierten und paraffineingebetteten Gewebe teilweise wieder hergestellt werden. Dies ist notwendig, da bei der Fixierung von Gewebe und Zellen die Proteine miteinander quervernetzt werden. Einige Epitope verlieren dadurch ihre Eigenschaft, so dass sie von dem zugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt werden können. Die Proteine werden somit durch den Fixierungsprozess geschädigt oder ganz zerstört. Die Quervernetzungen („Maskierungen“) können durch die Methode des Antigen-Retrievals („Antigendemaskierung“) zum Teil wieder rückgängig gemacht werden. Die Schnitte werden dabei in kochendem Natriumzitatpuffer (10 mM) mit einem pH-Wert von 6,0 überführt und für 15 Minuten bei 93°C in einer Mikrowelle weiter gekocht. Hiernach mussten die Schnitte für mindestens 30 Minuten bei RT im Zitratpuffer abkühlen und wurden danach in eine Glasküvette mit PBS überführt. Anschließend erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen.

### **2.7.2 Preußisch-Blau-Färbung von Herzschnitten**

Preußisch Blau ist ein dunkelblaues, künstlich hergestelltes Pigment, das in einem histochemischen Verfahren zum Nachweis von Eisen im Gewebe dient. Im Falle der intramyokardial injizierten Zellen konnten so die MNP, die von den Zellen aufgenommen

wurden, sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden 10 µm dünne Kryoschnitte der Herzen verwendet. Eine Lösung aus 5 % Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung und 5 % HCl im Verhältnis 1:1 wurde unter dem Abzug gemischt und je 100 µl auf jeden Gewebeschnitt pipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Das Eisen im Schnitt wird durch die Salzsäure ionisiert, wodurch es eine hohe Affinität zum Ferrocyanid bekommt und das Kalium verdrängt.

Hiernach wurde jeder Schnitt dreimal mit PBS gewaschen und das Zytoplasma mit Eosin (max. 1 Minute) gegengefärbt. Die anschließende Alkoholreihe sowie das Eindecken der Schnitte mit nicht wässrigen, xylolhaltigen Eindeckmedium (Entellan) erfolgte wie unter 2.7.3 beschrieben. Nach einer Trocknungszeit von 24 Stunden konnten die Schnitte mikroskopiert werden. Im Präparat stellen sich die Kerne rot, die Eisenablagerungen der MNP blau dar.

### **2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

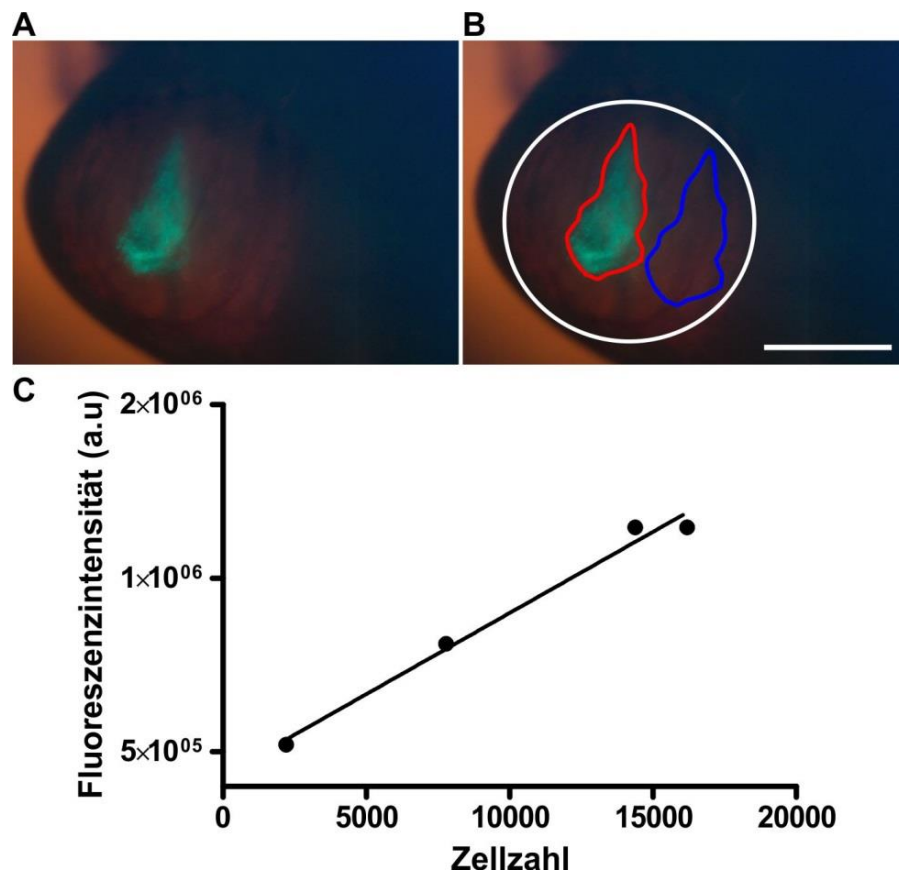
Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine weit verbreitete Routinefärbemethode, mit dem die verschiedenen Strukturen eines Gewebeschnittes angefärbt werden können. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff, der in Form des basischen Hämaun alle Strukturen blau anfärbt, wie beispielsweise Zellkerne. Eosin ist dagegen ein synthetischer Farbstoff, der alle Zellstrukturen (Kollagen, Zytoskelett, Zytoplasma usw.) rot anfärbt. Zunächst musste eine Deparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgen. Hierzu wurden die Schnitte in einem Glasschlitten in eine Alkohollösung absteigender Konzentration (100 %, 90 %, 70 %) jeweils für 5 Minuten gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Hämatoxylin-Färbung für 4 Minuten. Die Zellkerne erschienen zunächst rötlich-braun, aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Durch Erhöhung des pH-Wertes mittels Spülen unter fließendem Leitungswasser (Bläuen, 2-3 Minuten) schlug der Farbton ins Blaue um. Anschließend erfolgte die Zytoplasma-Färbung in Eosin (max. 1 Minute). Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt. Durch weitere Spülschritte (jeweils fünfmal eintauchen in die jeweilige Lösung) über Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration (70 %, 90 %, 100 %) wurde das Wasser aus den Gewebeschnitten verdrängt. Anschließend wurden die entwässerten Schnitte in dem organischen Lösungsmittel Xylol geklärt und mit Entellan (siehe 2.7.2) eingedeckt.

## 2.7.4 Quantitative Bestimmung der Zellzahl

### 2.7.4.1 Quantifizierung der intramyokardial injizierten Zellen

Die Quantifizierung der intramyokardial injizierten Zellen erfolgte mit Hilfe von MosaiX-Aufnahmen, die eine Zusammenfügung mehrerer benachbarter Gesichtsfelder zu einem Gesamtbild ermöglichen, so dass ein beliebig großer Ausschnitt eines Objektträgers aufgenommen werden konnte. Vor den MosaiX-Aufnahmen erfolgte die immunhistochemische Aufbereitung der 10 µm dünnen Herzschnitten. Hierzu wurden die Zellkerne mit Hoechst und die Querstreifung der Herzmuskelzellen mit anti- $\alpha$ -Aktinin gefärbt. Die injizierten Zellen konnten durch ihre natürliche eGFP-Expression detektiert werden. Die Auszählung der MosaiX-Aufnahmen erfolgte über die Software WCIF ImageJ. Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil der  $\alpha$ -Aktinin<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-Zellen im Infarktbereich.

Eine Quantifizierung der intramyokardial injizierten Zellen erfolgte über die Oberflächenfluoreszenz der eGFP<sup>+</sup>-Zellen. Die Methode hierzu wurde in Kooperation mit Jun.-Prof. Dr. Philipp Sasse (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) etabliert. Hierbei wurden makroskopisch Oberflächenaufnahmen des Infarktbereiches durchgeführt und diese Aufnahmen in die Software „WCIF ImageJ“ geladen (Abb. 15 A). Die Fläche der injizierten Zellen sowie der Hintergrund gleicher Fläche, wurden per Hand umfahren und ausgemessen (Abb. 15 B). Zudem wurde das rote, blaue und grüne Signal in Pixel gemessen. Aus diesen Parametern konnte hiernach das Hintergrundsignal vom durchschnittlichen grünen Signal subtrahiert und das Produkt dessen mit der Fläche multipliziert werden. Zugleich wurden von den gleichen Herzen mit und ohne Magnetfeld-Applikation während der Zelinjektion, Gewebeschnitte angefertigt und die Zahl der injizierten eGFP<sup>+</sup>-Zellen mittels immunhistochemischer Färbung ( $\alpha$ -Aktinin und Hoechst, siehe oben) alle 70 µm bestimmt. Durch Korrelation der ausgezählten Zellzahl mit der durch die Fluoreszenzintensität ermittelten Zellzahl, konnte eine Regressionsgerade mit der Formel ( $y = 27\,627x - 16\,204$ ,  $R^2 = 0,996$ ) erstellt werden, womit auf die Anzahl eGFP<sup>+</sup>-Zellen im Infarktbereich zurückgeschlossen werden konnte (Abb. 15 C).



**Abbildung 15: Quantitative Analyse von intramyokardial injizierten SO-Mag5-beladenen Zellen**

(A) Für eine quantitative Analyse der injizierten MNP-beladenen Zellen wurden Lupenaufnahmen von Mausherzen mit der Software „WCIF ImageJ“ aufgenommen und analysiert. (B) Dazu wurde das eGFP<sup>+</sup>-Signal der injizierten Zellen (rot) sowie der Hintergrund (blau) im Infarktbereich (weißer Kreis) per Hand umfahren und die roten, grünen und blauen Pixel-Signale bestimmt. Der Durchschnittswert des grünen Signals wurde vom Hintergrundsignal subtrahiert und mit der Fläche multipliziert. Maßstabsbalken: 2mm. (C) Korrelation der Zellzahl (x-Achse) gegen die Fluoreszenzintensität (a.u., y-Achse). Mit Hilfe der gebildeten Regressionsgerade konnte die Zellzahl (X) unter Verwendung der Regressionsgleichung  $[x = (\text{Pixel} + 16\,204) / 27\,627; R^2 = 0,996]$  bestimmt werden.

#### 2.7.4.2 Quantifizierung apoptotischer und proliferierender Zellen

Die Quantifizierung apoptotischer und proliferierender Zellen erfolgte über MosaiX-Aufnahmen (siehe 2.7.4.1). Zur Detektion des apoptotischen Signals wurden Kryoschnitte (vgl. 2.6.1.3) von Herzen, die an Tag 2, 3, 6 und 14 nach der intramyokardialen Injektion der eGFP<sup>+</sup>-eCM mit und ohne Magnet-Applikation entnommen wurden, gegen Caspase3 und TUNEL gefärbt. Caspase3, die zu den Cysteinproteasen gehört, spaltet dabei die Proteinketten spezifisch hinter einem Aspartatrest und führt daher zur Apoptose. Die Bezeichnung „TUNEL“ steht für „*TdT-mediated dUTP biotin nick end labeling*“ und dient der Darstellung der Zellkerne apoptotischer Zellen, bei denen der DNA Strang des Zellkerns

durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert wurde. Ausgewertet wurde der Anteil der Caspase3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM an der Gesamtzellzahl der injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM, durch Auszählung der gefärbten Kryoschnitte.

Zur Bestimmung des proliferativen Anteils der injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM wurden die Proliferationsmarker Ki-67 und PHH3 eingesetzt. Dabei erkennt der Ki-67 Antikörper ein nukleäres Antigen, das nur in proliferierenden Zellen vorkommt und kontinuierlich während des gesamten Zellzyklus erkannt wird (Gerdes et al., 1984). Der Phosphohistone H3 (PHH3) Antikörper ist dagegen eines der 5-Haupt-Histonproteine, welche zusammen mit der genomischen DNA das Chromatin eukaryontischer Zellen bilden. Dieser Antikörper detektiert nur phosphorylierte Histone in der M-Phase des Zellzyklus. Ebenso wie bei der oben bereits beschriebenen Apoptose-Färbung wurde auch bei der Ki-67-Färbung der Anteil der Ki-67<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM an der Gesamtzellzahl der injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM durch Auszählung gefärbter Kryoschnitte bestimmt. Zur weiteren Verifizierung wurde eine PHH3-Antikörperfärbung von Gewebeschnitten von Tag 2 durchgeführt und der Anteil PHH3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM bestimmt. Um darüber hinaus den Anteil der proliferierenden CM bestimmen zu können, musste zunächst der prozentuale Anteil von eCM an der Gesamtzahl von eGFP<sup>+</sup>-Zellen eruiert werden. Dies war essentiell, um die koinjizierten Fibroblasten von der Zählung auszuschließen. Deshalb wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung mit dem Kardiomyozytenmarker PCM1 durchgeführt. „PCM1“ steht hierbei für „*pericentriolar Material 1*“ und markiert spezifisch die CM-Kerne durch ein kreisförmiges rotes Signal im äußeren Kernbereich (Bergmann und Jovinge, 2012). Durch Auszählung der gefärbten Kryoschnitte konnte somit der Anteil der CM (PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM) sowie der Anteil proliferierender CM (PHH3<sup>+</sup>-PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM) an der Gesamtzellzahl der transplantierten Zellen bestimmt werden.

## 2.8 Mikroskopie

Für makroskopische Aufnahmen der intramyokardial injizierten eGFP<sup>+</sup>-Zellen wurde eine Fluoreszenz-Stereolupe verwendet. Für Immunfluoreszenz-Aufnahmen von gefärbten Zellen oder Gewebeschnitten wurde ein Zeiss Observer (Z1) Mikroskop, ausgestattet mit einer Fluoreszenzlampe (XBO 75) und einer AxioCam (MRm) Kamera und entsprechender AxioVision Software verwendet. Die Fluoreszenz der unterschiedlichen Farbstoffe wurde durch Licht mit geeigneter Wellenlänge angeregt. Für hochauflösende Aufnahmen wurde ein

Zeiss Axiovert (200 M) Mikroskop, ausgestattet mit einer Apotom-Einheit sowie einer AxioCam (MRC) verwendet.

## 2.9 Statistik

Alle statistischen Auswertungen wurden mit der Software Excel und GraphPad Prism durchgeführt. Beim Vergleich mehrere Gruppen miteinander wurde eine *One-way ANOVA-Analysen* mit anschließendem *Tukey's comparison Test* durchgeführt. Wurden zwei normal verteilte Gruppen untersucht, wurde ein *Student's t-Test* herangezogen. Ausgehend vom p-Wert werden verschiedene Grade der empirischen Signifikanz unterschieden und durch Sterne markiert. Bei einem Stern (\*) lag das Signifikanzniveau bei einem errechneten p-Wert geringer als 0,05, bei zwei Sternen (\*\*) geringer als 0,01 und bei drei Sternen (\*\*\*) geringer als 0,001. Die in dieser Arbeit gezeigten Balkendiagramme zeigen die berechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (*SEM = standard error of the mean*).

## 2.10 Von Kooperationspartnern durchgeführte Experimente im Überblick

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Experimente in Kooperation mit verschiedenen Partnern durchgeführt. Im Folgenden sind die Kooperationspartner und die durchgeführten Analysen/Messmethoden sowie die hergestellten Substanzen aufgeführt:

- Alle Lentiviralen Vektoren (vgl. 2.1.8) und Toxizitätsanalysen (LDH-, MTT-, WST-1-Tests, vgl. 2.5.1) wurden von Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn nach einem bereits etablierten Protokoll (Zimmermann et al., 2011) generiert / durchgeführt und zusammen mit den ermittelten Titern zur Verfügung gestellt.
- Alle in dieser Arbeit verwendeten MNP wurden durch Dr. Olga Mykhaylyk (Arbeitsgruppe von Prof. Plank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) hergestellt und näher charakterisiert (vgl. 2.1.9).
- Die MPS-Messmethode (*magnetic particle spectroscopy*) zur Bestimmung der MNP-Konzentration in Zellen / Organen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe

- von Prof. Trahms (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Berlin) durchgeführt (vgl. 2.2.8.2 und 2.2.8.3).
- Alle Permanentmagnete wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, IMETUM, Technische Universität München) hergestellt und die Magnetfelder berechnet. Zudem wurde die Verteilung von MNP-beladenen Zellen simuliert (vgl. 2.2.9).
  - Für die Untersuchung der MNP-Lokalisation innerhalb der Zellen wurden Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen von SO-Mag5-beladenen eCM *in vitro* in Kooperation mit Prof. Dr. W. Bloch (Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln) durchgeführt (vgl. 2.2.10)
  - Um die Auswirkungen einer MNP-Beladung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von eCM untersuchen zu können, wurden Patch-Clamp-Analysen von unbeladenen (nativen) und SO-Mag5-beladenen eCM in Kooperation mit Dr. Tobias Brüggemann (Arbeitsgruppe Sasse, Institut für Physiologie I, Universität Bonn) durchgeführt (vgl. 2.2.11).
  - Eine Quantifizierung der intramyokardial injizierten Zellen erfolgte über die Oberflächenfluoreszenz der eGFP<sup>+</sup>-Zellen. Die Methode hierzu wurde in Kooperation mit Jun.-Prof. Dr. Philipp Sasse (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) etabliert (vgl. 2.7.4.1).



### 3. Ergebnisse:

#### 3.1 Identifizierung geeigneter MNP und Anforderungen für eine optimale Zellbeladung *in vitro*

Für die Beladung unterschiedlicher Zelltypen musste zunächst ein geeigneter Magnetischer Nanopartikel (MNP) ermittelt werden. An diesen MNP wurden hierbei einige essentielle Anforderungen gestellt. Zum einen musste der eingesetzte MNP von allen Zelltypen aufgenommen werden, zum anderen sollte auch das magnetische Moment dieses MNP groß genug sein, um die Zellen ausreichend magnetisieren zu können. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf eine *in vivo*-Anwendung in der Maus, da mit Hilfe der MNP die Zellen soweit magnetisiert werden sollten, um sie, in Kombination mit einem angelegten Magnetfeld, möglichst lokal in einem Infarkt-spezifischen Areal positionieren zu können. Gleichzeitig durfte der MNP keine toxischen Effekte auf die Zellvitalität ausüben. Um den für die *in vivo*-Experimente am besten geeigneten MNP zu finden, wurden verschiedene Vor-Versuche *in vitro* durchgeführt.

##### 3.1.1 MNP-Absorption und Beladungseffizienz von Zellen

Zur Identifizierung des am besten geeigneten MNP für eine Magnet-basierte lokale Zellinjektion *in vivo* wurden embryonale Kardiomyozyten (eCM), ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten (ES-CM) und Knochenmarkzellen (BMC) jeweils mit fünf verschiedenen MNP (SO-Mag5, PEI-Mag2, NDT-Mag1, PALD2-Mag1 und TF-HES-Mag) über Nacht *in vitro* beladen und auf ihre Beladungseffizienz hin mikroskopisch untersucht. Die verschiedenen MNP wurden von Frau Dr. Olga Mykhaylyk (Arbeitsgruppe von Prof. Plank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) zur Austestung vorgeschlagen. Die Beladungsversuche ergaben, dass die MNP PEI-Mag2 und NDT-Mag1 aufgrund ihrer fehlenden Beladungseffizienz von Suspensionszellen (BMC, siehe Tabelle 2) sowie ihrer erhöhten toxischen Wirkung auf eCM und ES-CM (vgl. Pkt. 3.1.3, Abb. 17 und Tabelle 2) nicht als geeignete MNP herangezogen werden konnten. Die Toxizität hängt dabei von vielen verschiedenen Faktoren ab, wobei die Art der Hüllschicht einen wichtigen Faktor darstellt. So ist möglicherweise die Hüllschicht für die toxische Wirkung von PEI-Mag2 und NDT-Mag1 verantwortlich (siehe Tabelle 2). Von

PEI-Mag2, der mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet ist, ist schon aus anderen Studie für seine toxische Wirkung bekannt (Arsianti et al., 2010).

Im Hinblick auf eine intramyokardiale Injektion der MNP / MNP-beladenen Zellen ist auch eine geringe Partikelgröße essentiell, damit die sich bildenden MNP-Zell-Komplexe die Injektionsnadel ungehindert passieren können. Hierbei erfüllte SO-Mag5, aufgrund eines sehr geringen hydrodynamischen Partikeldurchmessers von  $40 \text{ nm} \pm 14$  im Vergleich zu PALD2-Mag1 ( $55 \text{ nm} \pm 11$ ), PEI-Mag2 ( $63 \text{ nm} \pm 36$ ) und TF-HES-Mag ( $90,5 \text{ nm} \pm 56$ ), die Anforderungen am besten (siehe Tabelle 2). Neben dem hydrodynamischen Partikeldurchmesser ist auch das der MNP essentiell. Angesichts der negativ-geladenen vaskulären Endothelschicht (Raz et al., 1988) kann durch einen ebenso negativ-geladenen MNP eine Anziehung zwischen MNP und Endothel vermieden werden. Aufgrund seiner positiven Ladung ( $+ 13,4 \text{ mV} \pm 1$ ) stellte PEI-Mag2 somit keine Option dar und TF-HES-Mag war wegen einer sehr geringen negativen Ladung ( $- 3,1 \pm 0,4$ ) zumindest für eine intravasale Gabe eher ungeeignet. SO-Mag5 brachte dagegen mit einem elektrokinetische Potential von  $-9,2 \text{ mV} \pm 0,4$  die besten Voraussetzungen für eine optimale Zellbeladung mit.

In der Zusammenschau der Befunde stellte sich SO-Mag5 als der am besten geeignete MNP für eine effektive Zellbeladung von eCM, ES-CM und BMC heraus und deshalb wurden alle weiteren Versuche mit diesem MNP durchgeführt.

**Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten MNP und ihre Beladungseffizienz**

MNP	Hüllschicht	Elektro-kinetisches Potential [mV]	Hydrodyn. Partikeldurchmesser [nm]	Beladung der Zellen	Toxizität
SO-Mag5	Siliziumoxid	$- 9,2 \pm 0,4$	$40 \pm 14$	ja	nein
PEI-Mag2	Polyethylenimin	$+ 13,4 \pm 1$	$63 \pm 36$	nein (BMC)	ja
NDT-Mag1	Nonandithiol	$- 7,5 \pm 1,3$	$42,6 \pm 6,2$	nein (BMC)	ja
PALD2-Mag1	Palmytoyldextran	$- 8,8 \pm 0,3$	$55 \pm 11$	ja	nein
TF-HES-Mag	Hydroxyethyl mit humanen Transferrin	$- 3,1 \pm 0,4$	$90,5 \pm 56$	ja	nein

### 3.1.2 Auswirkungen einer konzentrationsabhängigen SO-Mag5-Aufnahme auf die Magnetisierungseffizienz von Zellen

Entscheidend für eine lokale Anreicherung / Positionierung der MNP-beladenen Zellen ist eine ausreichende Magnetisierung der Zellen. Hierzu wurden zwei verschiedene SO-Mag5-Konzentrationen (20 und 200 pg Fe / Zelle) *in vitro* auf ihrer Magnetisierungseffizienz hin untersucht. Diese beiden Konzentrationen wurden in Rücksprache mit der Herstellerin der MNP, Frau Dr. Olga Mykhaylyk (Arbeitsgruppe von Prof. Plank, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München) gewählt, da Simulationen von Frau Dr. Mykhaylyk (hier nicht aufgeführt) zeigten, dass sich diese Konzentrationen am besten für eine optimale Magnetisierung der Zellen eignen würden, bei zugleich fehlender Toxizität.

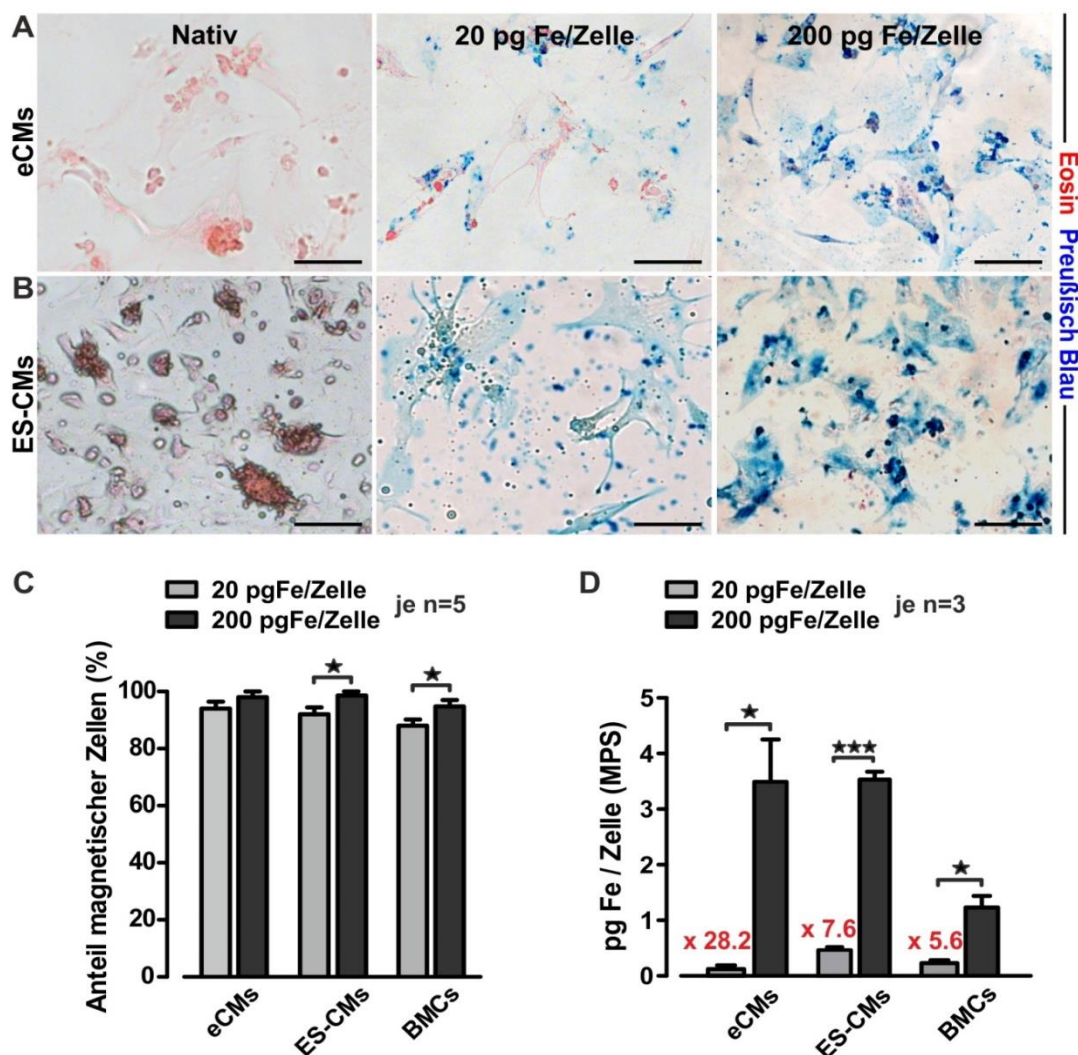
Mit Hilfe einer Preußisch Blau- (blau) und Eosin- (rot) Färbung konnte qualitativ eine konzentrationsabhängige Aufnahme der SO-Mag5-Partikel in das Zytoplasma von eCM (Abb. 16 A) und ES-CM (Abb. 16 B) nachgewiesen werden. Die Magnetisierungseffizienz wurde zum einen quantitativ durch Bestimmung des magnetischen Moments von SO-Mag5-beladenen eCM, ES-CM und BMC im Magnetständer sowie mittels MPS-Analysen verifiziert (Abb. 16 C). Hierzu wurden je  $1 \times 10^5$  eCM / ES CM und je  $5 \times 10^5$  BMC mit 20 und 200 pg SO-Mag5 / Zelle über Nacht beladen und in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, die jeweils mit 1 ml Medium gefüllt waren. Danach wurde das Reaktionsgefäße für 2 Minuten in den Magnetständer gestellt, der mit homogenen Quadermagneten ausgekleidet war (Abb. 7). Nachdem der Überstand entfernt wurde, konnte die Zellzahl der durch das Magnetfeld angezogenen Zellen bestimmt werden. So wurden unter Verwendung von 200 pg Fe / Zelle 98 % der eCM durch das homogene Magnetfeld angezogen, bei 20 pg Fe / Zelle waren es 94 % ( $p=0,242$ ). Auch SO-Mag5-beladene ES-CM und BMC wurden bei einer MNP-Konzentration von 200 pg Fe / Zelle signifikant häufiger durch das Magnetfeld angezogen, als nach einer Beladung mit einer zehnfach geringeren MNP-Konzentration (ES-CM: 20 pg SO-Mag5:  $92 \% \pm 2,49$ ; 200 pg SO-Mag5:  $98,67 \% \pm 1,33$ ;  $p=0,04$ ; BMC: 20 pg SO-Mag5:  $88,25 \% \pm 1,94$ ; 200 pg SO-Mag5:  $96 \% \pm 2,45$ ;  $p=0,03$ ).

MPS-Analysen von SO-Mag5-beladenen eCM demonstrierten bei einer Beladungskonzentration von 200 pg Fe / Zelle eine 28,2-fach erhöhte SO-Mag5-Aufnahme (20 pg SO-Mag5:  $0,124 \text{ pg Fe / Zelle} \pm 0,008$ ; 200 pg SO-Mag5:  $3,480 \text{ pg Fe / Zelle} \pm 0,765$ ;  $p=0,012$ ). Auch beladene ES-CM (20 pg SO-Mag5:  $0,466 \text{ pg Fe / Zelle} \pm 0,027$ ;

## Ergebnisse

200 pg SO-Mag5: 3,547 pg Fe / Zelle  $\pm$  0,205;  $p < 0,001$ ) und BMC (20 pg SO-Mag5: 0,223 pg Fe / Zelle  $\pm$  0,006; 200 pg SO-Mag5: 1,23 pg Fe / Zelle  $\pm$  0,205;  $p = 0,007$ ) wiesen eine 7,6- bzw. 5,6-fach signifikant erhöhte SO-Mag5-Aufnahmen unter Verwendung von 200 pg Fe / Zelle im Vergleich zu 20 pg Fe / Zelle auf (Abb. 16 D).

Somit führte eine zehnfach erhöhte MNP-Konzentration im Zellkulturmedium zu einer verbesserten MNP-Aufnahme und Magnetisierung von eCM, ES-CM und BMC. Diese Eigenschaft ist eine grundlegende Voraussetzung für eine spätere *in vivo*-Transplantation von SO-Mag5-beladenen Zellen unter Anwendung eines Magnetfeldes.



**Abbildung 16: MNP-Aufnahme von eCM, ES-CM und BMC**

(A, B) Preußisch Blau (blau) und Eosin Färbungen (rot) zeigen eine konzentrationsabhängige (20 und 200 pg Fe / Zelle) Aufnahme von SO-Mag5-Partikeln in das Zytoplasma von (A) eCM und (B) EC-CM. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. (C) Anteil magnetischer eCM, ES-CM (\* $p = 0,046$ ) und BMC (\* $p = 0,038$ ) im Magnetständer bei 20 und 200 pg Fe / Zelle (je  $n = 5$ ). (D) MPS-Messungen von SO-Mag5-beladenen eCM (\* $p = 0,012$ ), ES-CM (\*\*\* $p < 0,001$ ) und BMC (\* $p = 0,026$ ) unter Verwendung von 20 und 200 pg Fe / Zelle (je  $n = 3$ ).

### 3.1.3 Toxizitätsanalysen verschiedener MNP

Die Analyse des zytotoxischen Verhaltens von MNP auf die Zell-Vitalität ist unerlässlich. Dabei hängt die Toxizität der MNP sehr von den chemischen Eigenschaften, wie Oberflächenstruktur, der Form und der Größe der MNP ab (Cushing et al., 2004; Niemeyer, 2001). Um überprüfen zu können, welcher MNP die geringste toxische Wirkung auf die Zell-Vitalität ausübt, wurden Toxizitätsanalysen von MNP-beladenen eCM / ES-CM unter Verwendung eines LDH- und eines MTT-Tests durchgeführt. Dabei ist der LDH-Test ein *in vitro* anwendbarer Test, der eine Aussage über die Zytotoxizität einer Substanz, in diesem Fall der MNP, erlaubt. Das Prinzip beruht hierbei auf der Bestimmung der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand der Zellen, welche von beschädigten oder zerstörten Zellen freigesetzt wird (Raz et al., 1988). Daneben wird der von Mosmann 1983 beschriebene MTT-Test eingesetzt, um die Vitalität von Zellen untersuchen zu können. Dabei wird die Stoffwechselaktivität kultivierter Zellen bestimmt, indem die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen wird. Als MNP wurden SO-Mag5, PALD2-Mag1, PEI-Mag2 und NDT-Mag1 bei einer Konzentration von je 20 und 200 pg Fe / Zelle eingesetzt.

Sowohl beim LDH- (Abb. 17 A) als auch beim MTT-Test (Abb. 17 B) konnte bei allen vier untersuchten MNP beider Konzentration kein signifikant toxischer Effekt auf die Vitalität von eCM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (HBSS<sup>++</sup>: je 100 %) und zur Positivkontrolle (169 % ± 12,52) nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle dienten Zellen die durch Zugabe des Detergens Triton-X (1%) vollständig lysiert wurden. Nur im direkten Vergleich verdeutlichte ein Tukey-Post-Hoc-Test, dass sich eine PEI-Mag2 Konzentration von 200 pg Fe / Zelle gegenüber SO-Mag5-Partikeln gleicher Konzentration signifikant toxisch auf die eCM-Vitalität auswirkte (PEI-Mag2: 89,13 % ± 3,56; SO-Mag5: 102,9 % ± 5,37; p= 0,044, Abb. 17 B).

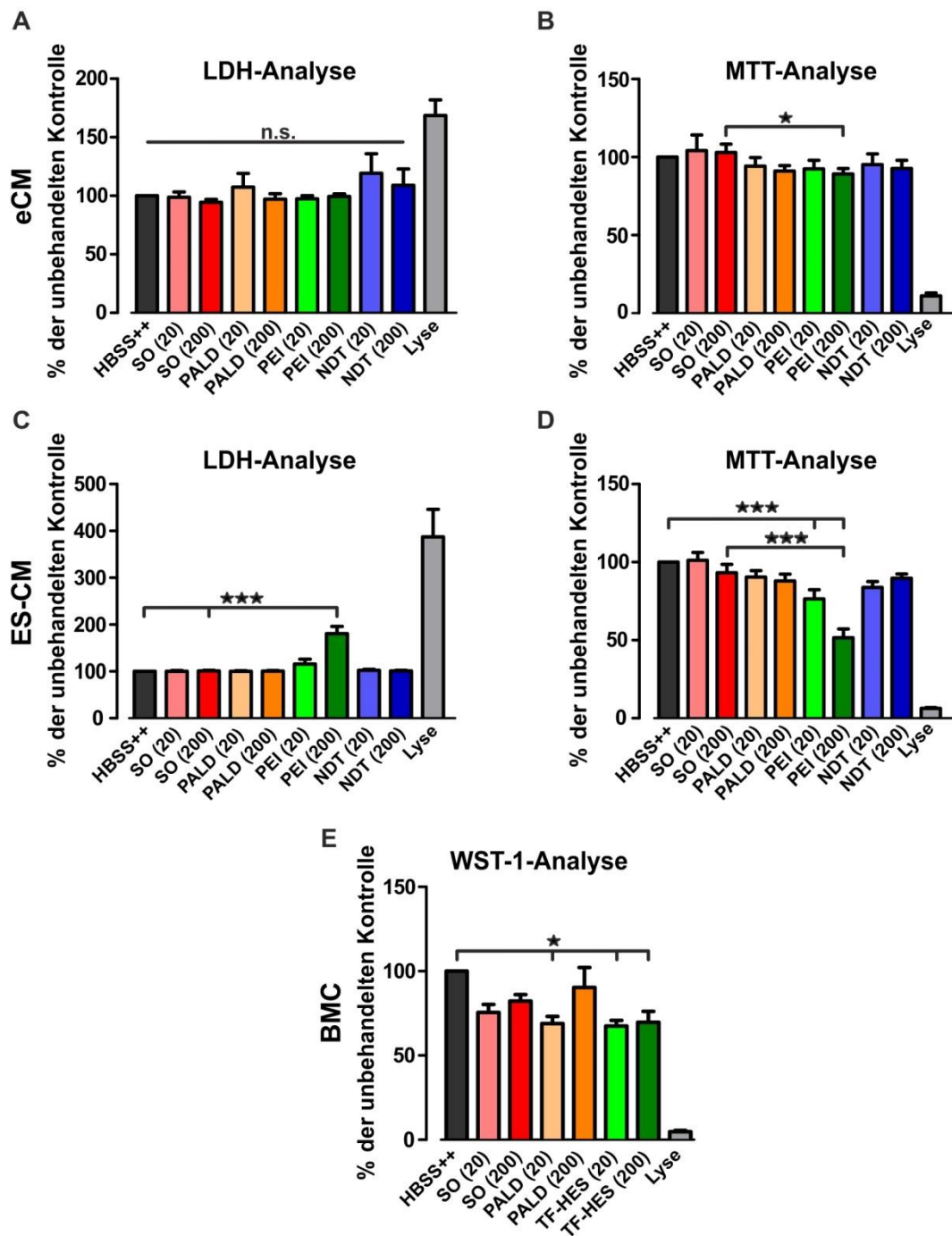
Bei den untersuchten ES-CM konnte in beiden Konzentrationen (20 und 200 pg Fe / Zelle), ebenso wie den eCM zuvor, ein signifikant toxischer Effekt einer PEI-Mag2-Beladung (200 pg Fe / Zelle) durch beide Analysemethoden (LDH: 180,6 % ± 15,28; p< 0,001; MTT: 51,52 % ± 5,61; p< 0,001) im Bezug zur Negativkontrolle (HBSS<sup>++</sup>) nachgewiesen werden (Abb. 17 C, D). Auch bei einer 10-fach geringer eingesetzten PEI-Mag2-Konzentration wies der MTT-Test im Vergleich zur Negativkontrolle einen signifikant toxischen Effekt auf die ES-CM-Vitalität auf (20 pg: 76,4 % ± 5,854; p< 0,01). Bei einer Zellbeladung mit den MNP

SO-Mag5, PALD2-Mag1 und NDT-Mag1 konnte dagegen keine erhöhte Toxizität in beiden Konzentrationen festgestellt werden. Im direkten Vergleich zwischen PEI-Mag2 (51,52 % ± 5,61) und SO-Mag5 (93,19 % ± 5,42) bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle zeigte die MTT-Analyse jedoch einen signifikant toxischen Unterschied auf ( $p < 0,001$ , Abb. 17 D).

Bei den verwendeten BMC erfolgte die Toxizitätsanalyse mit Hilfe des auf Suspensionszellen spezialisierten WST-1-Tests (Peskin und Winterbourn, 2000). Als MNP wurden SO-Mag5, PALD2-Mag1 und TF-HES-Mag untersucht. Nach einer Beladung mit SO-Mag5-Partikeln konnte bei beiden verwendeten Konzentrationen (20 pg: 75,28 % ± 4,79; 200 pg: 82,08 % ± 3,85) keine Zellschädigung nachgewiesen werden (Abb. 17 E). Allerdings wirkte sich eine BMC-Beladung mit PALD2-Mag1 bei einer Konzentration von 20 pg Fe / Zelle (68,63 % ± 4,35) sowie einer Beladung mit TF-HES-Mag in beiden Konzentrationen (20 pg: 67,13 % ± 3,43; 200 pg: 69,4 % ± 6,61) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (HBSS<sup>++</sup>) signifikant toxisch ( $p < 0,05$ ) auf die BMC-Vitalität aus.

Insgesamt konnte durch Einsatz verschiedener Toxizitätsanalysen gezeigt werden, dass SO-Mag5 im Vergleich zu anderen MNP wie beispielsweise PEI-Mag2 keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität von kardialen Adhärenten- (eCM und ES-CM) und hämatopoetischen Suspensionszellen (BMC) ausübt. Ein Grund hierfür könnte die Art der Hüllschicht sein. So ist SO-Mag5 mit Siliziumoxid (SO) und PEI-Mag2 mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet, welches sich bereits in anderen Studien toxisch auf die Zellvitalität auswirkte (Arsianti et al., 2010, vgl. auch Pkt. 3.1.1). Auch in der vorliegenden Arbeit wirkte sich eine PEI-Beschichtung bei allen verwendeten Zelltypen beider Konzentration signifikant toxisch aus.

Aufgrund seiner guten Zellverträglichkeit wurden daher alle weiteren Versuche mit SO-Mag5 bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle durchgeführt.



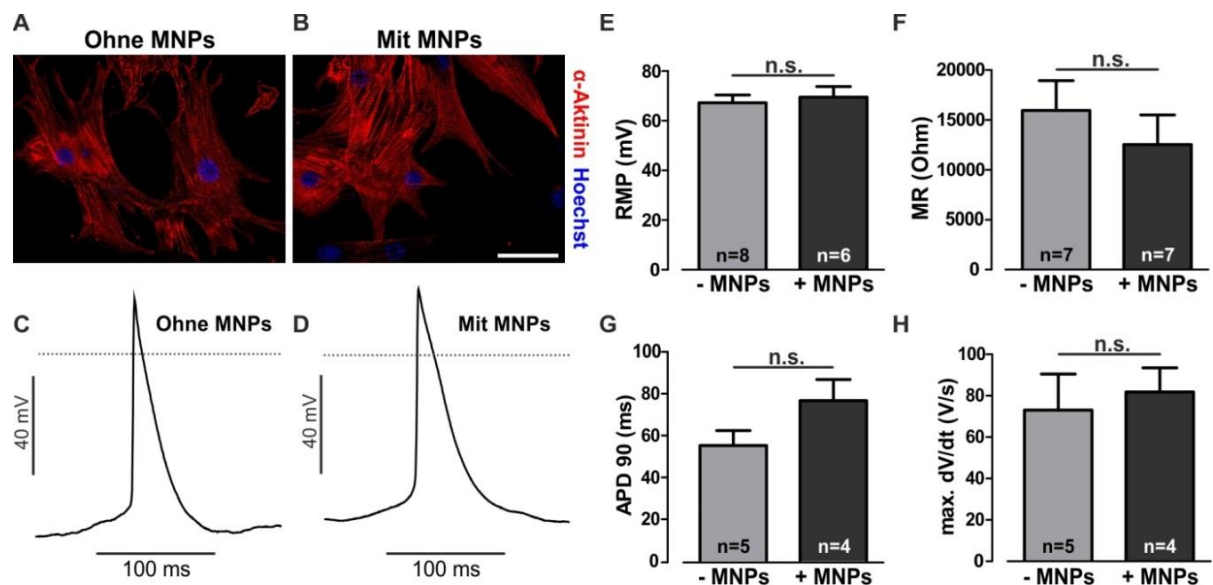
**Abbildung 17: Toxizitätsanalysen verschiedener MNP**

Bestimmung der Toxizität verschiedener MNP bei der Beladung von eCM, ES-CM und BMC unter Verwendung zweier MNP-Konzentrationen [(20) = 20 pg Fe / Zelle; (200) = 200 pg Fe / Zelle]. Bei eCM und ES-CM wurden jeweils eine LDH-Analyse (A, C) und eine MTT-Analyse (B, D) durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde HBSS<sup>++</sup> verwendet, als Positivkontrolle dienten lysierte Zellen der jeweiligen Zellgruppe sowie DMSO. Zusätzlich wurden Kontrollen ohne Farbstoff durchgeführt. (B: \*p= 0,044; C, D: \*\*\*p< 0,001) (E) Toxizitätsanalysen der Suspensionszellen (BMC) erfolgten mit einem WST-1-Test; \*p< 0,05. Jeweils N = 4 (Anzahl der Versuchsdurchgänge), n = 4 (Anzahl der analysierten Wells). SO = SO-Mag5, PALD = PALD2-Mag1, PEI = PEI-Mag2, NDT = NDT-Mag1, TF-HES = TF-HES-Mag.

### 3.1.4 Elektrophysiologische Charakterisierung von SO-Mag5-beladenen eCM

Um die Auswirkungen einer MNP-Beladung auf die Zellvitalität weiter untersuchen zu können, wurden Patch-Clamp-Analysen von unbeladenen (nativen) und SO-Mag5-beladenen eCM bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle in Kooperation mit Dr. Tobias Brüggmann (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) durchgeführt. Hierdurch sollte die elektrophysiologische Beschaffenheit der Zellen mit und ohne MNP-Beladung untersucht und verglichen werden. Die Patch-Clamp-Technik als elektrophysiologische Messmethode eignet sich besonders zur Klärung dieser Fragestellung, da sich hierbei Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle in der Zellmembran einer Zelle darstellen und charakterisieren lassen. Als Parameter wurden dabei das Ruhemembranpotential (RMP), der Membranwiderstand (MR), die Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolarisation (APD 90) sowie die Geschwindigkeit der Spannungsänderung (max. dV/dt) gemessen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Beladung mit MNP keinen Einfluss auf die Ionenleitfähigkeit sowie die Leckstrom-Aktivität von SO-Mag5-beladenen eCM gegenüber unbeladenen eCM hat, da das RMP (Abb. 18 E; - MNP:  $67,24 \text{ mV} \pm 3,13$ ; + MNP:  $69,52 \text{ mV} \pm 4,25$ ,  $p=0,66$ ), der MR (Abb. 18 F; - MNP:  $15\,935 \text{ Ohm} \pm 2997$ ; + MNP:  $12\,532 \text{ Ohm} \pm 2962$ ,  $p=0,435$ ), die ADP 90 (Abb. 18 G; - MNP:  $56,75 \text{ ms} \pm 7,28$ ; + MNP:  $78,73 \text{ ms} \pm 10,31$ ,  $p=0,116$ ) sowie die max. dV/dt (Abb. 18 H; - MNP:  $73,03 \text{ V/s} \pm 17,45$ ; + MNP:  $81,83 \text{ V/s} \pm 11,65$ ,  $p=0,705$ ) keine signifikanten Veränderungen zwischen MNP-beladenen und unbeladenen eCM aufzeigten. Auch in der Morphologie der eCM (Abb. 18 A, B) und in der Dauer der Aktionspotentiale (Abb. 18 C, D) konnten keine Veränderungen nach einer MNP-Beladung der Zellen im Vergleich zu unbeladenen eCM nachgewiesen werden.





**Abbildung 18: Patch-Clamp-Analysen von SO-Mag5-beladenen eCM**

Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen und schematische Darstellung zweier Aktionspotentiale (Haltepotential: 40 mV) von unbeladenen (A, C) und SO-Mag5-beladenen (B, D) eCM unter gleichen Kulturbedingungen. Blau: Kernfärbung mittels Hoechst; Rot:  $\alpha$ -Aktinin-Färbung; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. Die gestrichelte Linie markiert den Bereich um 0 mV. Dargestellt sind das Ruhemembranpotential (RMP, E), der Membranwiderstand (MR, F), die Aktionspotential-Dauer bei 90 % der Repolarisation (APD 90, G) sowie die Geschwindigkeit der Spannungsänderung (max. dV/dt, H). Bei allen vier Parametern besteht kein signifikanter Unterschied (E:  $p=0,66$ ; F:  $p=0,435$ ; G:  $p=0,116$ ; H:  $p=0,705$ ) zwischen SO-Mag5-beladenen (+ MNP) oder unbeladenen (- MNP) eCM.

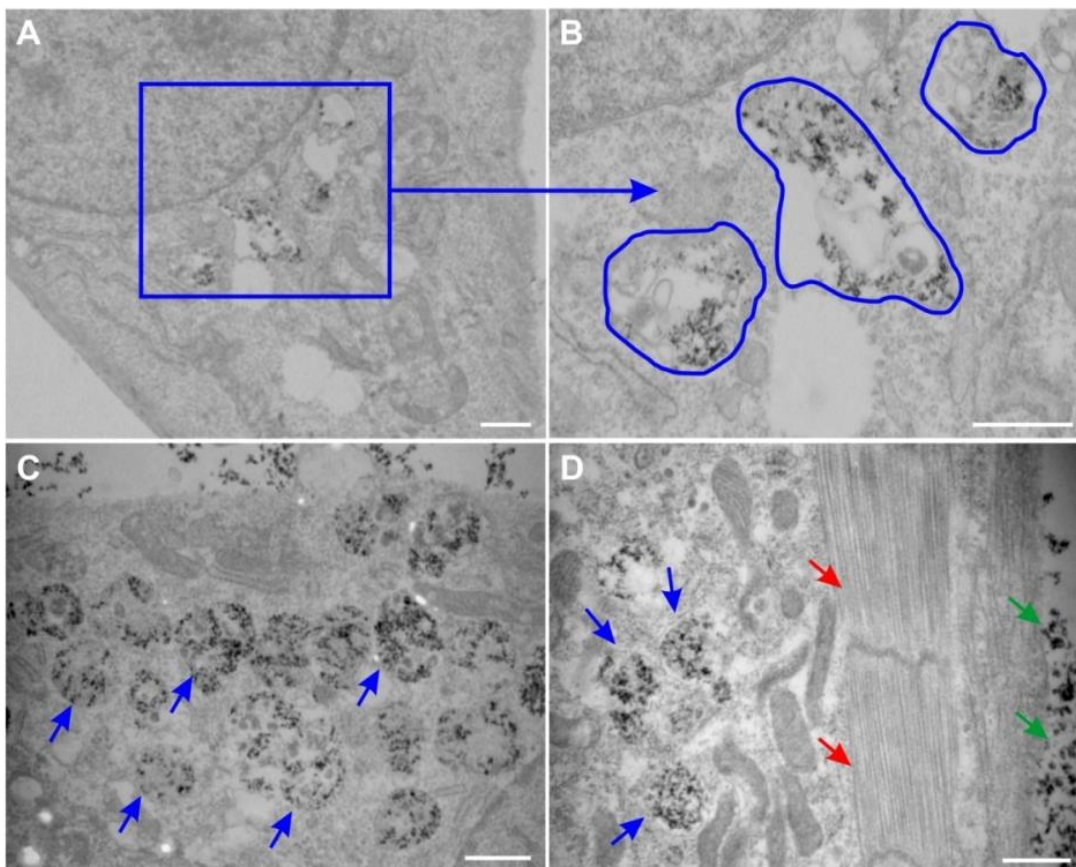
### 3.1.5 Zelluläre Integration von SO-Mag5-Partikel

Neben der Toxizität ist auch der Verbleib / die Ablagerung der MNP in der Zelle von großem Interesse. Elektronenmikroskopische (EM) Aufnahmen in Kooperation mit Herrn Prof. Bloch (Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln) ermöglichten die Lokalisierung der MNP innerhalb der Zelle. Abbildung 19 zeigt repräsentative EM-Aufnahmen einer mit SO-Mag5-Partikeln beladenen embryonalen Kardiomyozyte. Die MNP-Beladung erfolgte *in vitro* bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle über Nacht und die eCM wurden 24 Stunden nach der Beladung für eine elektronenmikroskopische Analyse fixiert.

Die EM-Aufnahmen zeigen deutliche Eisenablagerungen im Zytoplasma der Zelle (Abb. 19 A). Eine stärkere Vergrößerung (Abb. 19 B) illustriert die zelluläre Integration der MNP. Schon seit einigen Jahren ist bekannt, dass MNP von vielen verschiedenen Zelltypen aufgenommen werden können (Chithrani und Chan, 2007; Gratton et al., 2008; Takenaka et al., 2006; Wottrich et al., 2004). Trotz dieser zahlreichen Studien, die sich mit den Wechselwirkungen

von Nanopartikeln und Zellen und der daraus folgenden Partikelaufnahme beschäftigt, ist über die Kinetik der MNP-Aufnahme und die genauen Mechanismen noch wenig bekannt. Auffällig ist, dass die SO-Mag5-Partikel nicht frei im Zytosol vorliegen, sondern sich in sogenannten Autophagosomen (blaue Umrandung) einkapseln. Diese sind in großer Anzahl dicht aufeinander gereiht im Zytoplasma der Zelle (Abb. 19 C, blaue Pfeile) erkennbar. Daneben sind auch einzelne SO-Mag5-Partikel außerhalb der Zelle nachzuweisen (Abb. 19 D, grüne Pfeile). Das Zytoskelett der Zellen (rote Pfeile) sowie Zellorganellen erscheinen durch die MNP-Beladung nicht beeinträchtigt oder verändert zu sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die MNP von der Zelle aufgenommen und in Autophagosomen einkapseln sind.



**Abbildung 19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen intrazellulärer SO-Mag5-Partikel**

(A, B) Repräsentative elektronenmikroskopische Aufnahmen einer mit SO-Mag5-beadeten embryonalen Kardiomyozyte (über Nacht, *in vitro*) unter Verwendung von 200 pg Fe / Zelle. (A) Übersichtsaufnahme und (B) Detailaufnahme einer eCM zeigen SO-Mag5-Partikel innerhalb des Zytoplasmas vorliegend, eingekapselt in Autophagosomen (blaue Umrandung). (C) Die Autophagosomen (blaue Pfeile) liegen innerhalb der Zelle in großer Anzahl vor. (D) Das Zytoskelett (rote Pfeile) der Zelle sowie die Zellorganellen erscheinen intakt und werden von Autophagosomen (blaue Pfeile) umgeben. Außerhalb der Zelle sind einzelne MNP erkennbar (grüne Pfeile). Maßstabsbalken: je 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.6 Lokale Zellpositionierung *in vitro*

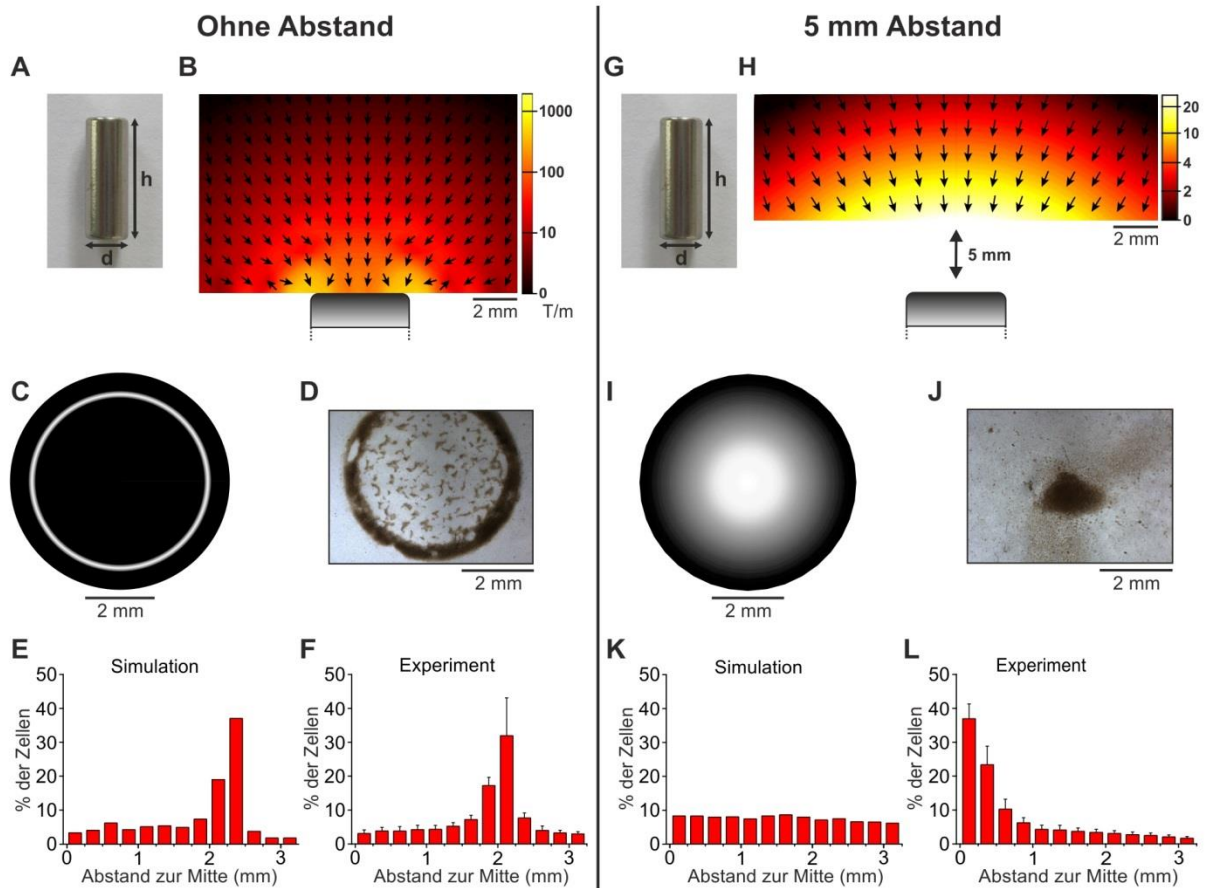
Um die MNP-beladenen Zellen möglichst lokal, auf das Herzinfarktareal begrenzt, positionieren zu können, musste die Anziehungskraft und Zellverteilung des zu verwendenden Magnetfeldes im Vorfeld überprüft werden. Kilgus et al., 2012 konnten bereits in Magnet basierten Zell-Positionierungsversuchen zeigen, dass sowohl der Durchmesser als auch die Form verschiedener Permanentmagnetspitzen entscheidend für die Verteilung der angezogenen MNP-beladenen Zellen sind. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Magnet-basierte Positionierungsversuche mit SO-Mag5-beladenen BMC (200 pg Fe / Zelle) durchgeführt, um die Zellverteilung *in vitro* untersuchen zu können. In Anlehnung an Cheng et al., 2010 wurde hierbei die Anziehungskraft und Zellverteilung eines im Durchmesser nur 5 mm breiten und 14 mm langen 1,3 Tesla Stabmagneten eruiert (Abb. 20 A, G). Dieser Magnet zeichnet sich besonders durch seine geringe Größe und zugleich starkes magnetisches Moment aus. Diese Eigenschaften sind essentiell für eine *in vivo*-Anwendung in der Maus, genauer gesagt für eine Magnet-basierte intramyokardiale Zellinjektion, aufgrund des sehr kleinen Operationsfeldes (Thorakotomie: 1,5 cm; Abb. 10 E). Um nun die Zellverteilung in Abhängigkeit vom magnetischen Feld bestimmen zu können, wurden zwei verschiedene Ansätze untersucht. Im ersten Experiment wurde der Stabmagnet direkt (ca. 200  $\mu\text{m}$ ) unter einer Zellkulturschale mit SO-Mag5-beladene BMC platziert (Abb. 20 B, linke Spalte „Ohne Abstand“). Im zweiten Versuchsansatz wurde der Magnet in einem Abstand von 5 mm zentral unter der Schale ausgerichtet (Abb. 20 H, rechte Spalte), Beide Ansätze entsprechen möglicher intraoperativen Bedingungen einer intramyokardialen Zellinjektion *in vivo*. Der gesamte Aufbau wurde auf einem Horizontalschüttler für 16 Minuten bei 100 Zyklen / min geschüttelt und für die qualitative und quantitative Analyse der Zellverteilung erfolgten Hellfeldaufnahmen (Abb. 20 D, J). Hieran konnte festgestellt werden, dass sich die MNP-beladenen BMC bei einer direkten Magnetfeldapplikation ringförmig in einem Durchmesser von 4 mm in der Zellkulturschale ansammeln (Abb. 20 D). Im Vergleich dazu akkumulierten die Zellen bei einem Magnetabstand von 5 mm lokal in einem geringeren Durchmesser (2 mm) in der Mitte der Schale (Abb. 20 J). Quantifizierungen über die Verteilung der Zellen in der Zellkulturschale (durchgeführt wie bei Kilgus et al., 2012) bestätigten die qualitativen Befunde (Abb. 20 F, L). Diese unterschiedlichen Zellakkumulationen lassen sich durch den magnetischen Flussdichtegradienten erklären, der sich je nach Positionierung des Magneten unterschiedlich darstellt (Abb. 20 B, H). So

befinden sich bei einer direkten Magnetfeld-Anlagerung an die Zellkulturschale die stärksten Gradienten an der äußeren Kante (Abb. 20 B, dunkel gelbe Areale). Mit zunehmender Entfernung verteilt sich der magnetische Flussdichtegradient über die ganze Fläche des Stabmagneten und schwächt sich zudem ab (Abb. 20 H, hell gelbe Areale).

Zusätzlich zu den experimentellen Versuchen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gleich (Zentralinstitut für Medizintechnik, IMETUM, Technische Universität München) zu beiden Versuchsansätzen numerische Simulationen über die Zellverteilung durchgeführt und diese dann mit der experimentellen Zellverteilung verglichen. Bei einer direkten Magnetfeld-Applikation bestätigte die simulierte Zellverteilung (Abb. 20 C, E) die zuvor beschriebenen experimentellen Ergebnisse (Abb. 20 D, F), d.h. auch die Kalkulation ergab, dass die Zellen ringförmig in einem Durchmesser von 4 mm in der Zellkulturschale akkumulieren.

Auch bei einem Magnetabstand von 5 mm stimmten Simulation und Experiment überein (Abb. 20 I, J). Lediglich in der simulierten Verteilung der Zelldichte in zunehmenden Abstand zum Zentrum der Magnetspitze konnte ein Unterschied festgestellt werden. So zeigte die Simulation eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen in der Zellkulturschale über eine Fläche von mehr als 6 mm auf (Abb. 20 I, K), wohingegen im Experiment eine lokale Ansammlung der Zellen in einem Durchmesser von 2 mm ermittelt werden konnte (Abb. 20 L). In Rücksprache mit der AG Gleich können für diese Abweichung gleich mehrere Faktoren verantwortlich sein, wie z.B. Abweichungen in der Zellzahl, geringste Veränderungen in der Schüttelgeschwindigkeit der Apparatur und die Schwerkrafteinwirkung auf die MNP-beladenen Zellen. Ausschlaggebend für die *in vivo* Versuche sind jedoch die experimentellen Ergebnisse, sodass die geringe simulierte Abweichung vernachlässigt werden kann.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass unter Verwendung eines 1,3 Tesla Stabmagneten rechnerisch ein 5 mm Abstand des Magneten zur Herzoberfläche nötig war, um eine flächige Verteilung der MNP beladenen Zellen zu erreichen. Aus diesem Grund wurden alle *in vivo* Experimente, d.h. die intramyokardiale Injektion von MNP-beladenen Zellen unter Magneteinsatz, in einem Abstand von 5 mm zum Herzen durchgeführt. Aufgrund des räumlich eingeschränkten Operationsfeldes der Maus bei den *in vivo* Experimenten, konnte ein Magnetabstand von 5 mm für eine lokale Zellpositionierung hervorragend genutzt und umgesetzt werden (siehe 2.3.2, Abb. 10 E).

Zellpositionierung *in vitro*

**Abbildung 20: Lokale Zellpositionierung von BMC unter Verwendung eines 5 mm Stabmagneten ohne (A - F) und mit 5 mm Abstand (G - L) zur Zellkulturschale**

(A, G) Darstellt ist der Stabmagnet ( $h = 14$  mm,  $d = 5$  mm). (B, H) Absolute Werte (Farbskala) und Ausrichtungen (Pfeile) des magnetischen Flussdichtegradienten im Durchschnitt zur Symmetrieebene. (C, I) Verteilung der Zellen kalkuliert anhand der Simulation (Intensität kennzeichnet die Menge der Zellen). (D, J) Lokale Zellansammlung von repräsentativen Experimenten. Verteilung der simulierten (E, K) und der relativen (F, L) Zelldichte in zunehmenden Abständen zum Zentrum der Magnetspitze (F:  $n = 4$ , L:  $n = 4$ ).

### 3.2 Intramyokardiale Injektion von MNP-beladenen Zellen mit und ohne Magnetfeld-Applikation *in vivo*

#### 3.2.1 Biolumineszenz-Analysen zur Detektion des Zellschicksals nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnet-Applikation

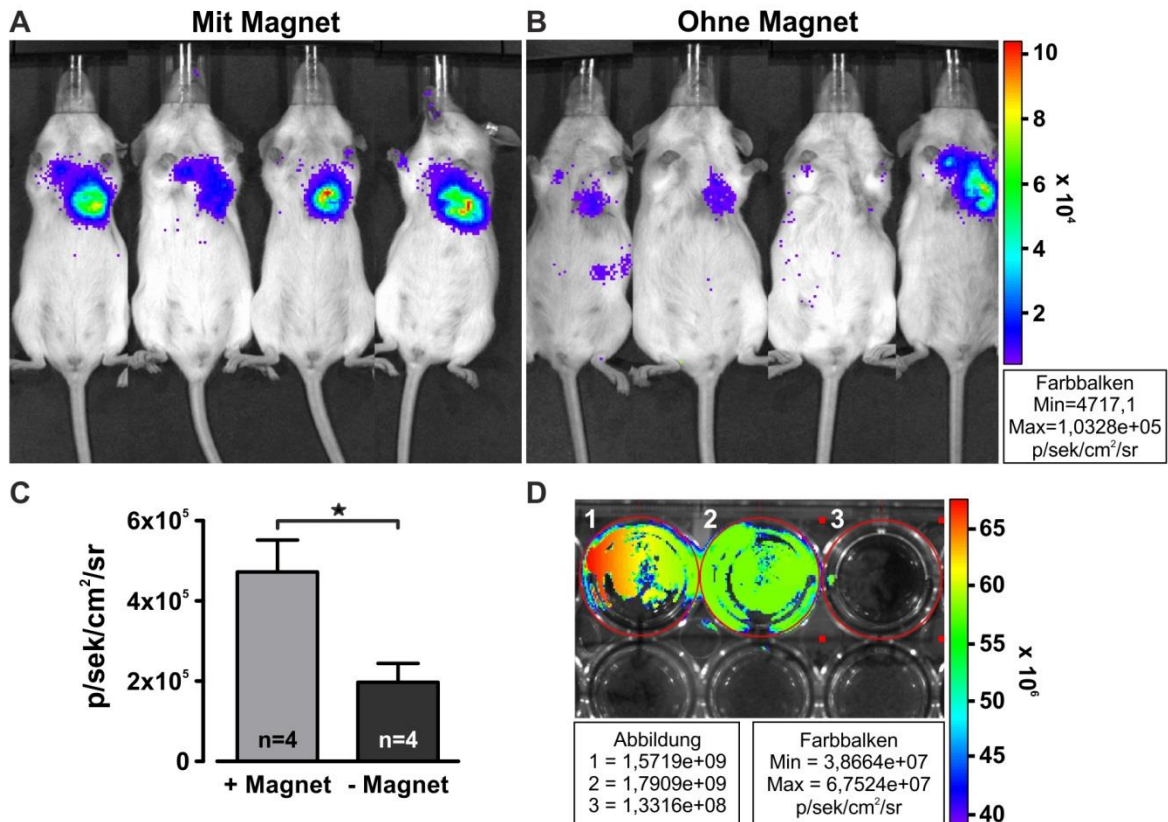
Für die Identifizierung und Detektion der intramyokardial transplantierten Zellen im Zeitverlauf *in vivo* wurden Biolumineszenz-Analysen durchgeführt. Hierzu erfolgte vor der

Zellinjektion in das kryoinfarzierte Myokard eine lentivirale Transduktion der verwendeten eCM mit dem Luciferase-Virus rrl-CMV-veffLuc *in vitro*. Für die Visualisierung des Biolumineszenz-Signals wurde den Mäusen vor der Messung im IVIS-System D-Luciferin i.p. verabreicht, um über die bei der Umsetzung des Luciferins frei werdenden Photonen das Zellsignal *in vivo* nachweisen und lokalisieren zu können. Vor der Applikation der lentiviral behandelten eCM wurde zunächst die Transduktionseffizienz des Lentivirus (LVs) *in vitro* überprüft. Hierzu wurden eCM (jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen pro Well) mit dem Luciferase-Virus transduziert und das Biolumineszenz-Signal im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (eCM ohne Transduktion) 48 Stunden nach der Transduktion detektiert. In Abbildung 21 D ist deutlich ein Biolumineszenz-Signal nach der Zell-Transduktion in Schale 1 und 2 gegenüber der Negativkontrolle in Schale 3 erkennbar.

Ebenso zeigt Abbildung 21 Biolumineszenz-Aufnahmen 7 Tage nach der Transplantation von Luciferase-transduzierten SO-Mag5-beladenen eCM ( $2,5 \times 10^5$  / Maus, 200 pg Fe /Zelle) in ein zuvor kryoinfarziertes Myokardareal mit und ohne Magnet-Applikation. Da die Intensität des zu detektierenden Signals dabei von der umgesetzten Substratmenge abhängig ist, weist ein höheres Biolumineszenz-Signal auf eine höhere Zellintegration hin. Repräsentative Aufnahmen illustrieren anschaulich eine höhere Biolumineszenz-Intensität bei Tieren, bei welchen eine Zellinjektion unter Applikation eines Magnetfeldes durchgeführt wurde, im Vergleich zu Tieren ohne Magnetanwendung (Abb. 21 A, B). Lediglich bei einer Maus in der „ohne Magnet“-Gruppe konnte im Vergleich zur „mit Magnet“-Gruppe ein annähernd gleichwertiges Zellintegrationsrate gesehen werden (Abb. 21 B, Maus ganz rechts).

Die Quantifizierung der Biolumineszenz-Signale bestätigte den optischen Eindruck (Abb. 21 C). So wurde unter Magnetfeld-Applikation durchschnittlich ein Biolumineszenz-Signal von  $472\,200 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr} \pm 79\,290$  eruiert, wohingegen ohne Magnet signifikant weniger Luciferase-Aktivität ( $197\,100 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr} \pm 46\,890$ ;  $p=0,024$ ) nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse konnten auch durch Fluoreszenzanalysen zur Bestimmung der integrierten Zellzahl im Myokard an den am Versuchsende entnommen Herzen bestätigt werden (vgl. 3.2.3, Abb. 23).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass durch Einsatz eines Magnetfeldes während der Zellinjektion deutlich mehr SO-Mag5-beladene eCM im Myokard zurückgehalten werden können, im Vergleich zu einer herkömmlichen Zelltransplantation ohne Magneteinwirkung und sich dieser Effekt bei einer Vielzahl von Tieren (> 80%) konstant reproduzieren ließ.



**Abbildung 21: Nachweis Luciferase-exprimierender eCM anhand des Biolumineszenz-Signals nach Injektion des Substrates D-Luciferin**

Biolumineszenz-Aufnahmen 7 Tage nach der Transduktion von eCM mit dem Luciferase-Virus rrl-CMV-veffLuc und intramyokardialer Injektion in ein zuvor kryofarziertes Myokardareal *in vivo*. Nach Applikation eines Stabmagneten (A) während und 10 Minuten nach der Zelinjektion, konnte qualitativ (A) und quantitativ (C) ein signifikant stärkeres Biolumineszenz-Signal eruiert werden, als ohne Magnetfeld [(B), jeweils n = 4; p = 0,024]. (D) Transduktionskontrolle nach 48 Stunden *in vitro*: im 1. und 2. Well wurden eCM (je  $3 \times 10^4$  Zellen pro Well) mit dem o.g. Luciferase-Virus transduziert. Im 3. Well befindet sich die Negativkontrolle ohne Zelltransduktion.

### 3.2.2 Auswirkungen der Applikationsdauer des Magnetfeldes auf die Zellintegration

Um die optimale Magnetwirkung bei einer gleichzeitig möglichst geringen operativen Belastung (bedingt durch eine kurze Operationsdauer und Luxation des Herzens) sicherzustellen, musste die am besten geeignete Applikationsdauer des Stabmagneten während der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen Zellen eruiert werden. Hierzu wurde in Anlehnung an Cheng et al., 2010 eine 5-, 10- und 30-minütige Magnetfeld-Anwendung untersucht. Im Experiment wurden hierzu je  $2,5 \times 10^5$  eCM mit SO-Mag5-Partikeln bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle beladen und jeweils unter

den drei zu untersuchenden Magnetzeiten intramyokardial injiziert. In Abbildung 22 A sind die Auswirkungen der verschiedenen Applikationszeiten auf die Zellintegrationsrate 14 Tage postoperativ in repräsentativen Aufnahmen dargestellt. Hier zeigte sich bereits makroskopisch anhand der nativen eGFP-Fluoreszenz der injizierten Zellen, dass eine 10-minütige Magnetzeit im Vergleich zu einer 5- und 30-minütigen Applikationsdauer die beste Zellintegration bewirkte. Wurde der Stabmagnet für 10 Minuten über dem Myokard positioniert, so integrierten signifikant mehr Zellen in die Myokardläsion ( $16\,452 \text{ Zellen} \pm 2421$ ), als bei einer 5-minütigen Zeitspanne ( $1707 \text{ Zellen} \pm 553$ ,  $p < 0,001$ ) oder ohne Magnetfeld-Applikation ( $2282 \text{ Zellen} \pm 373$ ,  $p < 0,01$ , Abb. 22 B). Eine Verlängerung der Magnetfeld-Applikationszeit auf 30 Minuten erbrachte keinen weitere Zunahme der Zellintegrationsrate ( $9068 \text{ Zellen} \pm 131$ ) und wirkte sich eher negativ auf das Überleben der Tiere aus (Sterberate: 65%). Auffällig ist, dass sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) in der integrierten Zellzahl zwischen einer 5-minütigen Magnetzeit und einer Injektion ohne Magnetfeld ergibt (Abb. 22 B).

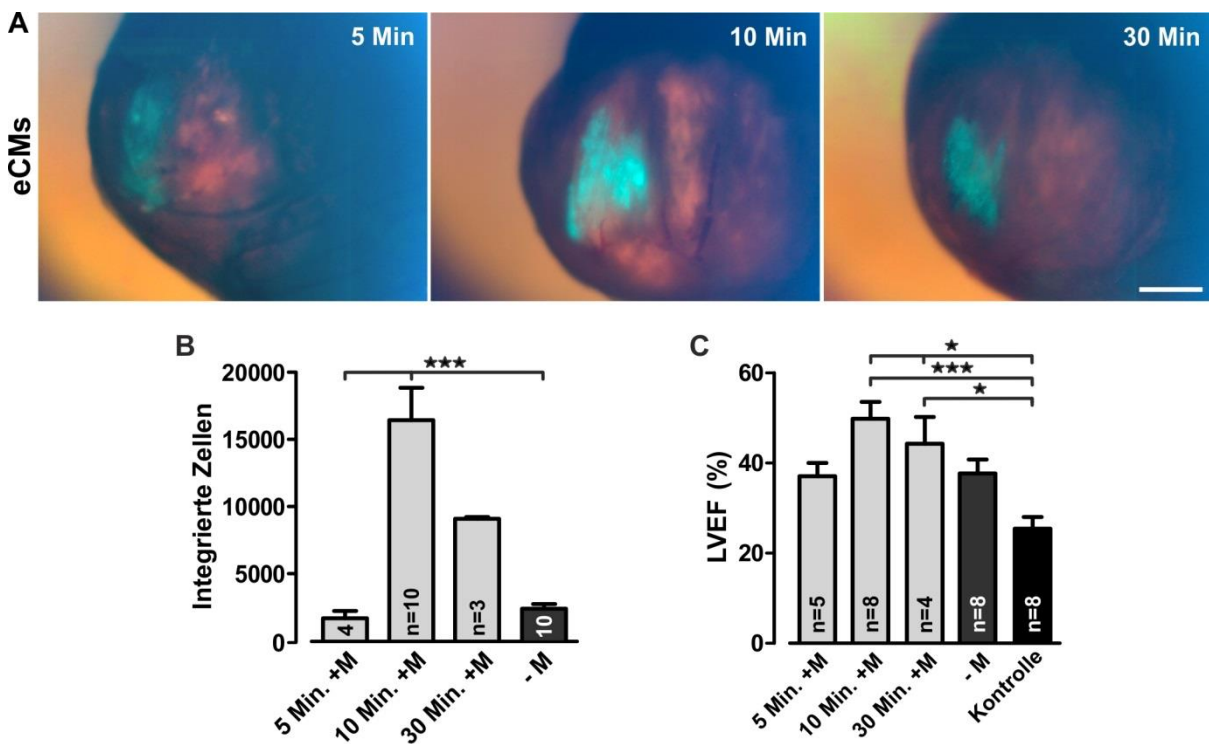
Neben der quantitativen Analyse der integrierten Zellzahl konnten auch Veränderungen in der Herzfunktion anhand von *in vivo* erhobenen LHK-Daten für die verschiedenen Magnetfeld-Applikationszeiten verifiziert werden. Als hämodynamischer Parameter wurde hierbei die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) gewählt, bei der sich signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen einstellen (Abb. 22 C). So erreichten Tiere mit einer 10-minütigen Magnetapplikationsdauer signifikant höhere LVEF-Werte ( $49,78 \% \pm 3,77$ ) als Tiere ohne Magnetfeld-Anwendung ( $37,73 \% \pm 3,08$ ;  $p < 0,05$ ) sowie Tiere der kryoinfarzierten, aber unbehandelten Kontrollgruppe ( $25,54 \% \pm 2,61$ ;  $p < 0,001$ ). Dieser Effekt stellte sich ebenso bei einer 30-minütigen Magnetanwendung ein, da sich auch hier die LVEF mit einem Wert von  $44,21 \% \pm 5,97$  dem Wert einer 10-minütigen Magnetzeit annäherte und sich die LVEF im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbesserte ( $p < 0,05$ , Abb. 22 C).

Gegenüber einer 5-minütigen Behandlung ( $37,04 \% \pm 2,93$ ) konnte auch bei einer 10-minütigen Magnetfeld-Applikationsdauer eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$ ) der LVEF nachgewiesen werden. Die LVEF war allerdings zwischen einer 10- und 30-minütigen Anwendung statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 22 C). Darüber hinaus konnte bei einer 30-minütiger Applikation eine erhöhte Mortalitätsrate (ca. 35 %) gegenüber einer 10-minütigen Behandlung (ca. 5 %) festgestellt werden. Ursache hierfür waren zum einen der deutlich längere operative Eingriff, zum anderen die permanente Luxation des Herzens



auf dem antimagnetischen Löffel ( $\varnothing$ : 5 mm), um eine optimale Ausrichtung des Herzens zum Stabmagneten hin gewährleisten zu können.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nur eine 10-minütige Stabmagnet-Applikationsdauer während der intramyokardialen Zellinjektion gleichzeitig zu einer deutlich verbesserten Zellintegrationsrate sowie zu einer verbesserten Kontraktilität des Myokards bei geringer Mortalitätsrate führte. Infolgedessen wurden alle weiteren Experimente mit einer 10-minütigen Magnetfeld-Anwendung durchgeführt.



**Abbildung 22: Auswirkungen der Applikationsdauer des Magnetfeldes auf die Zellintegrationsrate von eCM sowie die linksventrikuläre Funktion**

(A) Repräsentative Aufnahmen kryoinfarzierter Herzen nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) 14 Tage postoperativ. Die Transplantation erfolgte unter 5-, 10- und 30-minütiger Applikation des Stabmagneten. Maßstabsbalken: 1mm. (B) Quantitative Analyse der zellulären Integration für jede Magnetfeld-Applikationsdauer im Vergleich zu einer Zellinjektion ohne Magnetfeld (5 Min: n = 4; 10 Min und - M: n = 10; 30 Min: n = 3). (C) LVEF ermittelt für alle Applikationszeiten sowie für ohne Magnet und die Kontrollgruppe 14 Tage postoperativ (kryoinfarzierte Herzen ohne Zellinjektion; 5 Min: n = 5; 10 Min: n = 8, 30 Min: n = 4, - M: n = 8, Kontrolle: n = 8; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). „+ M“ = mit Magnet, „- M“ = ohne Magnet.

### **3.2.3 Quantitative Analyse der integrierten Zellen im Myokard**

Aufgrund der hohen Versuchstieranzahl ( $n > 50$ ), bedingt durch verschiedene Versuchsansätze und Fragestellungen, konnte eine Quantifizierung mittels Auszählung der eGFP<sup>+</sup>-Zellen im gesamten Infarktbereich nicht geleistet werden. Deshalb wurde wie im Methodenteil bereits beschrieben (vgl. 2.7.4.1) in Kooperation mit Jun.-Prof. Dr. Philipp Sasse (Institut für Physiologie I, Universität Bonn) eine Methode etabliert, mit welcher über die Oberflächenfluoreszenz im Infarktbereich der explantierten Herzen eine Quantifizierung der intramyokardial integrierten eGFP<sup>+</sup>-Zellen ermöglicht werden konnte.

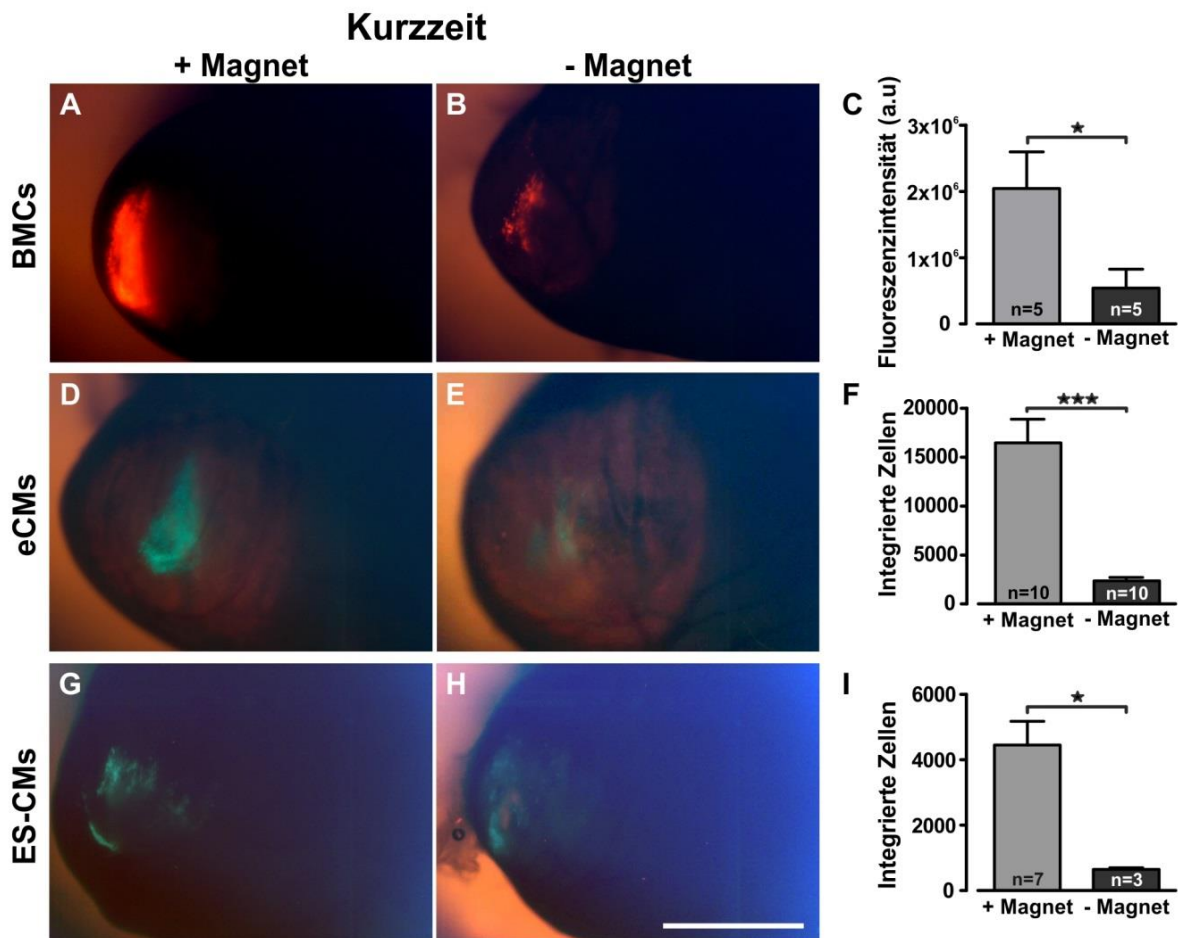
### **3.2.4 Kurzzeit-Effekte nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen Zellen mit und ohne Magnetfeld-Applikation auf die Zellintegrationsrate**

Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine zelluläre Kardiomyoplastie zu einer Verbesserung der Herzfunktion, sowie zu einer erhöhten Überlebensrate bei Mäusen nach einem myokardialen Infarkt führt (Roell et al., 2002a). In den nachfolgend beschriebenen Versuchen sollte nun untersucht werden, ob durch den Einsatz von MNP in Kombination mit einem geeigneten magnetischen Feld, die Überlebens- und Integrationsrate der intramyokardial injizierten Zellen weiter gesteigert werden kann und ob sich dies auch in einer verbesserten Hämodynamik widerspiegelt.

Um dies überprüfen zu können, wurden BMC, eCM und ES-CM (je  $2,5 \times 10^5$  / Maus) mit SO-Mag5-Partikeln bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle über Nacht *in vitro* beladen und jeweils in die zuvor kryoinfarzierte (3,5 mm Läsion), linke ventrikuläre Myokardwand von CD1-WT Mäusen injiziert. Während und 10 Minuten nach der Injektion wurde ein 1,3 Tesla Stabmagnet ( $\varnothing$ : 5 mm) in einem Abstand von ca. 5 mm über dem schlagenden Herz ausgerichtet. In Kontrolltieren wurden die MNP-beladenen Zellen ohne Magnetfeld injiziert. Bei der Herzentnahme ließen sich die Grenzen des kryoinfarzierten Areal aufgrund des Läsionsmechanismus makroskopisch leicht detektieren. Dabei stellte sich die transmurale Narbe deutlich heller dar, als das native Gewebe sowie die nativ-fluoreszierenden, transplantierten Zellen. Abbildung 23 zeigt repräsentativ für jeden Zelltyp eine Fluoreszenzaufnahme mit und ohne Magnetfeld-Applikation 14 Tage nach der intramyokardialen Transplantation. Deutlich ist die prominente Zellintegration der SO-Mag5-beladenen Zellen unter Applikation eines Stabmagneten (Abb. 23 A, D, G) im Vergleich zur Kontrollgruppe

ohne Magnetfeld (Abb. 23 B, E, H) zu erkennen. Diese Ergebnisse ließen sich auch über eine Quantifizierung der integrierten Zellzahl anhand der nativen eGFP-Fluoreszenz bestätigen. So zeigte eine Analyse der Fluoreszenzintensität von BMC, dass mit Magnetfeld-Applikation (+ M: 2 044 762 a.u.  $\pm$  408 952) die Zellintegrationsrate der BMC im Vergleich zu einer fehlenden Magnettherapie (-M: 540 309 a.u.  $\pm$  108 062) um den Faktor 3,8 ( $p=0,042$ ) erhöht werden konnte (Abb. 23 C). Dieser Effekt konnte auch nach einer Injektion von kardialen Zellen wie eCM (Faktor 7, +M: 16 452 Zellen  $\pm$  2421; -M: 2282 Zellen  $\pm$  373;  $p<0,001$ , Abb. 23 F) und ES-CM (Faktor 7, +M: 4453 Zellen  $\pm$  1915; -M: 649 Zellen  $\pm$  68;  $p<0,032$ ; Abb. 23 I) nachgewiesen werden.

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass eine Magnet-basierte Injektion von MNP-beladenen Zellen zu einer signifikant verbesserten Zellintegrationsrate führte, gegenüber einer Zelltransplantation ohne Magneteinwirkung und sich dieser Effekt an verschiedenen Zellpopulationen reproduzieren ließ.



**Abbildung 23: Zellintegration 2 Wochen nach der intramyokardialen Zellinjektion**

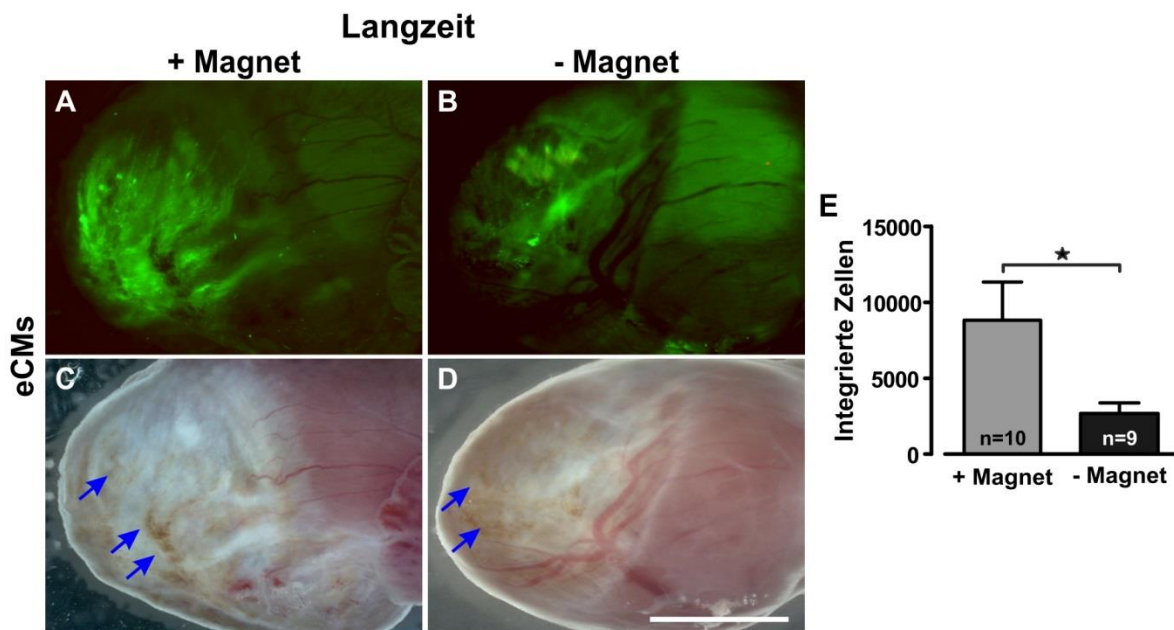
(A) Fluoreszenzaufnahmen zwei Wochen nach der Injektion von BMC (A, B), eCM (D, E) und ES-CM (G, H) zeigen eine prominente Zellintegration der SO-Mag5-beladenen Zellen unter Magnet-Applikation im Vergleich zu einer Zelltransplantation ohne Magnetfeld-Anwendung. Die Identifizierung der Zellen konnte anhand ihrer nativen Fluoreszenz (DS-Red transgene BMC und eGFP-transgene eCM und ES-CM) identifiziert werden. Maßstabsbalken: 2 mm. (C, F, I) Quantitative Analyse der integrierten transgenen Zellen mit und ohne Magnetfeld-Applikation (BMC: + / - M: je n = 5, p = 0,042; eCM: + / - M: je n = 10, p < 0,001; ES-CM: + M: n = 7, - M: n = 3, p = 0,032).

### 3.2.5 Langzeit-Effekte nach intramyokardialer Injektion von SO Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnetfeld-Applikation auf die Zellintegrationsrate

Um Langzeiteffekte der MNP-basierten, myokardialen Zelltransplantation unter dem Einfluss eines Magnetfeldes untersuchen zu können, wurden SO-Mag5-beladene eCM intramyokardial mit und ohne Magnetfeld injiziert und die Zahl eGFP<sup>+</sup>-Zellen 8 Wochen postoperativ untersucht. Hierzu wurden syngene C57BL/6 Mäuse verwendet, um eine Abstoßungsreaktion der transplantierten Zellen zu minimieren. Analog zu den zuvor

beschriebenen Kurzzeit (KZ)- Experimenten wurden SO-Mag5-beladene eCM in das kryoinfarzierte Mausherz mit und ohne Applikation eines Stabmagneten intramyokardial injiziert. 56 Tage nach dem operativen Eingriff wurden die Herzen entnommen und die Anzahl der integrierten Zellen analysiert. Anhand der nativen eGFP-Fluoreszenz konnte bereits makroskopisch die verbesserte Zellintegration der unter einem Magnetfeld injizierten eCM nachgewiesen werden (Abb. 24 A), im Vergleich zu Tieren ohne Magnetfeld-Applikation und Tieren der Kontrollgruppe (Abb. 24 B). Durch quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität wurde diese Beobachtung bestätigt. Im Vergleich zur KZ-Analyse, in welcher durchschnittlich  $16\,452 \pm 2421$  eCM in das Infarktareal integrierten (Abb. 23 F), konnten 56 Tage nach der Zelltransplantation im Mittel  $8864 \pm 2460$  nachgewiesen werden (Abb. 24 E). Von großer Bedeutung ist jedoch, dass auch in der LZ- Beobachtung der positive Effekt der Magnetfeld-Applikation auf die Zellintegration erhalten blieb. So konnten in der +Magnet-Gruppe, wie bereits beschrieben, durchschnittlich 8864 Zellen verifiziert werden, wohingegen sich in der –Magnet-Gruppe signifikant weniger eGFP<sup>+</sup>-eCM ( $2640 \pm 687$ ) detektieren ließen (Faktor 3.3,  $p=0,043$ , Abb. 24 E). In Durchlichtaufnahmen konnten darüber hinaus SO-Mag5-Ablagerungen (blaue Pfeile) in beiden Gruppen identifiziert werden (Abb. 24 C, D). Auffällig ist jedoch, dass sich im Vergleich zur KZ-Gruppe die Eisenablagerungen und das eGFP-Signal nur noch teilweise überlagerten.

Durch diese Versuche konnte nachgewiesen werden, dass der positive Effekt einer Magnet-basierten Zellinjektion nicht nur in KZ-Experimenten Bestand hatte, sondern auch langfristig erhalten blieb.



**Abbildung 24: Zellintegration 8 Wochen nach der intramyokardialen Zellinjektion**

Repräsentative Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen der integrierten, eGFP<sup>+</sup>-eCM, die mit SO-Mag5-Partikeln bei einer Konzentration von 200 pg Fe / Zelle über Nacht beladen wurden. (A) Durch Applikation eines Stabmagneten während und 10 Minuten nach der Transplantation konnte eine verbesserte Zellintegrationsrate nachgewiesen werden, als ohne Magnetfeld-Anwendung (B). Makroskopisch sind sowohl mit (C) als auch ohne Magnetfeld-Applikation (D) SO-Mag5-Ablagerungen deutlich erkennbar (blaue Pfeile). Maßstabsbalken: 2 mm. (E) Quantitative Analyse der integrierten eGFP<sup>+</sup>-eCM mit und ohne Magnetfeld-Applikation (p= 0,043).

### 3.2.6 Kurz- und Langzeit-Auswirkungen einer Magnet-basierten Zellinjektion von SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM auf die Hämodynamik

Um überprüfen zu können, ob die gesteigerte Zellintegrationsrate mittels Magnet-basierter intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM auch einen positiven Einfluss auf die Hämodynamik bewirkt, wurde mit Hilfe einer LHK-Untersuchung gleichzeitig Druck (in mmHg) und Volumen (in  $\mu$ l) des linken Ventrikels gemessen. Dieses Verfahren ermöglicht die Analyse verschiedener funktioneller Parameter. Die LHK-Untersuchung der KZ-Studien erfolgte zum einen mit SO-Mag5-beladen eCM, zum anderen mit SO-Mag5-beladenen ES-CM 14 Tage nach dem intraoperativen Eingriff. LZ-Untersuchungen wurden nur mit SO-Mag5-beladen eCM 56 Tage nach der Injektion durchgeführt. Als Parameter wurden neben der invasiv gemessenen Auswurffraktion der linken Herzkammer (LVEF) auch das Herzzeitvolumen (HZV), das Schlagvolumen (SV), der enddiastolische Druck (EDP) und

das enddiastolische Volumen (EDV) eruiert. Im Rahmen der KZ-Studien unter Verwendung von eCM wurden fünf verschiedene Versuchstiergruppen untersucht. Mäusen der *KI + eCM + M*-Gruppe wurden SO-Mag5-beladene eCM unter Applikation eines Magnetfeldes in eine Kryoläsion injiziert. Als direkte Kontrollgruppe wurden Tieren der *KI + eCM - M*-Gruppe dem gleichen Protokoll unterzogen, jedoch ohne Magnet-basierte Zellinjektion. Als weitere Kontrollgruppen dienten kryoinfarzierte Mäuse ohne Zelltherapie (*KI*) und kryoinfarzierte Tiere mit Injektion von in Medium gelösten SO-Mag5-Partikeln (*KI + MNP*) unter Magnetfeldanwendung. In einer letzten Kontrollgruppe wurden die Herzen von Tieren ohne Infarkt (*Ohne KI*) analysiert, bei welchen jedoch für eine bessere Vergleichbarkeit zu den anderen Gruppen eine Thorakotomie als Schein-OP durchgeführt wurde. Bei LZ-Studien unter Verwendung von eCM sowie bei KZ-Studien mit injizierten ES-CM wurde auf die *KI + MNP*-Gruppe verzichtet.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der KZ- und LZ-Studie nach intramyokardialer Injektion von MNP-beladenen eCM / ES-CM, so ergaben sich bei allen untersuchten funktionellen Parametern signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen (Abb. 25, 26, 27).

Eine Transplantation von SO-Mag5-beladenen eCM führte bei kryoinfarzierten KZ-Tieren zu einer signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhten LVEF (*KI + eCM - M*:  $35,54 \% \pm 3,55$ ) im Vergleich zu infarzierten und nicht zelltherapierten Tieren (*KI*:  $25,78 \% \pm 2,61$ , Abb. 25 A). Wurde der Injektionsprozess unter Magnetfeld-Applikation durchgeführt, konnte eine weitere signifikante Verbesserung der linksventrikulären Auswurfraction mit einem Wert von  $48,66 \% \pm 4,06$  gegenüber beiden Kontrollgruppen (*KI + eCM - M*,  $p < 0,05$  und *KI*,  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die LVEF der *KI + eCM + M*-Gruppe keinen signifikanten Unterschied gegenüber der LVEF der Schein-operierten Tieren ohne Infarkt ( $60,15 \% \pm 1,81$ ) zeigte. Wurden ausschließlich SO-Mag5-Partikel injiziert, führte dies im Vergleich zu einer Zelltherapie mit und ohne Magnetanwendung zu keiner verbesserten LVEF ( $27,13 \% \pm 0,81$ , Abb. 25 A).

Auch im Hinblick auf das HZV (Abb. 25 B) und das SV (Abb. 25 C) konnten die positiven Effekte einer Magnet-basierte Zellinjektion demonstriert werden. Hier lag das HZV mit  $9,5 \text{ ml/min} \pm 0,43$  im Vergleich zu allen Kontrollgruppen (*KI*:  $7,54 \text{ ml/min} \pm 0,66$ , *KI + MNP*:  $8,6 \text{ ml/min} \pm 0,66$ ; *KI + eCM - M*:  $8,7 \text{ ml/min} \pm 0,63$ ) tendenziell höher, ebenso wie beim SV gezeigt. So konnte das höchste SV durch Anwendung des magnetischen Targetings gegenüber allen Kontrollgruppen ( $20,69 \mu\text{l} \pm 0,96$ ) festgestellt werden (Abb. 25 C). Im

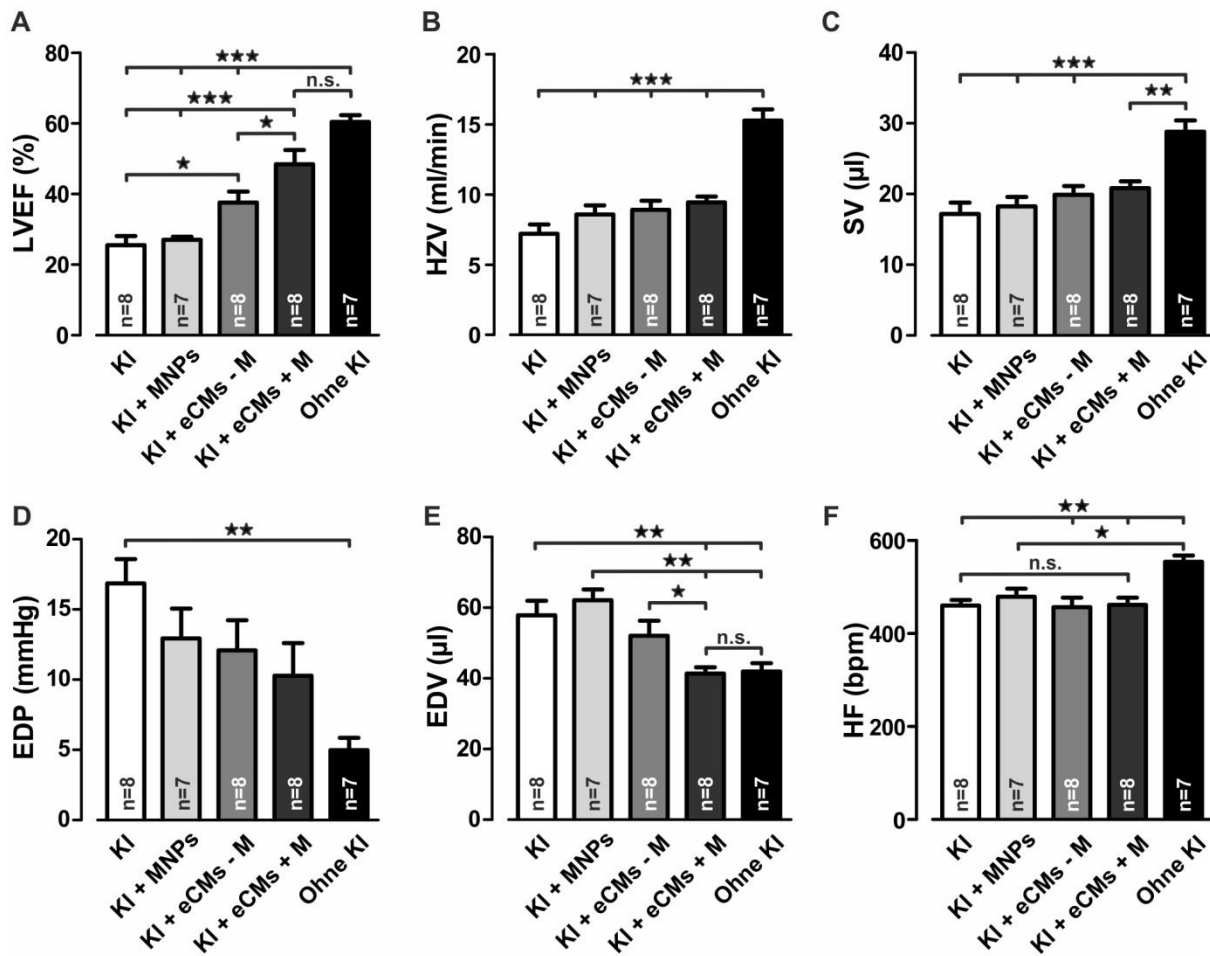
Vergleich zu Schein-operierten Tieren mit einem Norm-Wert von  $29,19 \mu\text{l} \pm 1,51$  lag das SV jedoch bei allen Gruppen signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ). Auch im Hinblick auf den EDP, näherte sich der Wert der *KI + eCM + M*-Gruppe mit  $10,36 \text{ mmHg} \pm 2,33$  am stärksten dem Norm-Wert der Schein-operierten Tiere mit  $5,44 \text{ mmHg} \pm 0,89$  an (Abb. 25 D). Bei allen drei Kontrollgruppen wurde ein deutlich höherer EDP nachgewiesen. Ebenso zeigte die Analyse des EDVs (Abb. 25 E), dass eine Magnet-basierte Zellinjektion in einem signifikant verringerten EDV ( $40,92 \mu\text{l} \pm 2,32$ ,  $p < 0,01$ ) resultiert, im Vergleich zu Tieren der *KI-* ( $56,88 \mu\text{l} \pm 5,72$ ), der *KI + MNP*-Gruppe ( $61,66 \mu\text{l} \pm 4,14$ ) sowie der *KI + eCM - M*-Gruppe ( $55,23 \mu\text{l} \pm 6,07$ ). Hinsichtlich der Schein-operierten Tiere ohne Infarkt ( $45,35 \mu\text{l} \pm 3,91$ ) erreichten Tiere der *KI + eCM + M*-Gruppe ein annähernd gleiches EDV und waren daher statistisch vergleichbar ( $p > 0,05$ ). Bei allen Herzfunktionsanalysen wurde gleichzeitig auch die Herzfrequenz (HF) der Tiere ermittelt (Abb. 25 F, 26 F, 27 F), die als Indikator für die durch die Narkose entstehende Belastung der Tiere, aber auch als Hinweis auf eine Brady- oder Tachykardie, herangezogen werden kann. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Schein-operierten Tiere mit einer HF von  $552,90 \text{ bpm} \pm 13,59$  auf dem Niveau von Wild-Typ Mäusen (Dobson, 2003) lagen (Abb. 25 F). Im Vergleich dazu lag die HF der vier Behandlungsgruppen signifikant geringer ( $p < 0,01$ ), jedoch war die HZ zwischen den vier Versuchsgruppen vergleichbar (*KI*:  $454,07 \text{ bpm} \pm 12,0$ ; *KI + MNP*:  $478,43 \text{ bpm} \pm 17,09$ ; *KI + eCM - M*:  $452,88 \text{ bpm} \pm 19,58$ ; *KI + eCM + M*:  $460,85 \text{ bpm} \pm 15,44$ ;  $p > 0,05$ , Abb. 25 F).

In LZ-Studien konnte der in den KZ-Studien bereits demonstrierte positive kardiale Effekt einer Magnet-basierten Zellinjektion reproduziert werden (Abb. 26). So lag die LVEF (Abb. 26 A) bei vergleichbarer HF (Abb. 26 F) nach einer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM unter Magnet-Applikation mit  $48,01 \% \pm 3,27$  signifikant höher, als bei einer Zellinjektion ohne Magnetfeld ( $38,71 \% \pm 3,58$ ;  $p < 0,05$ ) und der unbehandelten Kontrollgruppe ( $28,86 \% \pm 2,29$ ;  $p < 0,001$ ). Auch im Hinblick auf das HZV (Abb. 26 B) und das SV (Abb. 26 C) konnten ebenso, wie schon bei den KZ-Studien zuvor, signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen aufgezeigt werden. So lag das HZV bei Tiere der *KI + eCM + M*-Gruppe signifikant höher ( $10,2 \text{ ml/min} \pm 0,21$ ), als bei Mäusen beider Kontrollgruppen (*KI + eCM - M*:  $8,3 \text{ ml/min} \pm 0,73$ ; *KI*:  $7,5 \text{ ml/min} \pm 0,61$ , je  $p < 0,05$ , Abb. 26 B). Der gleiche Effekt ließ sich auch im Hinblick auf das SV (Abb. 26 C), den EDP (Abb. 26 D) und das EDV (Abb. 26 E) detektieren. Hier führte eine Magnet-basierte Zellinjektion jeweils zu den besten Werten, die sich stark den Norm-Werten der *Ohne-KI*-Gruppe annäherten. Besonders ist hierbei das EDV zu beachten, da im Vergleich zu



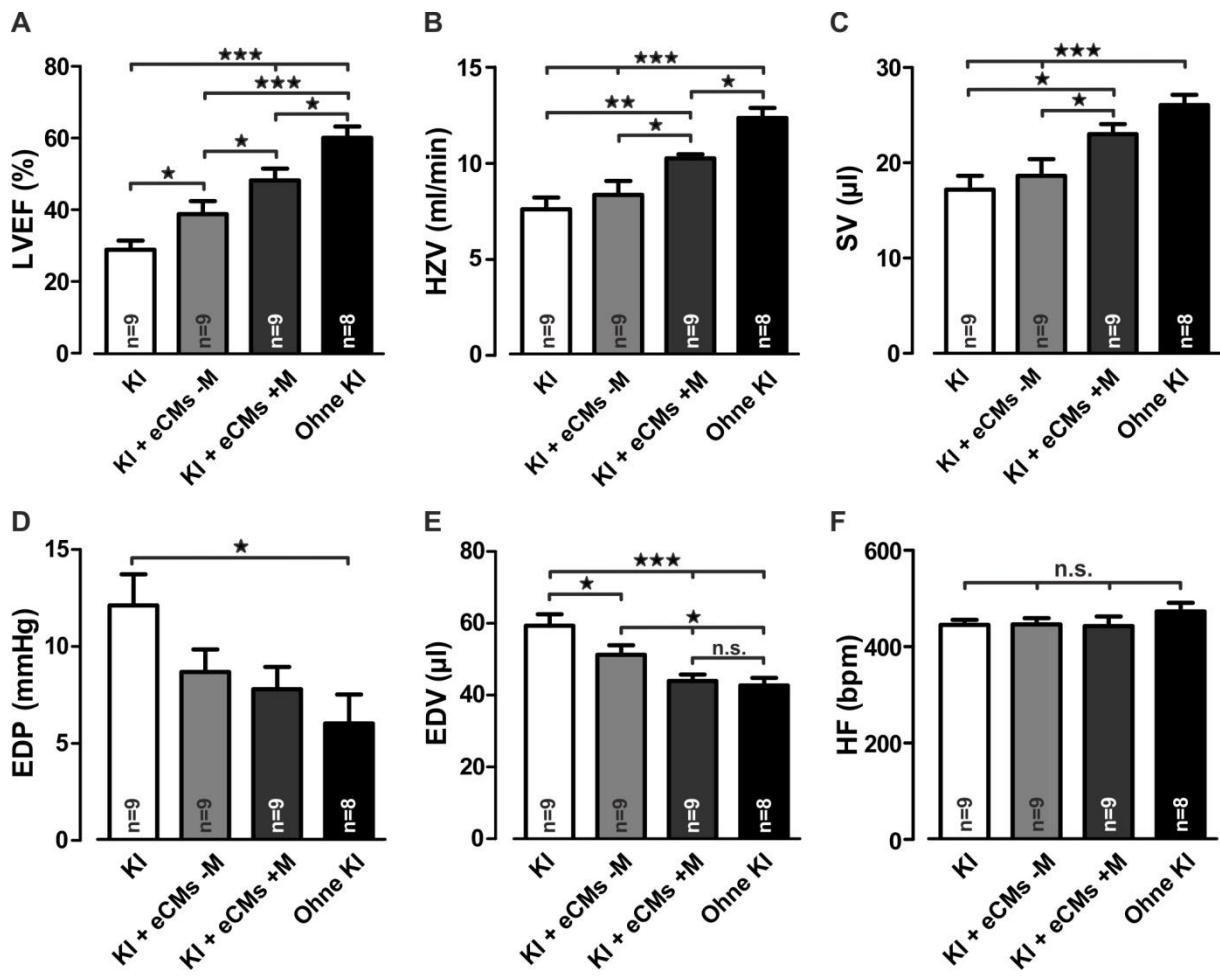
den Schein-operierten Tieren mit einem EDV-Wert von  $42,88 \mu\text{l} \pm 2,17$  auch hier in der *KI + eCM + M*-Gruppe kein signifikanter Unterschied nachzuweisen war ( $p > 0,05$ , Abb. 26 E). KZ-Studien einer Magnet-basierte Injektion von SO-Mag5-beladene ES-CM führte ebenso wie eine Transplantation von SO-Mag5-beladenen eCM zu signifikant verbesserten funktionellen Parametern (Abb. 27). Hierbei zeigte sich die LVEF mit  $45,91 \% \pm 2,57$  im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (*KI + ES-CM - M*:  $34,86 \% \pm 1,83$ ; *KI*:  $23,07 \% \pm 1,92$ ) ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 27 A). Im Hinblick auf das HZV (Abb. 27 B), das SV (Abb. 27 C), den EDP (Abb. 27 D) und das EDV (Abb. 27 E) zeigten sich, wie bei den eCM zuvor, tendenzielle Verbesserungen der jeweiligen Parameter bei einer Zellinjektion unter Magnetfeld-Applikation, gegenüber einer Zellinjektion ohne Magnet und Tieren der *KI*-Gruppe. So wies die *KI + ES-CM + M*-Gruppe ein HZV von  $8,79 \text{ ml/min} \pm 0,853$  (Abb. 27 B), ein SV von  $20,03 \mu\text{l} \pm 2,18$  (Abb. 27 C), einen EDP von  $10,4 \text{ mmHg} \pm 1,87$  (Abb. 27 D) und ein EDV von  $41,14 \mu\text{l} \pm 2,07$  (Abb. 27 E) auf. Die HF war innerhalb der Versuchsgruppen (*KI + ES-CM - M*:  $451,1 \text{ bpm} \pm 9,72$ ; *KI + ES-CM + M*:  $442,3 \text{ bpm} \pm 8,29$ ) vergleichbar, lediglich zwischen der *Ohne-KI*-Gruppe ( $458 \text{ bpm} \pm 7,35$ ) und der *KI*-Gruppe ( $423,3 \text{ bpm} \pm 6,48$ ) konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden (Abb. 27 F).

Durch diese Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass eine Injektion von SO-Mag5-beladenen kardialen Zellen (eCM und ES-CM) gegenüber einer reinen SO-Mag5-Transplantation ohne Zellbeteiligung zu einer Verbesserung der Herzfunktion führte. Darüber hinaus konnte die Hämodynamik noch weiter verbessert werden, indem die Zellinjektion unter einer Magnetfeld-Applikation durchgeführt wurde. Der positive Effekt einer Magnet-basierten Zellinjektion konnte nicht nur nach 14 Tagen, sondern auch noch nach 56-Tagen nachgewiesen werden.



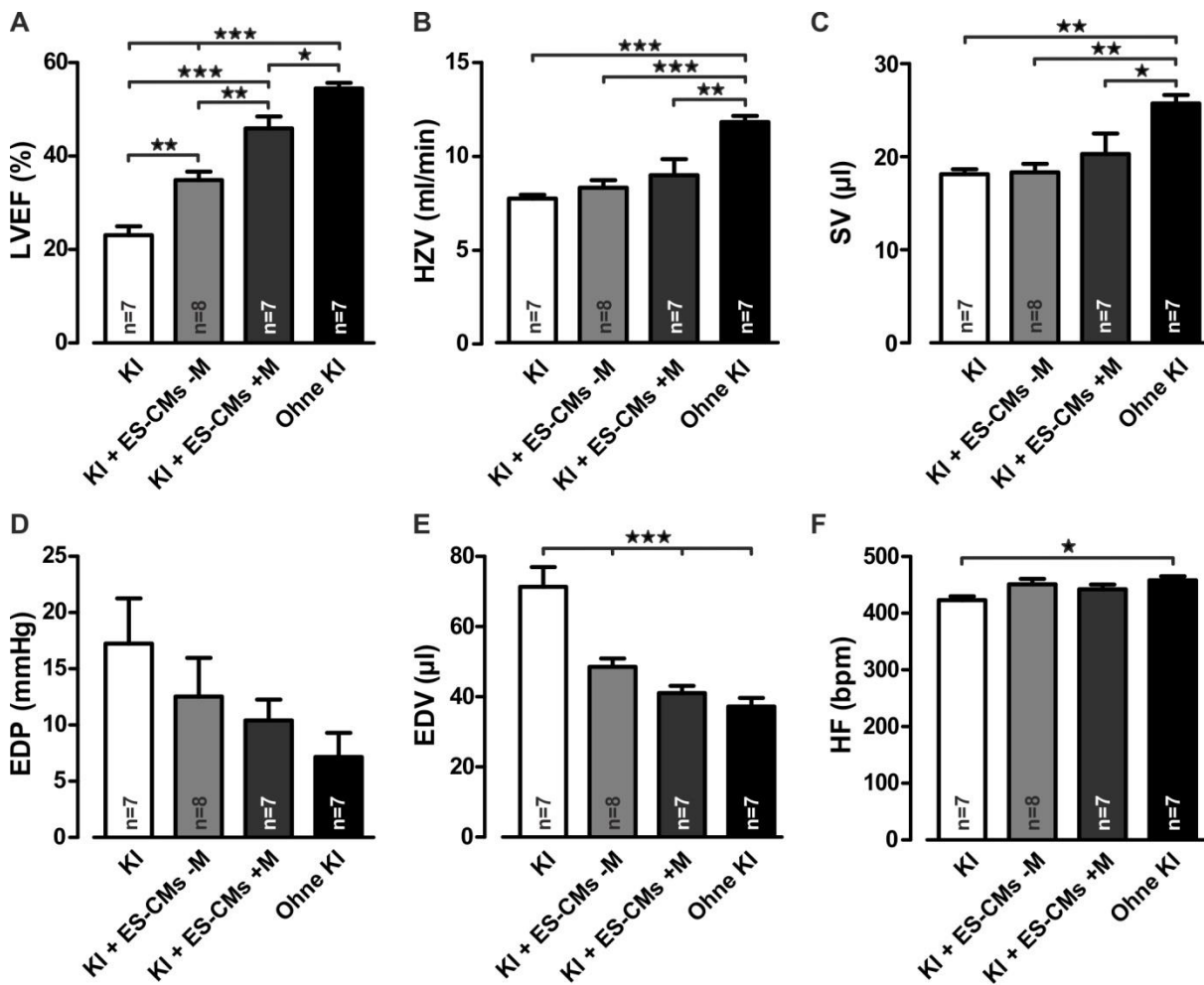
**Abbildung 25: Hämodynamische Parameter 2 Wochen nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM**

Die LHK ermöglicht die Analyse verschiedener funktioneller Parameter. Dargestellt sind (A) die LVEF, (B) das HZV, (C) das SV, (D) der EDP, (E) EDV und (F) die HF der fünf verschiedenen Versuchstiergruppen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). KI = Injektion von 20 % IMDM in kryoinfarzierte Herzen; KI + MNP = Injektion von SO-Mag5-Partikeln (200 pg Fe / Zelle), gelöst in 20 % IMDM; KI + eCM - M = Kryoinfarzierte Herzen mit Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) ohne Magnet-Applikation; KI + eCM + M = Kryoinfarzierte Herzen mit Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) mit Magnet-Applikation; Ohne KI = Thorakotomierte Herzen ohne KI und ohne Injektion (KI, KI + eCM - M und KI + eCM + M: je  $n = 8$ ; KI + MNP und Ohne KI: je  $n = 7$ ).



**Abbildung 26: Hämodynamische Parameter 8 Wochen nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM**

Funktionelle Parameter der LHK-Untersuchung. Dargestellt sind (A) die LVEF, (B) das HZV, (C) das SV, (D) der EDP, (E) das EDV und (F) die HF der vier verschiedenen Versuchstiergruppen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). *KI* = Injektion von 20 % IMDM in kryoinfarzierte Herzen; *KI + eCM - M* = Kryoinfarzierte Herzen mit Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) ohne Magnetfeld-Applikation; *KI + eCM + M* = Kryoinfarzierte Herzen mit Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) mit Magnet-Applikation; *Ohne KI* = Thorakotomierte Herzen ohne KI und ohne Injektion (*KI*, *KI + eCM - M* und *KI + eCM + M*: je  $n = 9$ ; *Ohne KI*: je  $n = 8$ ).



**Abbildung 27: Hämodynamische Parameter 2 Wochen nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen ES-CM**

Funktionelle Parameter der LHK-Untersuchung. Dargestellt sind (A) die LVEF, (B) das HZV, (C) das SV, (D) der EDP, (E) das EDV und (F) die HF der vier verschiedenen Versuchstiergruppen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). KI = Injektion von 20 % IMDM in kryoinfarzierte Herzen; KI + eCM - M = Kryoinfarzierte Herzen mit Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) ohne Magnet-Applikation; KI + eCM + M = Kryoinfarzierte Herzen mit Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM (200 pg Fe / Zelle) mit Magnet-Applikation; Ohne KI = Thorakotomierte Herzen ohne KI und ohne Injektion (KI, KI + ES-CM + M und Ohne KI: je  $n = 7$  ; KI + ES-CM - M: je  $n = 8$ ).

### 3.2.7 Auslösbarkeit von ventrikulären Tachykardien nach Transplantation von SO-Mag5-Partikeln / SO-Mag5-beladenen eCM in ein infarziertes Myokard

Um den Effekt einer Therapie mit SO-Mag5-beladenen eCM auf die elektrophysiologische Vulnerabilität nach einem Myokardinfarkt (MI) beurteilen zu können, wurden 14 Tage nach der intramyokardialen Injektion elektrophysiologische Untersuchungen (EPU) durchgeführt. Das Kriterium für eine Auslösbarkeit von ventrikulären Tachykardien (VTs) lag dabei bei vier oder mehr direkt aufeinanderfolgenden ventrikulären Extrasystolen.

Abbildung 28 A zeigt beispielhaft die EPU-Ableitung einer Maus der Kontrollgruppe („KI + MNP + M“), bei der nach einer Kryoinfarzierung nur SO-Mag5-Partikel (keine Zellen) unter Applikation eines Stabmagneten injiziert wurden. Im Oberflächen-EKG als auch in der intrakardialen Ableitung („Atrial“) sind deutlich die von der *Burst-Stimulation* (Stimulationsrate: 25 Hz / 1 Sekunde) ausgelösten ventrikuläre Extrasystolen erkennbar. Eine Maus wird hierbei als auslösbar gewertet, wenn mehr als vier aufeinanderfolgende VTs erkennbar sind. In der intrakardialen Ableitung wird deutlich, dass während der Tachykardie eine AV-Dissoziation vorliegt (a' + A) und der Sinusknoten, der nicht von der VT betroffen ist, weiter die Vorhöfe erregt. Nach ca. 1 Sekunde setzte der Sinusrhythmus mit einem synchronisierten ventrikulären Herzschlag wieder ein.

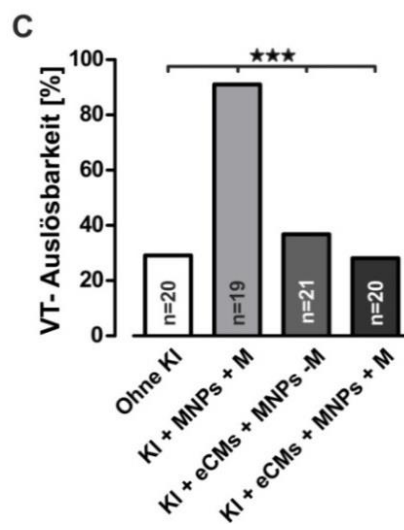
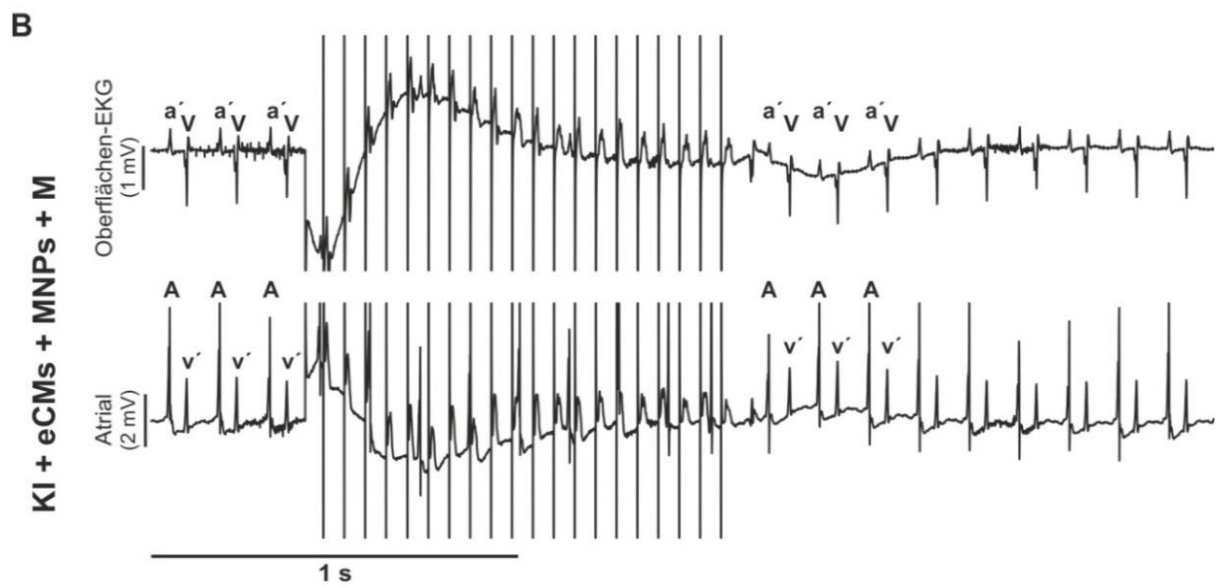
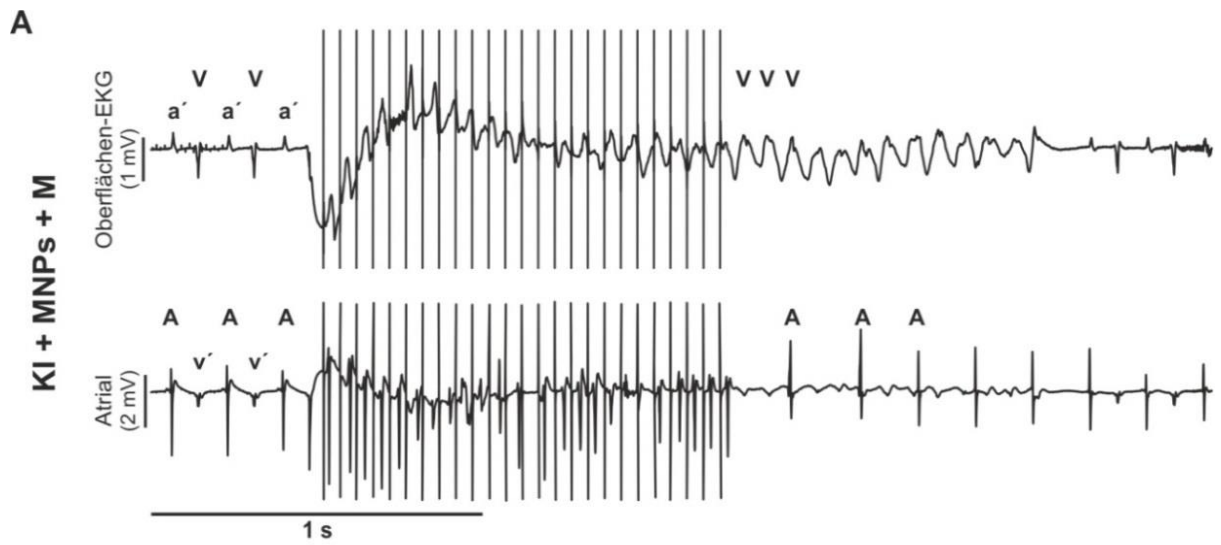
Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 28 B eine repräsentative EKG-Aufnahme einer Maus, bei welcher SO-Mag5-beladenen eCM unter Applikation eines Stabmagneten in das zuvor kryoinfarzierte Myokard injiziert wurden („KI + eCM + MNP + M“). Im Vergleich zur Kontrolle konnten hier nach der Stimulation keine Veränderung im EKG aufgezeichnet werden (Abb. 28 B). Die Herzaktivität wurde nicht beeinflusst und der Sinusrhythmus setzt nach einer kurzen kompensatorischen Pause wieder ein. Somit wirkte sich die Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM unter Applikation eines Stabmagneten positiv auf die elektrische Stabilität des Herzens aus. Dieser Effekt ließ sich auch durch die quantitative Analyse der Auslösbarkeit von VTs bestätigen (Abb. 28 C). So wurde nach einer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM unter Magnetfeld-Applikation eine VT-Auslösbarkeit in nur 32,29 % der Tiere (n = 20) nachgewiesen, was dem Niveau von WT-Mäusen entsprach (29,13 %, n = 20). Auch die eCM-Transplantation ohne Magnet-Applikation führte zu einer signifikanten VT-Reduktion (36,76 %, n = 21). Diese Daten bestätigen bereits publizierte Experimente (Roell et al., 2007). Die MNP-Beladung der Zellen scheint sich auch *in vivo* nicht negativ auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der transplantierten eCM auszuwirken.

Eine reine SO-Mag5-Injektion ohne Zellzusatz („KI + MNP + M“) führte dagegen zu keiner signifikant verbesserten elektrischen Stabilität des Ventrikels. So konnten in 91,07 % der untersuchten Mäuse (n = 19) ventrikuläre Extrasystolen ausgelöst werden (\*\*p < 0,001; Abb. 28 C).

Demzufolge führte nur eine Transplantation von SO-Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnetfeld-Applikation zu einer signifikant geringeren Auslösbarkeit von VTs und der daraus resultierenden verbesserten elektrophysiologischen Stabilität des Herzens.

### **Abbildung 28: Auslösbarkeit von VTs**

Die Untersuchung der Auslösbarkeit von VTs erfolgte 14 Tage nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-Partikeln / SO-Mag5-beladenen eCM mit Hilfe von elektrophysiologische Untersuchungen (EPU). (A) Repräsentativer Ausschnitte einer EPU-Ableitung einer auslösbaren Maus, bei der nach einer Kryoinfarzierung SO-Mag5-Partikel unter Applikation eines Stabmagneten injiziert wurden. In der oberen Ableitungsspur ist das Oberflächen-EKG dargestellt, die untere Spur zeigt die intrakardiale EKG-Ableitung über den Elektrokatheter. Deutlich sind die von einer Burst-Stimulation (Stimulationsrate: 25 Hz über 1 Sekunde) ausgelösten VTs erkennbar. In der intrakardialen Ableitung wird deutlich, dass während der Tachykardie eine AV-Dissoziation vorliegt („A“). (B) Repräsentativer EPU-Ausschnitt einer Maus, die nach einer Kryoinfarzierung mit SO-Mag5-beladenen eCM unter Applikation eines Stabmagneten behandelt wurde. Hierbei ließen sich bei gleicher Stimulation keine VTs detektieren (a' + A = arterielle Ableitung; v' + V = ventrikuläre Ableitung). (C) Prozentualer Anteil der VT-Auslösbarkeit (*Ohne KI* = Natives, unbehandeltes Herz, n = 20; *KI + MNP + M* = Kryoinfarziertes Herz mit injizierten SO-Mag5-Partikeln unter Magnet-Applikation, n = 19; *KI + eCM + MNP - M* = Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM ohne Magnet-Applikation in eine kryoinfarziertes Herz, n = 21; *KI + eCM + MNP + M* = Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM unter Magnet-Applikation in eine kryoinfarziertes Herz n = 20; \*\*\*p < 0,001).



### 3.2.8 Integration und Charakterisierung der intramyokardial injizierten SO-Mag5-beladenen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten

Um die Integration der transplantierten Zellen in das Myokard überprüfen zu können, wurden 14 und 56 Tage nach Abschluss der *in vivo*-Herzkatheter-Untersuchungen die Herzen entnommen. In Gefrierschnitten ließen sich die transplantierten Zellen bereits anhand ihrer Nativfluoreszenz (eGFP<sup>+</sup> oder DS-Red<sup>+</sup>) im Bereich der Myokardläsion detektieren. So konnte 14 Tage nach dem operativen Eingriff, sowohl über das native DS-Red-Signal der BMC (Abb. 29 A, C), als auch über das native eGFP-Signal der eCM und ES-CM (Abb. 30 A, E und Abb. 31 A, E), eine deutlich erhöhte Zellintegration unter Applikation eines Magnetfeldes festgestellt werden, verglichen mit magnetfreien Transplantationen. Dieser Effekt ließ sich auch in LZ-Untersuchung (56 Tage) reproduzieren (Abb. 32 A, E).

Neben der Darstellung der Nativfluoreszenz konnte zudem mit Hilfe von Preußisch Blau Färbungen bei allen drei untersuchten Zelltypen 14 Tage nach der Zelinjektion eine Überlagerung der integrierten Zellen mit den SO-Mag5-Partikeln nachgewiesen werden. Nahaufnahmen (blaue Kästen) verdeutlichten außerdem, dass die MNP nicht frei im Myokard lokalisiert sind, sondern eine zelluläre Integration zeigen (Abb. 29 B, D; Abb. 30 B, F und 31 B, F). Dagegen veranschaulichen LZ-Studien, dass 56 Tage nach der Transplantation von SO-Mag5-beladenen eCM, eine Überlagerung der Zellen und MNP weitestgehend nicht mehr gegeben war. Diese Beobachtung konnte sowohl bei einer Zelltransplantation unter dem Einfluss eines Magnetfeldes festgestellt werden (Abb. 32 A, B), als auch bei Tieren ohne Magnet-Anwendung (Abb. 32 E, F). Dies wird besonders durch die dargestellten Mischbilder verdeutlicht (Abb. 32 C, G), die eine überlagerte Anschauung des nativen eGFP-Signals der Zellen mit den Preußisch Blau gefärbten SO-Mag5-Partikeln erlauben. Differentialinterferenzkontrast (DIC) -Aufnahmen zeigen eine intrazelluläre Ablagerung der SO-Mag5-Partikel, jedoch liegen die MNP überwiegend außerhalb der eGFP<sup>+</sup>-eCM vor (Abb. 32 D, H). Demnach scheinen die MNP nach einiger Zeit von den Zellen ausgeschleust zu werden, eine freie oder zerstreute MNP-Ablagerung im Myokard konnte jedoch nicht festgestellt werden. Ferner liegen die SO-Mag5-Partikel sowohl mit (Abb. 32 D, weißes Inset) als auch ohne Magnet-Applikation (Abb. 32 H, weißes Inset) in intrazellulären Strukturen im Herzgewebe vor.

Die Identifizierung der transplantierten Zellen erfolgte mittels immunhistochemischer Färbungen spezifischer Epitope. Bei den injizierten BMC wurde zunächst eine Ko-Färbung



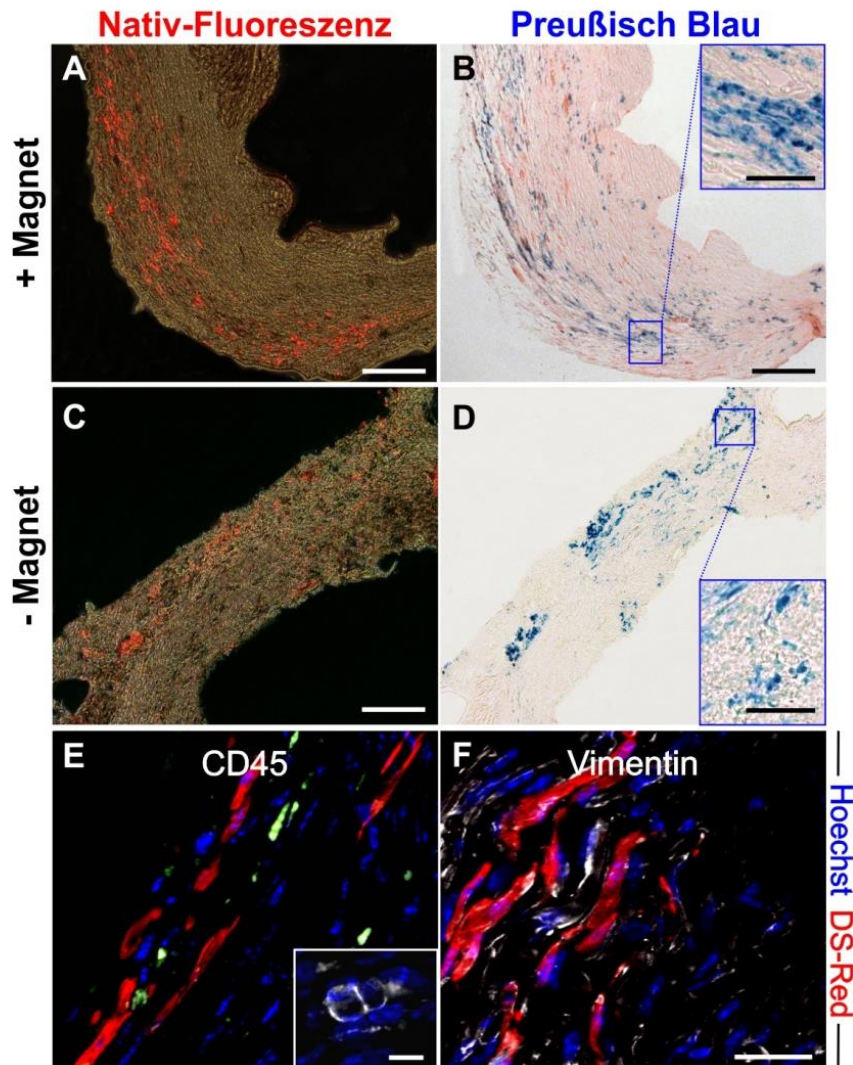
von CD45 (weiß) gegen Zellen des hämatopoetischen Systems durchgeführt. Wie in Abbildung 29 E gezeigt, konnten weder mit noch ohne Magnetfeld-Applikation CD45<sup>+</sup>-DS-Red<sup>+</sup>-BMC nachgewiesen werden. Lediglich im Nativgewebe wurden CD45<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen (weißes Inset). Zur weiteren Identifizierung wurde gegen Antigene endothelialer Zellen mittels Pecam, gegen Makrophagen mittels Mac-2 / CD11b sowie gegen Myofibroblasten mittels alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) gefärbt. Auch hier konnten keine positiven Ko-Färbungen mit den DS-Red<sup>+</sup>-BMC nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich eine Färbung mit dem zytoplasma-ständigen, mesenchymalen Zellmarker Vimentin (Vim, weiß) zeigte eine deutliche Ko-Lokalisation mit den DS-Red<sup>+</sup>-BMC auf (Abb. 29 F), wobei sich auch im infarzierten Areal neben den injizierten BMC eine große Anteil Vim<sup>+</sup>-Zellen findet.

Zur Charakterisierung der injizierten kardialen Zellen in KZ- und LZ-Studien, erfolgten immunhistochemische Färbungen gegen  $\alpha$ -Aktinin, welches bei der Verankerung von Aktinfilamenten an den Z-Scheiben von Muskelzellen beteiligt ist. Die Detektion dieser Marker ist besonders im Hinblick auf eine Unterscheidung der in der Präparation von eCM ebenso enthaltenden Fibroblasten wichtig. Bei den injizierten eCM (Abb. 30 und 31 C) und ES-CM (Abb. 30 und 31 G) konnten sowohl mit (Abb. 30) als auch ohne (Abb. 31) Magnetfeld-Anwendung eine deutliche  $\alpha$ -Aktinin-Expression 14 Tage nach der Zellinjektion nachgewiesen werden. Auch in LZ-Studien konnte sowohl mit als auch ohne Magnet-Applikation eine Expression von  $\alpha$ -Aktinin bei den transplantierten eGFP<sup>+</sup>-eCM festgestellt werden (Abb. 33 A, D).

Diese Ergebnisse verifizieren, dass eCM und ES-CM, bei welchen auf eine zusätzliche Fibroblasten-Injektion verzichtet wurde, nach der Integration in die Myokardläsion zu einem adulten Phänotyp weiter ausdifferenzieren können. Dies konnte sowohl für KZ- als auch für LZ-Untersuchungen (hier beschränkt auf die eGFP<sup>+</sup>-eCM) nachgewiesen werden.

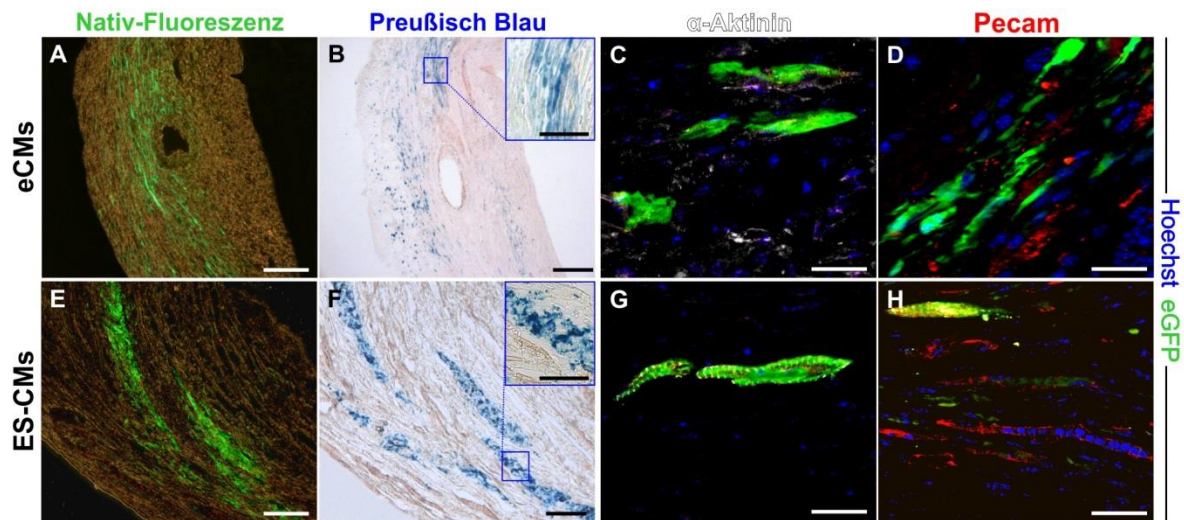
Zur weiteren Charakterisierung wurde durch Färbungen gegen den Pecam-Antikörper nach Zellen endothelialen Ursprungs gesucht. Dieser wird auf der Oberfläche embryonaler und adulter Endothelzellen konstitutiv exprimiert. Nach Transplantation von eCM und ES-CM sowohl mit (Abb. 30) als auch ohne Magnet-Applikation (Abb. 31) konnten Pecam<sup>+</sup>-Zellen im Infarktareal identifiziert werden. Eine Überlagerung der Pecam<sup>+</sup>-Zellen mit den eGFP<sup>+</sup>-eCM (Abb.30 und 31 D) bzw. eGFP<sup>+</sup>-ES-CM (Abb.30 und 31 H) konnte 14 Tage nach der intramyokardialen Injektion jedoch nicht nachgewiesen werden. Dagegen exprimierten einige eGFP<sup>+</sup>-Zellen 56 Tage nach der Transplantation auch Pecam. Dieser Effekt konnte

allerdings nur sehr vereinzelt und nach Anlage eines Magnetfeldes während der Zelltransplantation nachgewiesen werden (Abb.33 B, C).



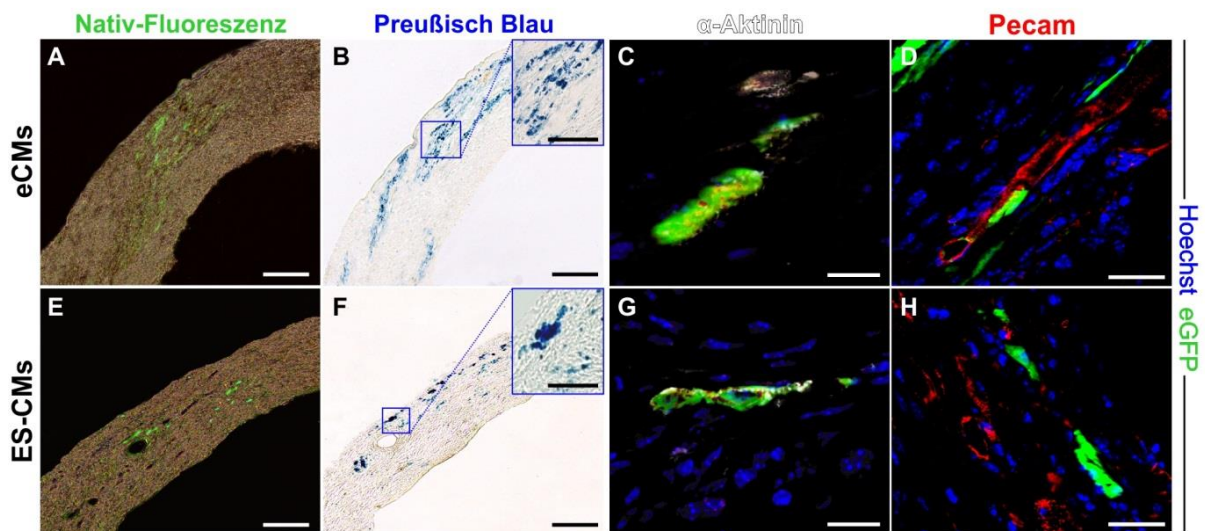
**Abbildung 29: Zelluläre Integration von SO-Mag5-beladenen BMC ins Myokard mit und ohne Magnetfeld-Applikation 14 Tage postoperativ**

(A - D) Repräsentative Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen von Gewebeschnitten 14 Tage nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen BMC mit (A, B) und ohne (C, D) Magnetfeld-Applikation. (A, C) Die Detektion der zellulären Integration in das Herzgewebe erfolgte anhand des nativen DS-Red-Fluoreszenzsignals der Zellen (rot). (B + D) Nachweis der SO-Mag5-Ablagerung mit Hilfe einer Preußisch Blau Färbung im Folgeschnitt. In der Vergrößerung (blaues Inset) ist ein repräsentativer Bereich dargestellt; Maßstabsbalken: 200 µm; Detailaufnahme: 100 µm. (E) Im Vergleich zum CD45<sup>+</sup>-Nativgewebe (weißes Inset) zeigte eine Ko-Färbung mit CD45 (weiß) im infarzierten Areal keine positives Signal auf (rot) Maßstabsbalken CD45: 25 µm; Detailaufnahme: 10 µm. (F) Dagegen identifizierte eine Vim-Ko-Färbung (weiß) die injizierten BMC (rot) als mesenchymale Zellen (Fibroblasten); Maßstabsbalken: 25 µm. Die Kerne wurden mittels Hoechst gefärbt und sind blau dargestellt.



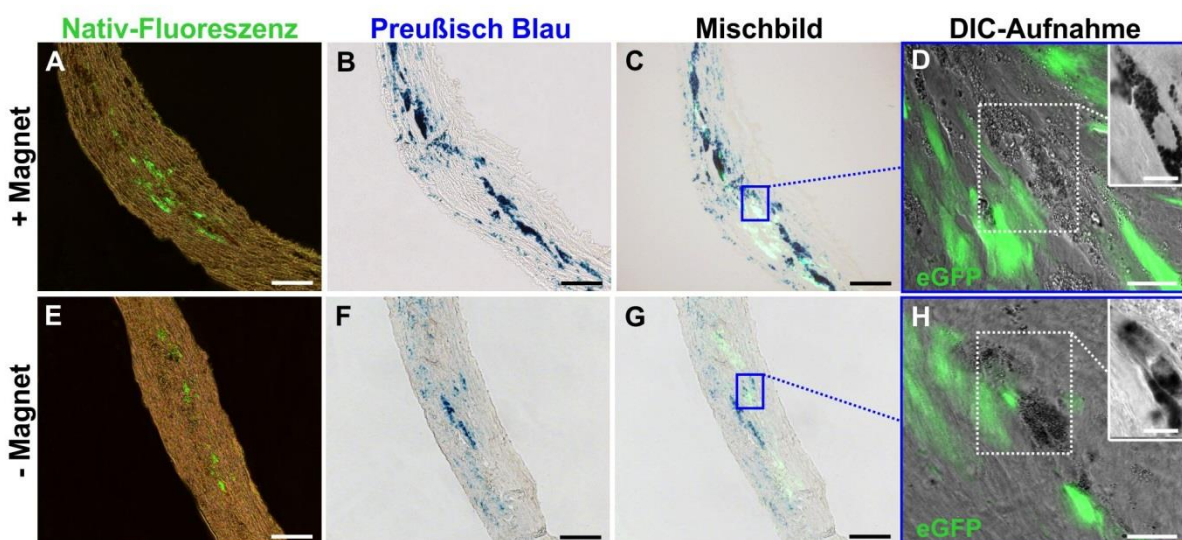
**Abbildung 30: Identifizierung der Integration von SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM unter Applikation eines Magnetfeldes 14 Tage postoperativ**

(A + B) Repräsentative Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen von Gewebeschnitten der intramyokardial injizierten SO-Mag5-beladenen kardialen Zellen unter Applikation eines Magnetfeldes. Die Detektion der zellulären Integration von eCM (A) und ES-CM (E) in das Herzgewebe erfolgte anhand des nativen eGFP-Fluoreszenzsignals der Zellen (grün). (B + F) Nachweis der SO-Mag5-Ablagerung mit Hilfe einer Preußisch Blau Färbung im Folgeschnitt. In einer Vergrößerung (blaues Inset) ist ein repräsentativer Bereich dargestellt; Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ ; etailaufnahme: 100  $\mu\text{m}$ . (C + G) Identifizierung der CM durch Nachweis der  $\alpha$ -Aktinin-Expression (weiß) von eCM (C) und ES-CM (G); Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ . (D, H) Die eGFP<sup>+</sup>-Zellen zeigten eine CD31 / Pecam Ko-Färbung (rot) auf. Die Kerne wurden mittels Hoechst gefärbt und sind blau dargestellt; Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 31: Identifizierung der Integration von SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM ohne Magnetfeld-Applikation 14 Tage postoperativ**

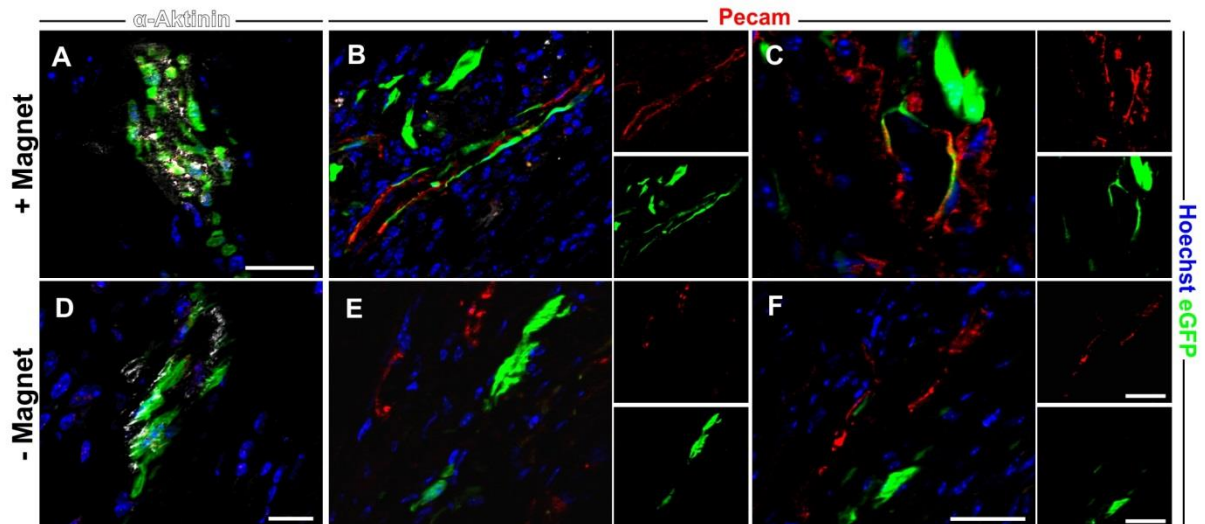
(A + B) Repräsentative Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen von Gewebeschnitten 14 Tage nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen kardialen Zellen (eCM und ES-CM) ohne Magnetfeld-Applikation. Die Detektion der zellulären Integration von eCM (A) und ES-CM (E) in das Herzgewebe erfolgte anhand des nativen eGFP-Fluoreszenzsignals der Zellen (grün). (B + F) Nachweis der MNP-Ablagerung mit Hilfe einer Preußisch Blau Färbung im Folgeschnitt. In der Vergrößerung (blaues Inset) ist ein repräsentativer Bereich dargestellt; Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ ; Detailaufnahme: 100  $\mu\text{m}$ . (C + G) Identifizierung der CM durch Nachweis der  $\alpha$ -Aktinin-Expression (weiß) von eCM (C) und ES-CM (G; Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ . (D, H) Die eGFP<sup>+</sup>-Zellen zeigten eine Pecam Ko-Färbung (rot) auf. Die Kerne wurden mittels Hoechst gefärbt und sind blau dargestellt; Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 32: Zelluläre Integration von eCM 56 Tage nach der Transplantation mit und ohne Magnetfeld-Applikation**

Repräsentative Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen von Gewebeschnitten 56 Tage nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM mit (A - D) und ohne (E - H)

Magnetfeld-Applikation; Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ . Die Detektion der zellulären Integration mit (A) und ohne (E) Magnetfeld erfolgte anhand des nativen eGFP-Fluoreszenzsignals der eCM (grün). (B + F) Preußisch Blau gefärbte Folgeschnitte zum Nachweis der SO-Mag5-Partikel im Myokard. (C + G) Mischbilder der eGFP<sup>+</sup>-eCM und der Preußisch Blau gefärbten SO-Mag5-Partikel;. (D + H) DIC- Aufnahmen der eGFP<sup>+</sup>-eCM und Detailaufnahmen (weißes Inset) des Preußisch Blau gefärbten Folgeschnittes mit (D) und ohne (H) Magnet-Applikation; Maßstabsbalken DIC: 25  $\mu\text{m}$ ; Maßstabsbalken Detailaufnahme: 10  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 33: Identifizierung der intramyokardial injizierten eCM mit und ohne Magnetfeld 56 Tage postoperativ**

Identifizierung der CM mittels  $\alpha$ -Aktinin-Expression (weiß) der eGFP<sup>+</sup>-eCM (grün) mit (A) und ohne (D) Magnetfeld-Applikation. Die Kernfärbung erfolgte mit Hilfe einer Hoechst-Färbung (blau); Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ . (B + C) Unter Verwendung eines Magnetfeldes demonstrierten Immunfluoreszenzfärbungen des Endothelmarkers Pecam (rot) spezifische Ko-Färbungen mit den intramyokardial injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM (grün). Diese Überlagerung wird auch durch Betrachtung der Einzelkanalaufnahmen der eGFP<sup>+</sup>-eCM bestätigt. (E + F) Ohne Magnetfeld-Applikation konnte keine Überlagerung des Pecam-Signals mit dem eGFP<sup>+</sup>-Signal der eCM festgestellt werden; Maßstabsbalken: 25  $\mu\text{m}$ ; Maßstabsbalken Einzelkanäle: 20  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.9 Analyse von Proliferation und Apoptose nach intramyokardialer Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM im Zeitverlauf

In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination aus MNP-beladenen Zellen und einer Magnet-basierten Zellinjektion zu einer deutlich erhöhten Zellintegrationsrate im infarzierten Myokard führt. Für diesen Effekt könnten zwei verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Der erste Mechanismus geht davon aus, dass durch Applikation eines Magnetfeldes schon während der Injektion mehr Zellen im Myokard mechanisch festgehalten werden können, als ohne Magnet, was in einer höheren Zellintegrationsrate resultiert. Dafür sprechen die Ergebnisse der MPS-Analysen, bei welcher

der Eisengehalt der Proben 10 Minuten nach Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM mit und ohne Magnetfeld analysiert wurde (Abb. 34 A). Hierbei konnte gezeigt werden, dass unter einer Magnetfeld-Applikation mit  $56,28 \% \pm 8,43$  ( $n = 6$ ) signifikant mehr SO-Mag5-Partikel im Myokard nachzuweisen sind, als ohne Magnetfeld ( $23,63 \% \pm 6,93$ ;  $p = 0,012$ ;  $n = 7$ ). Um die bei der Injektion verloren gegangenen SO-Mag5-beladenen eCM auffangen zu können, wurde während und 10 Minuten nach der Injektion ein kleines Stück Zellstoff unter dem Herzen positioniert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass ohne Magnetfeld signifikant mehr MNP-Zell-Komplexe ( $39,75 \% \pm 8,92$ ) durch den Stichkanal verloren gehen und vom Zellstoff aufgenommen werden, als unter Magnet-Anwendung ( $11,41 \% \pm 9,18$ ;  $p = 0,049$ ; Abb. 34 A).

Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch in der integrierten Zellzahl widerspiegelt, erfolgte eine Quantifizierung der integrierten, eGFP<sup>+</sup>-eCM im Infarktbereich zu verschiedenen Zeitpunkten mit und ohne Magnetfeld-Applikation unter Analyse der Fluoreszenzintensität (Abb. 34 B). Es zeigte sich, dass bei einer Zellinjektion unter dem Einfluss eines Magnetfeldes eine signifikant erhöhte Anzahl integrierter eCM an Tag 2, 6 und 14 im Myokard nachzuweisen waren, als bei einer Zellinjektion ohne Magnet. So wurden 2 Tage nach der Zelltransplantation durchschnittlich  $24\,125$  Zellen  $\pm 2605$  eGFP<sup>+</sup>-eCM unter Magnet-Applikation gefunden, gegenüber  $7701$  Zellen  $\pm 2515$  integrierten Zellen ohne Magnetfeld-Anwendung ( $p < 0,01$ ). An Tag 3 nahm die Integrationszahl in beiden Gruppen ab. So verringerte sich der Anteil integrierter Zellen an Tag 3 unter Magneteinwirkung auf durchschnittlich  $17\,796$  Zellen  $\pm 3020$  und ohne Magnetkraft auf  $6480$  Zellen  $\pm 2057$ . An Tag 6 und 14 blieb der Anteil integrierter eGFP<sup>+</sup>-eCM (Tag 6:  $17\,678$  Zellen  $\pm 2612$ ; Tag 14:  $17\,469$  Zellen  $\pm 2192$ ) unter dem Einsatz eines Magnetfeldes konstant, wohingegen ohne Magnetfeld eine weitere signifikante Zellreduktion (Tag 6:  $2488$  Zellen  $\pm 441$ ; Tag 14:  $2283$  Zellen  $\pm 374$ ) zu verzeichnen gewesen ist (Abb. 34 B). Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass zu allen untersuchten Zeitpunkten deutlich mehr SO-Mag5-beladene eGFP<sup>+</sup>-eCM unter Verwendung eines Magnetfeldes in das infarzierte Myokard integrieren, als ohne Magnetfeld-Applikation.

Neben dem Effekt, dass bei einer Injektion von MNP-beladenen Zellen unter Applikation eines Magnetfeldes mechanisch mehr Zellen im Myokard festgehalten werden können, wurden auch andere Auswirkungen einer Magnet-basierten Zellinjektion in Bezug auf das proliferative und apoptotische Verhalten mittels immunhistochemischer Färbungen der injizierten Zell untersucht. Dabei wurde der Anteil apoptotischer eGFP<sup>+</sup>-eCM zum einen

durch eine Caspase3-Immunfluoreszenzfärbung (weiß) und zum anderen durch eine TUNEL-Färbung (rot) markiert. Caspase3, die zu den Cysteinproteasen gehört, spaltet dabei die Proteinketten spezifisch hinter einem Aspartatrest und führt daher zur Apoptose. Die Bezeichnung „TUNEL“ steht für „*TdT-mediated dUTP biotin nick end labeling*“ und dient der Darstellung der Zellkerne apoptotischer Zellen, bei denen der DNA Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert wurde.

Zur Bestimmung des proliferativen Anteils der injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM wurden die Proliferationsmarker Ki-67 (weiß) und PHH3 (weiß) eingesetzt. Dabei erkennt der Ki-67 Antikörper ein nukleäres Antigen, das nur in proliferierenden Zellen vorkommt und kontinuierlich während des gesamten Zellzyklus erkannt wird (Gerdes et al., 1984). Der Phosphohistone H3 (PHH3) Antikörper ist dagegen eines der 5-Haupt-Histonproteine, welche zusammen mit der genomischen DNA das Chromatin eukaryontischer Zellen bilden. Dieser Antikörper detektiert nur phosphorylierte Histone in der M-Phase des Zellzyklus.

Betrachtet man nun zuerst den Anteil apoptotischer eGFP<sup>+</sup>-Zellen, so zeigen repräsentative Aufnahmen in Abbildung 34 C, dass ohne Magnetfeld-Applikation 2 Tage nach der Zellinjektion deutlich mehr eGFP<sup>+</sup>-eCM Caspase3<sup>+</sup> nachzuweisen waren (rote Pfeile; Abb. 34 C), als unter dem Einsatz magnetischer Kräfte. Diese Beobachtung wurde auch durch eine quantitative Analyse des prozentualen Anteils Caspase3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM bestätigt (Abb. 34 D). Während sich ohne Magnetfeld 67,05 % ± 3,23 der eGFP<sup>+</sup>-eCM in der Apoptose befanden, waren unter Magnet-Anwendung mit einem Wert von 31,90 % ± 1,97 signifikant weniger eGFP<sup>+</sup>-Zellen apoptotisch ( $p < 0,001$ ). Auch drei Tage nach der Injektion konnten im Vergleich zu Tag 2, signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (- M: 64,71 % ± 2,39; + M: 28,78 % ± 1,66;  $p < 0,001$ ) nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass im Vergleich zu Tag 2 und 3, im weiteren Verlauf an Tag 6 und 14 ein deutlicher Rückgang in der Apoptose-Rate in beiden Gruppen zu verzeichnen gewesen ist. Der magnetische Effekt blieb jedoch bestehen (Abb. 34). Zu diesen Zeitpunkten unterschieden sich beide Kohorten nicht mehr signifikant voneinander, wobei die Apoptoseraten in der Gruppe mit Magnet-Applikation tendenziell immer noch niedriger waren (Tag 6, + M: 10,70 % ± 0,64, - M: 15,11 % ± 1,71; Tag 14, + M: 5,81 % ± 0,17, - M: 8,83 % ± 1,05, Abb. 34 D). Mittels TUNEL-Färbung werden die Ergebnisse der Caspase3-Färbung bestätigt. Anhand von repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 34 E ist ersichtlich, dass ohne Magnet-Applikation mehr eGFP<sup>+</sup>-eCM TUNEL<sup>+</sup>-Signale (rot) aufweisen, als bei einer Magnet-basierten Zellinjektion. Die weißen Pfeile markieren dabei TUNEL<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM, bei welchen der Zellkern defragmentiert vorliegt (Abb. 34 E).

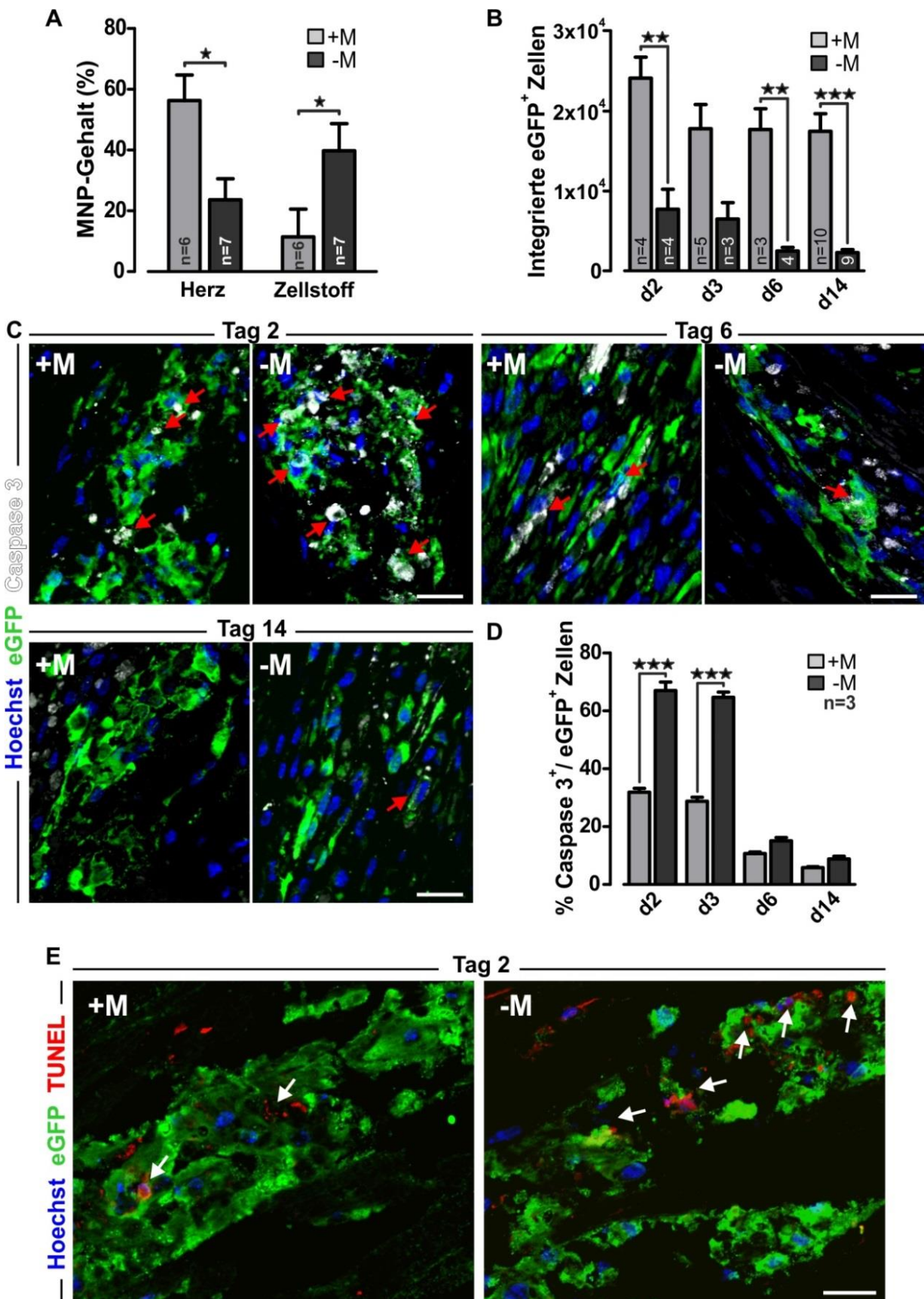


Abbildung 34: SO-Mag5-Gehalt, Zellintegrationsrate und Analyse des apoptotischen Anteils der intramyokardial-injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM mit und ohne Magnetfeld-Applikation zu verschiedenen Zeitpunkten

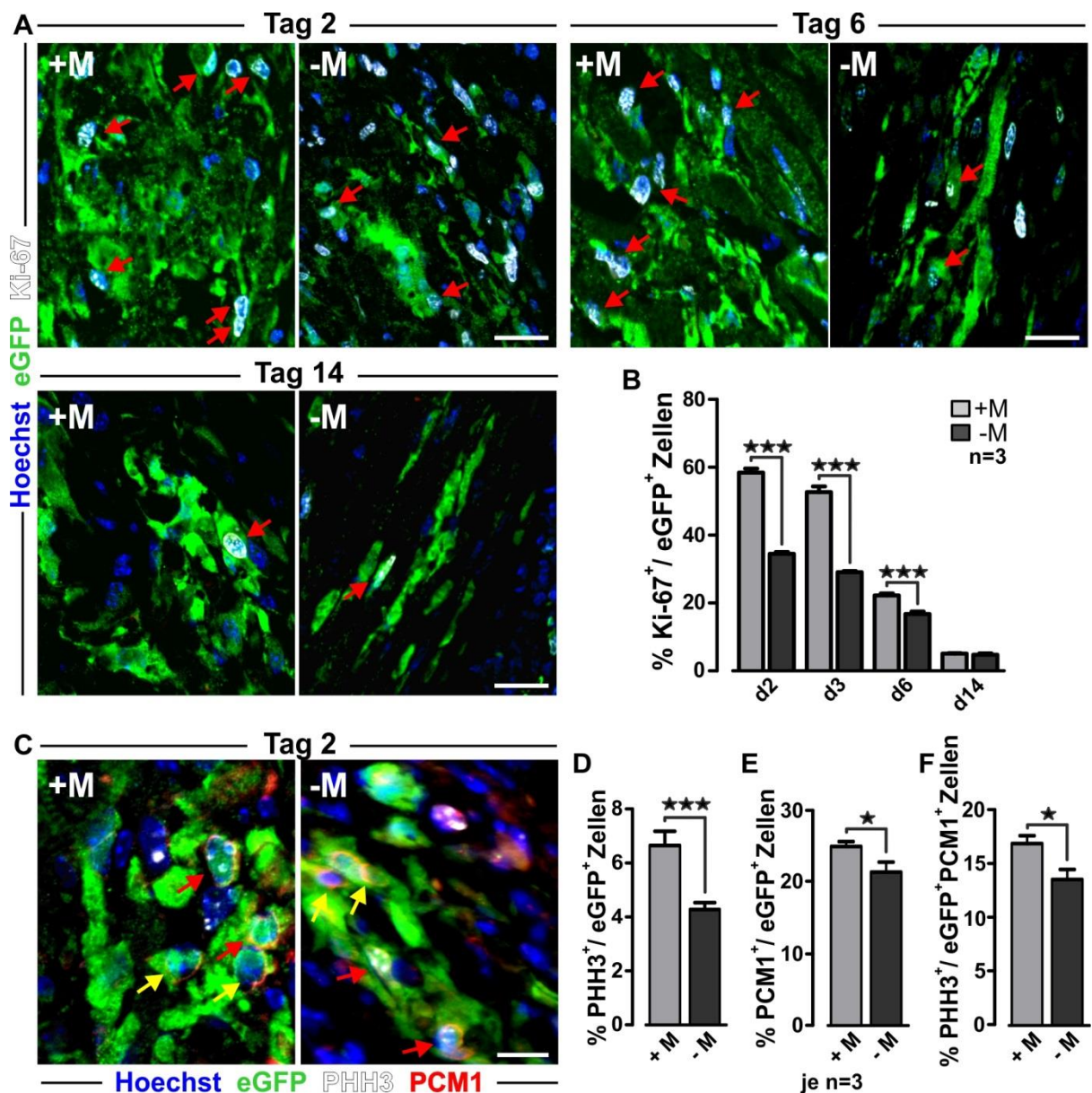


(A) MPS-Messungen verifizieren den prozentualen Anteil der von den eGFP<sup>+</sup>-eCM aufgenommenen SO-Mag5-Partikeln im Myokard bzw. in einem Stück Zellstoff, das während und 10 Minuten nach der Zellinjektion unter dem Herzen positioniert wurde, um überschüssige Komplexe aufzufangen. Die Injektion erfolgte mit (grau, n = 6) und ohne (schwarz; n = 7) Magnetfeld-Applikation (Herz: \*p = 0,012; Zellstoff: \*p = 0,049). (B) Anzahl integrierter eGFP<sup>+</sup>-eCM in das infarzierte Areal 2, 3, 6 und 14 Tage nach der Zelltransplantation mit (grau) und ohne (schwarz) Magnet-Applikation (d2, +/-M: n = 4; d3, +M: n = 5, -M: n = 3; d6, +M: n = 3, -M: n = 4; d14, +M: n = 10, -M: n = 9, \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). (C) Mit Hilfe einer Caspase3-Immunfluoreszenzfärbung (weiß, Zytoplasma-ständig) wurde der Anteil apoptotischer, eGFP<sup>+</sup>-eCM in Gewebeschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM verifiziert. Die roten Pfeile markieren Caspase3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM. Blau dargestellt ist die Kernfärbung mittels Hoechst; Maßstabsbalken: 25 µm. (D) Quantitative Analyse des prozentualen Anteils Caspase3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM zu allen vier Zeitpunkten mit (grau) und ohne (schwarz) Magnetfeld-Applikation (je n = 3, \*\*\*p < 0,001). (E) Repräsentative Aufnahmen einer TUNEL-Färbung der injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM mit und ohne Magnetfeld-Anwendung. Die weißen Pfeile markieren TUNEL<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM 2 Tage nach der Zelltransplantation. Blau dargestellt ist die Kernfärbung mittels Hoechst; Maßstabsbalken: 25 µm. + M = mit Magnet, - M = ohne Magnet

Im Hinblick auf die Analyse des proliferierenden Anteils der intramyokardial injizierten SO-Mag5-beladenen eCM zeigten immunhistochemische Färbungen (Abb. 35 A) als auch deren qualitative Analyse (Abb. 35 B), dass nach einer Magnet-basierten Zellinjektion deutlich mehr injizierte eCM proliferierten, als ohne Magneteinwirkung. So lag der Anteil Ki-67<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-Zellen unter Verwendung eines Magnetfeldes an Tag 2 mit 58,41 % ± 0,78, an Tag 3 mit 52,69 % ± 3,26 und an Tag 6 mit 22,22 % ± 0,97 signifikant höher, als ohne Magnetfeld-Applikation (Tag 2: 34,50 % ± 0,28; Tag 3: 29,08 % ± 0,43; Tag 6: 16,78 % ± 0,71; p < 0,001). Lediglich 14 Tage nach der Zelltransplantation wurden vergleichbare Werte in beiden Gruppen nachgewiesen (+ M: 5,07 % ± 0,18; - M: 4,78 % ± 0,39). Ebenso wie schon zuvor bei der Apoptose gesehen, waren die höchsten Proliferationsraten an den ersten postoperativen Tagen zu sehen. Zur weiteren Verifizierung dieser Ergebnisse wurde zusätzlich eine Analyse des proliferativen Verhaltens von eGFP<sup>+</sup>-eCM mit Hilfe des PHH3-Antikörpers an Tag 2 nach der Injektion durchgeführt. Hierbei zeigten repräsentative Aufnahmen, dass mit Magnet-Applikation mehr eGFP<sup>+</sup>-eCM proliferierten, als ohne Magnet (Abb. 35 C). Durch quantitative Analysen konnte ein signifikanter Anstieg von PHH3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-Zellen unter Anwendung eines Magnetfeldes aufgezeigt werden (+ M: 6,652 % ± 0,48; - M: 4,21 % ± 0,25; \*\*\*p < 0,0004; Abb. 35 D). Dabei fiel auf, dass im Vergleich zu den bereits oben beschriebenen Ki-67 Färbung, der prozentuale Anteil der PHH3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM in allen Gruppen deutlich geringer ausfiel. Dies ist jedoch dadurch zu erklären, dass die M-Phase nur einen sehr kleinen Anteil des Zellzyklus ausmacht und sich deshalb weniger PHH3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM detektieren ließen.

Um darüber hinaus den Anteil der proliferierenden CM im Vergleich zu den Ko-injizierten Fibroblasten und Endothelzellen bestimmen zu können, wurde zunächst der prozentuale Anteil der eGFP<sup>+</sup>-CM eruiert. Dafür erfolgte zusätzlich eine immunhistochemische Färbung mit einem PCM1 (Pericentriolar Material 1)-Antikörper (Bergmann und Jovinge, 2012), der eine spezifische Färbung der CM-Kerne erlaubt (kreisförmiges rotes Signal im äußeren Kernbereich). Hierbei wurde festgestellt, dass bei einer Magnet-basierten Zellinjektion mit 25,04 % ± 0,68 signifikant mehr eGFP<sup>+</sup>-PCM1<sup>+</sup>-CM nachzuweisen waren, als ohne Magnetfeld (21,46 % ± 1,39; p\*=0,035; Abb. 35 E). Betrachtet man nun zusätzlich den Anteil proliferierender eGFP<sup>+</sup>-CM 2 Tage nach der Injektion, so führte auch hier eine Magnet-basierten Zellinjektion zu einer signifikant erhöhten Proliferationsrate, im Vergleich zu einer Anwendung ohne Magnetfeld (\*p=0,0122, Abb. 35 F). Demnach konnten mit Magnet 16,89 % ± 0,73 PHH3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-PCM1<sup>+</sup>-eCM nachgewiesen werden, ohne Magnet waren es dagegen nur 13,55 % ± 0,93. In Abbildung 35 C markieren die roten Pfeile proliferierende eGFP<sup>+</sup>-CM (PHH3<sup>+</sup>-PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM), die gelben Pfeile deuten auf PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-CM hin.

Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass zum einen durch eine Magnet-basierten Zellinjektion signifikant mehr Zellen in der Myokardnarbe festgehalten werden können, als ohne Magnetfeld. Darüber hinaus führte eine Magnet-Anwendung in der frühen postoperativen Phase aber auch zu einem verringerten Anteil apoptotischer eGFP<sup>+</sup>-eCM bei einem zugleich erhöhten proliferativen Anteil. Darüber hinaus waren zusätzlich auch der Anteil der intramyokardial enthaltenden eGFP<sup>+</sup>-CM sowie der Anteil proliferierender eGFP<sup>+</sup>-CM mit Magnet-Applikation signifikant erhöht.



**Abbildung 35: Analyse des proliferierenden Anteils der intramyokardial injizierten eGFP<sup>+</sup>-eCM mit und ohne Magnetfeld-Applikation zu verschiedenen Zeitpunkten**

(A) Mit Hilfe einer Ki-67-Immunfluoreszenzfärbung (weiß, kernständig) wurde der Anteil proliferierender, eGFP<sup>+</sup>-eCM in Gewebeschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der intramyokardialen Injektion mit und ohne Magnetfeld von SO-Mag5-beladenen eCM verifiziert. Die roten Pfeile markieren Ki-67<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM. Blau dargestellt ist die Kernfärbung mittels Hoechst; Maßstabsbalken: 25 µm. (B) Quantitative Analyse des prozentualen Anteils Ki-67<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM zu allen vier Zeitpunkten mit (grau) und ohne (schwarz) Magnetfeld-Applikation (je n = 3, \*\*\*p<0,001). (C) Repräsentative Aufnahmen einer PHH3-Immunfluoreszenzfärbung (weiß, kernständig) von eGFP<sup>+</sup>-eCM 2 Tage nach der intramyokardialen Injektion mit und ohne Magnetfeld-Anwendung. Zur Identifizierung von eGFP<sup>+</sup>-eCM wurde gleichzeitig eine Immunomarkierung mit Antikörpern gegen PCM1 (rot, kernständig) durchgeführt. Blau dargestellt ist die Kernfärbung mittels Hoechst. Die roten Pfeile markieren PHH3<sup>+</sup>-PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM, die gelben Pfeile zeigen PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM; Maßstabsbalken: 10 µm. (D) Quantitative Analyse der PHH3<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM (Links; \*\*\*p<0,0004), der PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-Zellen (Mitte; \*p=0,035) sowie der PHH3<sup>+</sup>-PCM1<sup>+</sup>-eGFP<sup>+</sup>-eCM (Rechts; \*p=0,0122; je n = 3).

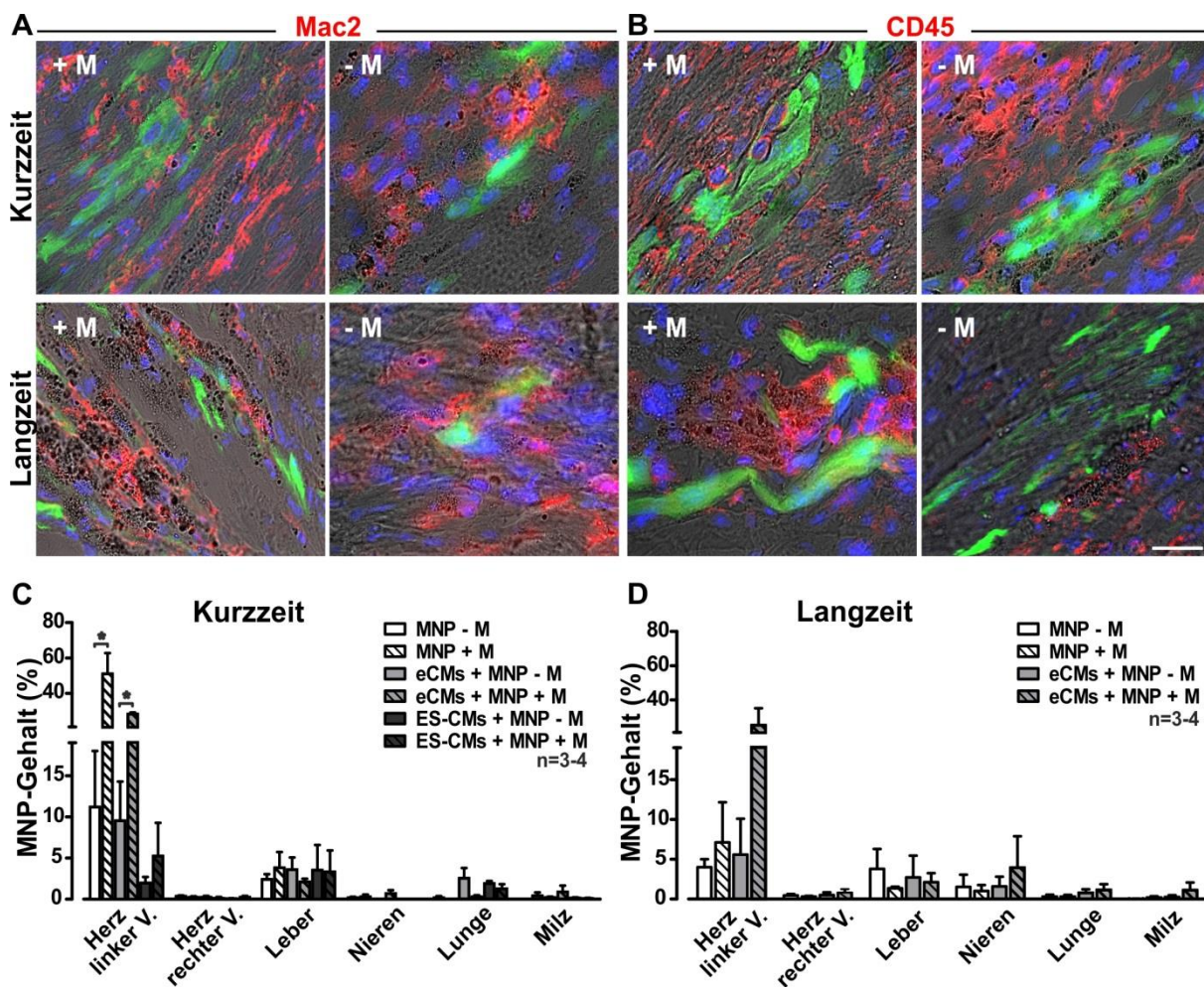
### 3.2.10 Untersuchung des Verbleibs intramyokardial injizierter SO-Mag5-Partikel

Um zu überprüfen, welchem Schicksal die intramyokardial injizierten SO-Mag5-Partikel / Partikeln aus den SO-Mag5-beladenen Zellen nach einer intramyokardialen Injektion mit und ohne Magnetfeld Applikation im Myokard unterliegen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen Makrophagen (Mac2) und gegen Zellen des hämatopoetischen Systems (CD45<sup>+</sup>-Zellen) durchgeführt (Abb. 36 A, B). Hierbei zeigen repräsentative Aufnahmen, dass eine Vielzahl der SO-Mag5-Partikel sowohl mit als auch ohne Magnetfeld-Applikation 14 Tage nach der Injektion nicht mehr intrazellulär in den eGFP<sup>+</sup>-eCM aufzufinden waren, sondern in Clustern im Myokard vorlagen (Abb. 36 A). Viele der SO-Mag5-Partikel waren durch Mac2<sup>+</sup>-Zellen aufgenommen, was auf eine Phagozytose durch Makrophagen hinweist. Da es sich bei Makrophagen um Zellen des hämatopoetischen Systems handelt, ließen sich diese ebenfalls mit einem CD45-Antikörper anfärben (Abb. 36 B). Diese Beobachtungen stellten sich sowohl nach 14 Tagen als auch nach 56 Tagen ein.

Um diese Ergebnisse weiter verifizieren und den Verbleib der MNP im Körper der Maus weiter aufklären zu können, wurde die Eisenkonzentration 14 und 56 Tage mit Hilfe der MPS-Messmethode nach einer intramyokardialen Injektion von SO-Mag5-Partikeln in verschiedenen Organen der Maus bestimmt (Abb. 36 C, D). Hierdurch sollte gezeigt werden, ob und in welchem(n) Organ(en) sich die Partikel ansammeln. Zum einen wurden „reine“ SO-Mag5-Partikel ohne Zellen, zum anderen SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM in kryoinfarzierte Mausherzen injiziert. Die Injektionen wurden mit und ohne Magnetfeld-Applikation durchgeführt. Untersucht wurden neben dem Herzen (linker Ventrikel = Injektionsstelle; rechter Ventrikel = native Kontrolle), die Leber, die Nieren, die Lunge und die Milz. In Abbildung 36 C wird deutlich, dass der höchste SO-Mag5-Gehalt sowohl bei einer reinen SO-Mag5-Injektion, als auch nach Transplantation von SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM im Injektionsbereich des linken Ventrikels zu detektieren war. Hierbei konnten durch Einsatz eines Magnetfeldes signifikant mehr SO-Mag5-Partikel (51,09 % ± 11,65; \*p=0,025) / SO-Mag5-beladene eCM (28,29 % ± 0,9; \*p=0,018) im Myokard festgehalten werden, also ohne Magnet-Applikation (MNP - M: 11,19 % ± 6,81; eCM +MNP - M: 9,54 % ± 4,75). Auch nach Injektion von SO-Mag5-beladenen ES-CM ließen sich mit 5,24 % ± 4,05 deutlich mehr Zellen durch das eingesetzte Magnetfeld im linken Ventrikel nachweisen, als ohne Magnetfeld mit einem Wert von 1,97 % ± 0,74. Im nativen Herzgewebe (rechter Ventrikel) sowie in der Niere und Milz konnten dagegen in allen drei

Gruppen nur sehr geringe Eisenmengen detektiert werden (alle Werte  $< 1,5\%$ ; Abb. 36 C). In der Lunge wurden lediglich in der eCM + MNP - M-Gruppe  $2,54\% \pm 0,82$  der Partikel nachgewiesen, alle andere Gruppen wiesen Eisenwerte  $< 1,8\%$  auf. In der Leber wurden in allen Gruppen neben dem linksventrikulären Myokard die zweithöchsten SO-Mag5-Ablagerungen gemessen. Die Messwerte lagen in allen Gruppen zwischen  $2\%$  und  $4,5\%$ .

Nach 56 Tagen nahm der SO-Mag5-Gehalt im Injektionsbereich im linken Ventrikel in allen Gruppen drastisch ab (Abb. 36 D). So wurden bei einer reinen SO-Mag5-Injektion  $4,01\% \pm 1,01$  und bei SO-Mag5-beladenen eCM  $5,57\% \pm 4,52$  der MNP ohne Magnetfeld-Anwendung detektiert. Die größte Abnahme konnte jedoch in der MNP + M-Gruppe verzeichnet werden. In dieser Gruppe wurde nach 56 Tagen nur noch  $7,12\% \pm 5,04$  der SO-Mag5-Partikel im Vergleich zu  $51,09\% \pm 11,65$  nach 14 Tagen nachgewiesen werden. Dies ist eine Abnahme von rund  $44\%$ . Dagegen wurde in der eCM + MNP + M-Gruppe nach 56 Tagen mit  $20,23\% \pm 14,81$  nur eine geringe Abnahme des SO-Mag5-Gehalts im Vergleich zu 14 Tagen mit einem Wert von  $28,29\% \pm 0,9$  festgestellt (Abb. 36 D). Im Hinblick auf den MNP-Gehalt im rechten Ventrikel, sowie in der Lunge und in der Milz, konnten auch 56 Tage nach der Injektion keine erhöhten MNP-Ablagerung detektiert werden (alle Werte unter  $1\%$ ). Ein leichter Eisenanstieg wies lediglich die Niere auf. Vor allem in der eCM + MNP + M-Gruppe ließ sich mit  $3,94\% \pm 3,94$  ein höherer SO-Mag5-Anteil verzeichnen, als nach 14 Tagen ( $0,7\% \pm 0,34$ ). Auch in der Leber konnte, wie schon im 14-tägigen Untersuchungszeitraum zuvor, ein SO-Mag5-Anteil zwischen  $2\%$  und  $4,5\%$  nachgewiesen werden (Abb. 36 D).



**Abbildung 36: Immunhistochemische Färbungen gegen Makrophagen und CD45<sup>+</sup>-Zellen sowie prozentualer Anteil der intramyokardial injizierten SO-Mag5-Partikel / SO-Mag5-beladenen Zellen in verschiedenen Organen der Maus**

(A) Repräsentative Aufnahmen einer Mac2-Färbung (rot) zur Identifizierung von Makrophagen in Gewebeschnitten nach Injektion von SO-Mag5-beladenen eGFP<sup>+</sup>-eCM mit und ohne Magnetfeld-Anwendung. Blau dargestellt ist die Kernfärbung mittels Hoechst. (B) Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen durch Nachweis einer CD45-Expression (rot). Blau dargestellt ist wiederum die Kernfärbung mittels Hoechst; Maßstabsbalken: 25 µm. (C - D) MPS-Messungen verifizieren den prozentualen Anteil der intramyokardial injizierten SO-Mag5-Partikel / SO-Mag5-beladenen eCM bzw. ES-CM an Tag 14 (C) und an Tag 56 (D) in verschiedenen Organen der Maus. Hierzu wurden SO-Mag5-Partikel sowie SO-Mag5-beladene eCM / ES-CM (jeweils gelöst in 5 µl 20 % IMDM) in kryoinfarzierte Mausherzen (CD1-WT) injiziert. Die Injektion wurde jeweils mit (10 Minuten) und ohne Magnetfeld-Applikation durchgeführt. Als Proben dienten neben dem Herzen (linker Ventrikel = Injektionsstelle; rechter Ventrikel = unbehandelte Kontrolle), die Lunge, die Leber, die Nieren und die Milz (je n = 3 - 4; *MNP - M* vs. *MNP + M*  $p < 0,0252$ ; *eCM + MNP - M* vs. *eCM + MNP + M*  $p < 0,0179$ ).

## 4. Diskussion

### 4.1 MNP-basierte zelluläre Ersatztherapie in Kombination mit einem geeigneten Magnetfeld

In dieser Arbeit sollte das Potential und die Auswirkung einer Magnetischen Nanopartikel (MNP)-basierten zellulären Ersatztherapie unter Verwendung eines geeigneten Magnetfeldes auf die Zellintegrationsrate sowie die Herzfunktion von verschiedenen intramyokardial injizierten Zellen wie Knochenmarkzellen (BMC), embryonale Kardiomyozyten (eCM) und ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten (ES-CM) zu verschiedenen Zeitpunkten (nach zwei und acht Wochen) untersucht werden.

Es zeigte sich, dass sowohl bei kardialen Zellen (eCM und ES-CM) als auch bei autologen BMC eine MNP-Beladung mit SO-Mag5 in Kombination mit einer Magnet-basierten intramyokardialen Injektion, im Vergleich zu einer herkömmlichen Zelltransplantation ohne MNP / Magnet-Einsatz, zu den höchsten Zellintegrationsraten und zu einer deutlich verbesserten Herzfunktion führten.

Es ist schon seit längerem bekannt, dass es während und unmittelbar nach der intramyokardialen Injektion zu einem immensen Zellverlust kommt, der sich in einer geringen Zellintegrationsrate im Infarktareal widerspiegelt (Cheng et al., 2012; Fernandes et al., 2010; Terrovitis et al., 2010). So konnten im Rattenmodell 24 Stunden nach der Zellinjektion nur noch ca. 24 % der in das Myokardgewebe eingebrachten Zellen nachgewiesen werden, nach 14 Wochen fiel die Zahl weiter auf 15 % ab (Müller-Ehmsen et al., 2002). Auch andere Studien im Rattenmodell belegten diese drastische Zellabnahme (Fukushima et al., 2007). So berichteten Suzuki et al., 2004 im Rattenmodell von einer nur 7,4 prozentigen Zellinjektionsrate drei Tage nach der Zelltransplantation. Auch in humanen Studien (Fernandes et al., 2010) sowie im Mausmodell konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. So zeigte eine Studie aus unserer eigenen Arbeitsgruppe, dass zwei Wochen nach der Injektion deutlich weniger als 10 % der transplantierten Zellen (rund 2000 Zellen) im Myokard nachzuweisen waren (Roell et al., 2002a). In neueren Studien wird die Ursache für den enormen Zellverlust in der Prozedur der Zelltransplantation, d.h. initial in der Ausspülung der Zellen über den Blutfluss des Stichkanals und / oder die Koronarvenen gesehen, bedingt durch die Kontraktion des schlagenden Herzens (Suzuki et al., 2004; Teng et al., 2006; Terrovitis et al., 2009). Die Folge dessen ist eine limitierte Zellintegration in das infarzierte Myokard und eine daraus resultierende, nur moderate Verbesserung der

Herzfunktion sowie eine schlechte Langzeit-Überlebensrate der transplantierten Zellen (Cheng et al., 2010).

Dagegen hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass sich bei einer Magnet-basierte Zellinjektion die Zellintegrationsrate nach 14 Tagen bis auf das Achtfache (rund 16 000 eCMs +M versus rund 2 000 eCMs –M) steigern lässt, gegenüber einer Injektion ohne Magnetfeld. Im Hinblick auf die ES-CM wurden zwar geringere Integrationsraten als bei den injizierten eCM nachgewiesen, rund 4000 Zellen mit Magnet im Vergleich zu rund 600 Zellen ohne Magnet, aber der qualitative Effekt des Magneten blieb bestehen, da sich auch hier eine Verbesserung der Zellintegrationsrate um den Faktor 7 einstellte. Die Effektivität der Magnet-basierten Zellinjektion wird hierbei besonders deutlich, da in früheren Studien nur eine Ko-Injektion von ES-CM und Fibroblasten zu einer zählbaren Zellintegration ins Myokard führte (Kolossoff et al., 2006). In der vorliegenden Studie führte eine Kombination aus SO-Mag5-beladenen ES-CM und Magnet-basierter Zellinjektion nicht nur zu einer deutlich verbesserten Zellintegrationsrate von ES-CM, sondern ermöglichte auch den Verzicht auf eine Ko-Transplantation von Fibroblasten, welche in einer früheren Studie für das Auftreten von Tumoren verantwortlich gemacht wurde (Kolossoff et al., 2006). Auch bei den untersuchten BMC wurde der Effekt einer MNP-basierten Zellinjektion sichtbar. Hierbei wurde die integrierte Zellzahl nach 14 Tagen um den Faktor 5 gesteigert werden, wenn die Transplantation der SO-Mag5-beladen BMC unter Magnetfeld-Anwendung stattfand. Über eine verbesserte Zellintegration wurde auch in einer anderen Studie im Rattenmodell unter Verwendung von *Cardiosphere-derived cells* (CDC), die mit superparamagnetischen Mikrosphären (SPM) beladen und unter Magnet-Applikation injiziert wurden, berichtet (Cheng et al., 2010). Hier wurde drei Wochen nach der Zelltransplantation eine auf das Dreifache gesteigerte Zellintegration nachgewiesen, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Magnetanwendung.

Für die *in vivo*-Detektion der intramyokardial injizierten Zellen wurden eCM vor der Transplantation mit einem Luciferase-Virus transduziert. Dieses Verfahren ermöglichte die Identifikation der Zellen mittels Biolumineszenz-Aufnahmen *in vivo*, sodass bereits vor der Funktionsdiagnostik eine ausreichende Zellintegrationsrate sichergestellt werden konnte. Repräsentative Aufnahmen sowie Analysen der Biolumineszenz-Intensität illustrierten 7 Tage nach Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM unter Applikation eines Magnetfeldes ein signifikant höheres Biolumineszenz-Signal. Leider nahm das Biolumineszenz-Signal im



weiteren Zeitverlauf stetig ab und fehlte nach acht Wochen völlig. Einerseits könnte diese Abnahme durch den Verlust der injizierten Zellen über die Zeit begründet sein. Jedoch belegten die Analysen der Zellintegration in dieser Arbeit, für welche nicht Luciferase-transduzierte Zellen verwendet wurden, nach zwei und acht Wochen gerade ein langfristig verbessertes Überleben der MNP-beladenen Zellen. Wahrscheinlicher ist deshalb, dass die Doppelbelastung einer SO-Mag5-Beladung über Nacht und einer zusätzlichen MNP-basierten Virustransduktion für 30 Minuten innerhalb eines nur sehr kurzen Zeitraums von 24 Stunden ein zu großes Stresspotential für die frisch isolierten eCM darstellte. Dafür spricht auch, dass die Mortalitätsrate der Tiere, denen diese Zellen transplantiert wurden (ca. 60 %), gegenüber Tieren, denen nicht transduzierte SO-Mag5-beladenen eCM verabreicht wurden (ca. 10 %), deutlich anstieg. Nachdem es mit der Methode der Biolumineszenzdetektion nicht möglich gewesen ist, langfristig die Zellintegrationsrate zu monitoren, wurden die LZ-Herzen ebenso wie die KZ-Herzen histologisch aufgearbeitet und die integrierte Zellzahl über die Oberflächenfluoreszenz der transplantierten Zellen bestimmt.

Neben eher kurzfristigen Experimenten (14 Tage, KZ) wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Langzeit-Untersuchungen (LZ) über acht Wochen durchgeführt. Für diese Untersuchungen lag der Fokus besonders auf den kardialen Progenitorzellen, da schon verschiedene Studien aufzeigen konnten, dass sich durch den Einsatz autologer Stammzellen die Regeneration des funktionellen Myokards nicht deutlich verbesserte (van der Bogt et al., 2008; Roell et al., 2002a; Tang et al., 2003). Zudem sind diese Zellen nicht zur Kontraktion befähigt, können sich nicht zu Kardiomyozyten (CM) oder Endothelzellen transdifferenzieren, zeigen keine elektrische Kopplung mit dem umliegenden Myokard und sind häufig nur temporär im Infarktareal resident (Breitbach et al., 2007; Nygren et al., 2004; Reinecke, 2002). Die mehrfach beobachtete verbesserte Pumpfunktion der Herzen nach Transplantation kardialer Progenitorzellen wird dabei vorwiegend parakrinen Effekten zugeschrieben (Buja und Vela, 2010; Sassoli et al., 2011). Weiterhin zeigten Studien unter Verwendung von eCM, dass diese Zellen nach der Transplantation in das infarzierte Myokard einwachsen und mit dem umliegenden nativen CM elektromechanisch koppeln, sowie zu einer Verbesserung der Herzfunktion führen (van Laake et al., 2007; Qiao et al., 2011; Roell et al., 2007). Zudem wurde in einer neueren Studie neben den bereits genannten Faktoren herausgearbeitet, dass nur eine Transplantation von eCM im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Skelettale Myoblasten (SM) die Infarktgröße deutlich verringert, die

linksventrikuläre Dilatation abschwächt und zu einer LZ-Zellintegration der transplantierten Zellen führte (Paulis et al., 2013). Aus diesem Grund wurden die eCM zur Validierung des Magneteffektes im Hinblick auf eine langfristige Zellintegration verwendet.

Analog zu den zuvor beschriebenen KZ-Analysen konnte auch acht Wochen nach der intramyokardialen Zellinjektion eine um den Faktor 3,5 verbesserte Zellintegration unter dem Einfluss eines Magnetfeldes im Vergleich zur Kontrolle ohne Magnet nachgewiesen werden. Weiterhin belegten histologische Untersuchungen, dass die transplantierten eCM zu beiden Untersuchungszeitpunkten dazu befähigt waren, in einen gereiften Phänotyp zu differenzieren. Auffällig ist jedoch, dass acht Wochen nach dem operativen Eingriff nur noch halb so viele eCM im Infarktareal nachgewiesen werden konnten, gegenüber einem zwei-wöchigen Untersuchungszeitraum. Dies lässt sich zum einen durch eine mögliche Entzündungsreaktion und Zellabstoßung der injizierten transgenen Zellen durch das Myokard erklären. So könnten schädliche Stoffwechselprodukte der residenten nekrotischen Zellen im Myokard sowie die mangelnde Nährstoffversorgung im Infarktareal für den zunehmenden Zellverlust nach acht Wochen verantwortlich sein (Frangogiannis et al., 2002; Tarzami, 2011). Es konnte bereits im Rattenmodell gezeigt werden, dass bedingt durch die ischämischen Bedingungen im Infarktareal, sich etwa 90 % der intramyokardial injizierten neonatalen CM in der Apoptose befanden und abstarben (Zhang et al., 2001). Allerdings ist bekannt, dass dieser Prozess vorwiegend in den ersten 4-7 Tagen nach der Zelltransplantation abläuft. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten massiven Zellintegration nach 14 Tagen ist daher dieser Prozess als Ursache für die abnehmende Zellintegrationsrate ausgeschlossen. Eine andere denkbare Erklärung für die deutlich geringere Zellintegrationsrate nach acht Wochen könnte eine mögliche Toxizität der MNP und / oder eine Immunreaktion der Zelle auf die MNP-Beladung sein. Dabei hängt die Toxizität von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise der Konzentration, der hydrodynamischen Größe, der Oberflächenladung und der Art der Hüllschicht des MNPs ab (Bhirde et al., 2011). Allerdings wurde die Abnahme der Zellzahl auch bei Zellen ohne MNP-Beladung beobachtet und verschiedene Toxizitäts-Analysen stellten zudem in der vorliegenden Arbeit heraus, dass der verwendete MNP SO-Mag5 in beiden verwendeten Konzentrationen (20 und 200 pg Fe / Zelle) keinen negativen Einfluss auf die Zellvitalität von adhären kardialen Zellen (eCM und ES-CM) und hämatopoetischen Suspensionszellen (BMC) ausübt und daher keine toxische Wirkung hat. Als Vitalitätstests kamen dabei der LDH-, der MTT- und der WST-1-Test zum Einsatz, drei kolorimetrische Verfahren, die alle auf

der Umsetzung und Messung eines Farbstoffes beruhen. Diese drei verschiedenen Analyseverfahren wurden gewählt, da bereits aus der Literatur bekannt ist, dass eine mögliche Toxizität der MNP mit diesen Verfahren nachgewiesen werden kann, da die MNP mit den verwendeten Farbstoffen interagieren (Laaksonen et al., 2007; Wörle-Knirsch et al., 2006). So beruhen der MTT- und der WST-1-Test auf der Aktivitätsmessung mitochondrialer Dehydrogenasen und dienen daher zum Nachweis der intakten Atmungskette in Zellen. Beim LDH-Test wird die Lactatdehydrogenase als ein zytoplasmatisches Enzym im Überstand des Zellsystems als Parameter für die Membranintegrität genutzt. Da diese Reaktion praktisch in allen Zellen stattfindet, zeigt ein erhöhter LDH-Wert eine Gewebsschädigung an (Rae, 1975). Zusätzlich zu der vorliegenden Arbeit konnten anderen Studien bereits nachweisen, dass eine Immun- oder Entzündungsreaktion nicht durch das Magnetische Targeting verstärkt wird (Au et al., 2009; Bourrinet et al., 2006; Cheng et al., 2010) und dass die intravasale Gabe von MNP keine toxische Wirkung auf die inneren Organe ausübt (Bonnemain, 1998). So demonstrierten Jain et al., 2008 durch histologische Scans im Rattenmodell, dass ein Teil der i.v. injizierten MNP (10 mg Fe / kg) zwar in der Leber, in der Milz und in den Nieren nachzuweisen waren, es jedoch zu keinen offensichtlich abnormen Veränderungen dieser untersuchten Organe kam. Auch unter Verwendung von SPMs zur Beladung von CDCs konnte kein toxisches Verhalten dieser Partikel auf die Zellvitalität, die Proliferation, die Apoptose, die Adhäsion und den antigenen Phänotyp festgestellt werden (Cheng et al., 2010). Ebenso wurde das kardiale und endotheliale Differenzierung-Potential *in vivo* nicht durch den Einsatz von SPIO-beladenen CDCs beeinflusst (Cheng et al., 2010). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein negativer Einfluss auf die Morphologie und die kardiale Differenzierung von eCM und ES-CM nachgewiesen werden, da Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten sowohl bei SO-Mag5 beladene eCM als auch bei ES-CM eine deutliche Expression von  $\alpha$ -Aktinin zeigten. Zudem wurden auch bei der Beladung von eCM mit SPIOs keine toxischen Effekte gesehen (Au et al., 2009). Auch im Hinblick auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen konnten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Patch-Clamp-Analysen keine Unterschiede in der Ionenleitfähigkeit oder der Leckstrom-Aktivität zwischen SO-Mag5-beladenen und unbeladenen eCM nachgewiesen werden. In gleicher Weise zeigten auch Kirchner et al., 2005 durch Patch-Clamp-Analysen von zwei verschiedenen Zelllinien (chinesische Hamsterovarienzellen = CHO, basophile Rattenleukämiezellen = BR), die zuvor mit kolloidalen Cadmiumselenid (CdSe) Nanopartikeln beladen wurden, dass keine Veränderungen in der Funktion der Ionenkanäle und in den

charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften zwischen unbeladenen und beladenen Zellen vorlagen. Auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten keine Anzeichen für eine vorliegende oder entstehende Zellerstörung von SO-Mag5-beladenen eCM gefunden werden, da das Zytoskelett der Zellen eine deutlich intakte Struktur aufwies.

Die Ursache(n) für die gute Zellverträglichkeit der verschiedenen MNP ist / sind bis heute zwar noch nicht vollständig entschlüsselt, aber eine mögliche Ursache hierfür könnte die Art der Hüllschicht sein. So ist beispielsweise SO-Mag5 von Siliziumoxid (SO) umhüllt, was sich anscheinend besser auf die Zellvitalität auswirkt als eine Beschichtung mit Polyethylenimin (PEI). Der so beschichtete MNP heißt PEI-Mag2 und wurde in der vorliegenden Arbeit auch als potentieller MNP für eine Zellbeladung untersucht. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich eine PEI-Mag2-Beladung in beiden Konzentration (20 und 200 pg Fe / Zelle) auf alle verwendeten Zelltypen toxisch auswirkte. Auch in einer anderen Studie zeigte sich die toxische Wirkung einer PEI-Beschichtung von Eisen-Oxid Nanopartikeln (IONPs) auf die Zellvitalität von Nierenzellen des Hamsters (BHK21) *in vitro* (Arsianti et al., 2010).

Neben den Partikeloberflächeneigenschaften, die für die Toxizität der verschiedenen MNP entscheidend ist, sind auch der hydrodynamische Durchmesser und die Oberflächenladung der MNP im Hinblick auf eine Kapillarzirkulation im Körper essentiell. So weist SO-Mag5 im Vergleich zu PEI-Mag2 einen geringeren hydrodynamischen Durchmesser auf sowie eine negativ-geladene Oberfläche (Mykhaylyk et al., 2007, 2009, 2010; Tresilwised et al., 2010). Durch die negativ-geladene Oberfläche von SO-Mag5 und der ebenso negativ-geladenen vaskulären Endothelschicht (Raz et al., 1988) kann so eine Anziehung zwischen dem MNP und der Endothelschicht vermieden werden. Dies ist entscheidend, um eine Akkumulation zwischen dem MNP und dem Gewebe verhindern zu können. Daneben ist auch ein geringer hydrodynamischer Durchmesser essentiell, um eine Gewebeakkumulation zu umgehen, da kleinere Komplexe besser durch das Kapillarsystem zirkulieren können, als große Komplexe. Durch diese Eigenschaften ist SO-Mag5 vor allem im Hinblick auf eine zukünftige intravasale Anwendung von großer Bedeutung, damit eine Partikelaggregation unter Magnetfeld-Applikation verhindert werden kann, um Embolien zu vermeiden (Gupta et al., 2007).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der SO-Mag5-beladenen eCM gaben nicht nur Einblicke in die strukturelle Beschaffenheit des Zytoskeletts der Zellen, sondern zeigten auch wo sich die MNP nach der zellulären Aufnahme intrazellulär ablagert. Durch die vorliegende Arbeit sowie zahlreiche andere Studien konnte deutlich belegt werden, dass Nanomaterialien von verschiedenen Zelltypen aufgenommen werden können (Geiser et al., 128

2005; Rejman et al., 2004; Stearns et al., 2001), die genauen Aufnahmemechanismen sind allerdings noch weitestgehend unklar (Long et al., 2007). Unterschiedliche Aufnahmemechanismen wie beispielsweise eine Diffusion durch die Zellporen, die Endozytose oder die Phagozytose sind hier denkbar (Dobrovolskaia and McNeil, 2007; Rothen-Rutishauser et al., 2006; Slowing et al., 2011; Torney et al., 2007). Dabei versteht man unter dem Begriff Endozytose die Aufnahme von Makromolekülen oder partikulären Substanzen in eine Zelle durch begrenzte Abschnitte der Plasmamembran, die das aufzunehmende Material einschließen und durch Abschnürung intrazelluläre Vesikel bilden. Die Phagozytose ist dabei eine Form der Endozytose, die die Aufnahme extrazellulärer, fester Partikel durch die Zelle beschreibt. Dabei kommt es zur Bildung großer Vesikel, den sogenannten Phagosomen (Conner und Schmid, 2003; Okamoto, 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SO-Mag5-Partikel nicht frei in der Zelle vorlagen, sondern in membrangebundenen Einschlüssen, den sogenannten Autophagosomen, in großer Anzahl eingekapselt waren. Diese Erkenntnis stützt den Aufnahmemechanismus der Phagozytose. Auch in anderen Studien konnte eine intrazelluläre Einkapselung der Nanopartikel nachgewiesen werden. So konnten Stearns et al., 2001 nachweisen, dass sich in A549 Zellen, die mit ultrafeinen Titandioxid-Partikeln für 24 Stunden inkubiert wurden, membranumhüllte Partikel-Einschlüssen in großer Zahl bildeten. Auch bei einer Beladung von CHO Zellen mit Silica Nanopartikeln konzentrierten sich diese in vesikulären Strukturen in der Nähe des Zellkerns, jedoch wurden keine Partikel im Zellkern gefunden (Gemeinhart et al., 2005). Diese Erkenntnisse deckten sich mit anderen Studien über fluoreszierenden MNP. Hier wurden zwar fluoreszierende Silica umhüllte Nanopartikel in HeLa Zellen (Xing et al., 2005) oder fluoreszierende Mikrosphären in B16F10 Zellen (Zelllinie des aggressiven murinen Melanoms B16F10; Rejman et al., 2004) gefunden, eine Kernlokalisierung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden keine MNP im Zellkern lokalisiert.

Neben den bereits viel diskutierten unterschiedlichen Aufnahmemechanismen der MNP in die Zelle ist auch die Untersuchung des weiteren Schicksals der MNP essentiell. In der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich durch Differentialkontrastanalysen an konsekutiven Gewebeschnitten gezeigt werden, dass acht Wochen nach der intramyokardialen Injektion der SO-Mag5-beladenen eCM die MNP nicht mehr interzellulär, sondern geclustert neben den transplantierten eGFP<sup>+</sup>-Zellen vorlagen. Dies konnte sowohl bei Tieren mit als auch ohne Magnet-Applikation während des Injektionsprozesses

nachgewiesen werden und lässt darauf schließen, dass erstens, die MNP anscheinend von den Zellen nach der Transplantation ins infarzierte Myokard abgegeben werden und zweitens, der Abbauprozess der MNP unabhängig von der Magneteinwirkung abläuft. Zudem zeigten Immunfluoreszenzfärbungen, dass der größte Anteil der SO-Mag5-Partikel in Makrophagen und nur wenige MNP in Fibroblasten vorlagen. In gleicher Weise zeigten Sosnovik et al., 2007, dass eine Vielzahl von MNP durch die im Gewebe vorliegenden Makrophagen absorbiert wurden. Daneben konnten auch andere Partikel, wie die superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel (SPIO), die bereits als Kontrastmittel für MRT-Untersuchungen eingesetzt wurden, in infiltrierenden Makrophagen nachgewiesen werden (Ruehm et al., 2001). So führte eine Verabreichung des bereits in klinischen Studien eingesetzten SPIOs Feridex (bestehend aus Ferumoxid) bei einer Konzentration von 4,8 mg Fe / kg Körpergewicht im Kaninchenmodell zu einer signifikanten Aufnahme dieser Partikel in Makrophagen (Briley-Saebo et al., 2008). Auch Cheng et al., 2010 postulierten bereits eine Nanopartikelabsorption durch Makrophagen. Dabei konnte durch andere Studien gezeigt werden, dass im Vergleich zur natürlich einsetzenden Makrophagen-Einwanderung, als Reaktion auf die durch die generierte Myokardverletzung (in der vorliegenden Arbeit der Myokardinfarkt) entstandene Entzündung, die MNP-Beladung der Zellen zu keiner verstärkten Makrophagen-Infiltration führte (Au et al., 2009; Bourrinet et al., 2006; Cheng et al., 2010).

Eine mögliche Erklärung für die MNP-Abgabe der integrierten Zellen stellt der Prozess der Exozytose dar. Bei der Exozytose werden Partikel in Vesikeln eingeschnürt und zur Zellmembran transportiert. Dort verschmelzen die Vesikel- und die Zellmembran miteinander und die Partikel werden so aus der Zelle geschleust, um beispielsweise von Makrophagen aufgenommen und abgebaut zu werden. Diese Erklärung wird auch durch die Studie von Slowing et al., 2011 gestützt, in der zum ersten Mal gezeigt werden konnte, dass Säugetierzellen Mesoporous Silica Nanopartikel (MSNs) durch den Prozess der Exozytose ausschleusen.

Weiterführend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, was mit den MNP nach dessen Ausschleusung aus den Zellen und der Aufnahme durch Makrophagen geschieht. Die Untersuchungen ergaben, dass sowohl 14 als auch 56 Tage nach der intramyokardialen Injektion große Anteile der SO-Mag5-Partikel / SO-Mag5-beladenen Zellen im Infarktareal und nur geringe Eisenanteile in der Leber nachzuweisen waren. In allen anderen Organen (Milz, Lunge, rechter Ventrikel) fanden sich keine oder nur geringe Spuren der MNP. In

gleicher Weise konnte auch bei einer Studie im Schafmodell nur geringe Ablagerungen von systemisch injizierten SPIOs in der Milz und in den Nieren nachgewiesen werden, jedoch wurden keine Partikelspuren in der Gallenblase und im Urin gefunden (Hellstern et al., 2006). Bereits in früheren Studien wurde die MNP-Ablagerung innerhalb des Körpers untersucht. Neben Jain et al., 2008 postulierten auch Neuwelt et al., 2009, dass Eisenoxid-Nanopartikel, die vor allem in der Leber zu finden waren, keine Toxizität aufzeigten und eine gute Biokompatibilität aufwiesen. Daneben spezifizierte Neuberger et al., 2005, dass bei Patienten, denen SPIOs für die Diagnostik im MRT injiziert wurden, eine Stunde nach der Injektion 82,6 % der Partikel in der Leber und 6,2 % in der Milz nachzuweisen waren. Die MNP scheinen somit hauptsächlich von der Leber aufgenommen, zerlegt und in den natürlichen Eisengehalt des Körpers überführt zu werden. Diese Hypothese wird auch von Cheng et al., 2010 gestützt, die injizierte SPMs auch vom körpereigenen Eisenspeicher aufgenommen sehen. Dabei ist die Leber der wichtigste Speicherort für Eisen. Circa 1 g Eisen wird dabei im Ferritin der Hepatozyten und der retikuloendethelialen Makrophagen gespeichert. Dieser Eisenspeicher umfasst dabei in der Ratte zwischen 40 und 200 mg Eisen, beim Menschen liegt der Speicher bei ca. 3500 mg. Der Speicher dient als Puffer gegen Eisenmangel und Eisenüberladung. Bei einer Eisenüberladung, auch Hämosiderose genannt, wird Eisen vermehrt in Hämosiderin abgelagert, was toxische Zellschädigungen zur Folge haben kann. Klinische Studien (CADUCEUS, [www.clinicaltrials.org](http://www.clinicaltrials.org)) belegten jedoch, dass nur ca. 5 mg Eisen zusätzlich von den injizierten SPM-beladenen CDCs vom Körper aufgenommen und im körpereigenen Eisenspeicher abgelagert werden. Durch diesen nur geringen Eisenzusatz einer MNP-Behandlung kann daher das Auftreten einer Hämosiderose ausgeschlossen werden. Durch die vorliegende Arbeit und andere Studien konnte daher gezeigt werden, dass die Nanopartikel nach der Injektion überwiegend von der Leber aufgenommen und schlussendlich in den körpereigenen Eisenspeicher überführt werden.

Um die Auswirkungen der zuvor beschriebenen stark verbesserten Zellintegrationsrate einer MNP-basierten Zelltransplantation unter Applikation eines Magnetfeldes auch im Hinblick auf die Hämodynamik verifizieren zu können, wurde eine intrakardiale Funktionsmessung durchgeführt. Hierbei zeigte sich zunächst bei Tieren nach Transplantation von eCM ohne Magnetfeld-Anwendung eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion, im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zelltherapie nach zwei und acht Wochen. Dass eine

Transplantation von eCM / von ES-CM zu regionalen und globalen Verbesserungen der Herzfunktion führt, konnte bereits in frühere Studien herausgestellt werden (Kolossoff et al., 2006; van Laake et al., 2007; Qiao et al., 2011; Roell et al., 2002a; Tang et al., 2003). Wurde jedoch eine Zellinjektion unter Applikation eines Magnetfeldes in Kombination mit SO-Mag5-beladenen eCM / ES-CM durchgeführt, bewirkte dies eine weitaus höhere, signifikante Steigerung der LVEF gegenüber einer standardmäßig durchgeführten reinen Zellinjektion. Im Hinblick auf weitere kardiale Parameter wie das Enddiastolische Volumen, der Enddiastolische Druck, das Schlagvolumen und das Herzzeitvolumen konnten auch hier bei einer Magnet-basierte Zellinjektion beider kardialer Zelltypen deutliche Verbesserungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte diese Studie zeigen, dass auch nach acht Wochen die Verbesserung der kardialen Pumpfunktion Bestand hatte. In anderen Studien hingegen konnte kein funktioneller LZ-Effekt nachgewiesen werden. So zeigten van Laake et al., 2007 im Mausmodell, dass eine Injektion von humanen CM, die aus embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden, nach vier Wochen zwar die Herzfunktion verbesserte, sich dieser Effekt jedoch nicht mehr nach 12 Wochen einstellte. Dies wurde durch die Tatsache begründet, dass trotz Zell-Maturation die Zahl der transplantierten Zellen zu gering ausfiel, um langfristige funktionale Verbesserungen herbeiführen zu können. Problematisch erscheint bei dieser Arbeit jedoch das Xeno-Tx-Modell. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Verwendung eines syngenen Mausmodells gezeigt werden, dass eine Magnet-basierte Zellinjektion verschiedener Zelltypen nicht nur zu einer signifikant verbesserten Zellintegrationsrate, sondern darüber hinaus zu einer deutlich verbesserten Hämodynamik nach zwei und auch nach acht Wochen führte. Auch verschiedene Studien von Cheng et al. konnten zeigen, dass nach 24 Stunden und nach drei Wochen die Magnet-basierte Zellinjektion zu einer höheren Zellintegrationsrate und zu einer verbesserten Funktion führte (Cheng et al., 2010, 2012). Hierbei wurden CDCs mit SPMs beladen und intramyokardial in ein ischämisches Rattenherz unter Applikation eines 1,3 Tesla Magneten injiziert. Drei Wochen nach dem operativen Eingriff konnte auch hier eine um den Faktor 3 verbesserte Zellintegrationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Magnetfeld nachgewiesen werden. Zudem führte die Magnet-basierte Injektion zu einer deutlichen verbesserte LVEF gegenüber einer Injektion von CDCs ohne Magnet. Bemerkenswert ist, dass trotz der Unterschiede in den gewählten Konditionen zwischen der Studie von Cheng et al., 2010 und dieser Arbeit der Effekt des Magneten Bestand hatte. So wurden bei Cheng et al. SPMs als Partikel, CDCs als Zelltyp, eine permanente LAD-Ligatur als Infarktmodell und Ratten als



Versuchstiere verwendet. In dieser Arbeit wurden hingegen MNP als Partikel, BMC, eCM und ES-CM als Zelltypen, der Kryoinfarkt (KI) als Infarktmodell und Mäuse als Versuchstiere verwendet. Dabei weist der Ansatz dieser Arbeit im Vergleich zur Studie von Cheng et al., 2010 mehrere methodische Vorteile auf. Der erste Vorteil betrifft die Wahl des gewählten Läsionsmodells. So liegt der Vorteil des hier angewandten KIs gegenüber einer permanenten LAD-Ligatur in der Infarktgröße und Lokalisation. Bei der Methode der Kryoinfarzierung entspricht die Infarktgröße immer exakt der Fläche der aufgetragenen Sonde, d.h. die Lokalisation des Infarktareals kann unabhängig von der Koronarmorphologie frei gewählt werden und es entsteht eine transmurale Narbe. Bei einer permanenten LAD-Ligatur, wie sie bei Cheng et al., 2010 verwendet wurde, kommt es zu einer Unterbrechung der myokardialen Durchblutung und daher zur Sauerstoffunterversorgung des Herzmuskels, was zur Nekrose des betroffenen Areals führt. Die Infarktgröße ist vom Ort der Ligatur sowie der Koronarmorphologie abhängig und daher sehr variabel. Um die therapeutischen Effekte der eingebrachten Zellen auch im Hinblick auf die Herzfunktion und ventrikuläre Vulnerabilität besser beurteilen und vergleichen zu können, stellt daher die Kryoläsion durch ihre definierte Größe und Lokalisation für diesen Zweck die bessere Methode dar. Der zweite Vorteil dieser Studie liegt in der Untersuchung von drei verschiedenen Zelltypen. Cheng et al. konnten den Effekt des Magnetens nur bei CDCs nachweisen. Diese Arbeit konnte jedoch zeigen, dass die Wirkung des Magnetfeldes nicht nur auf einen Zelltyp beschränkt ist, sondern bei drei verschiedenen Zelltypen zu großen Erfolgen in Hinblick auf eine deutlich erhöhte Zellintegrationsrate und auf eine verbesserte Hämodynamik führte. Hierdurch konnte ein zelltypspezifisches Verhalten einer MNP-basierten Zellinjektion ausgeschlossen werden. Der dritte Vorteil umfasst die Charakterisierung des verwendeten MNPs und des angelegten Magnetfeldes. Während Cheng et al. keine genaueren Angaben über die verwendete Eisenmenge, die Beladungseffizienz der SPMs oder die Zellverteilung durch den Magneten machten, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen über die Beladungseffizienz, die intrazelluläre Ablagerung sowie die elektrophysiologischen Eigenschaften des verwendeten SO-Mag5-Partikels durchgeführt. Auch das angelegte Magnetfeld wurde berechnet und die Zellanziehung simuliert sowie experimentell eruiert. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit aber auch der Mechanismus, der für die deutlich verbesserte Zellintegration einer Magnet-basierten Zellinjektion verantwortlich ist, untersucht.

Um überprüfen zu können, ob schon eine alleinige Injektion der MNP (ohne Zellzusatz) einen Effekt auf die Reizweiterleitung im geschädigten Myokard ausübt, wurden in der vorliegenden Arbeit auch die elektrophysiologischen Eigenschaften in Form einer Untersuchung über das Auftreten von ventrikuläre Tachykardien (VTs) durchgeführt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, dass durch die elektrisch leitenden MNP eine Reizweiterleitung der Herzimpulse ermöglicht werden könnte, die bei einem MI durch den Verlust der funktionellen CM und ihrer Gap Junctions verloren geht. Es ist bereits bekannt, dass neben dem Anwachsen der eCM die Unterdrückung der Entstehung von VTs von der Bildung von funktionellen Gap Junctions (besonders Connexin43) abhängt, da eine elektrische Kopplung zwischen den transplantierten Zellen und dem umliegenden Gewebe gewährleistet werden muss (Soonpaa et al., 1994). So führte beispielsweise eine Integration von Cx43-exprimierenden Myozyten zu einer verbesserten Reizweiterleitung im Herzen und zu einem verminderten Auftreten von Post-Infarkt-Arrhythmien (Roell et al., 2007). In einer neueren Studie aus unserer eigenen Arbeitsgruppe führte auch eine Injektion von lentiviral transduzierten SM sowie ein direkter Gentransfer des Cx43-Gens in das Läsionsareal von kryoinfarzierten Mäusen zu einer deutlichen Reduktion von VTs (Roell et al. 2014, submitted). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass eine alleinige Injektion von MNP keinen positiven Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards und des Läsionsbereich ausübt, d.h. die Funktion der Gap Junctions durch eine MNP-Injektion nicht ersetzt werden kann. Allerdings wurden auch keine störenden Interferenzen durch eine MNP-Injektion nachgewiesen. Dies konnte auch schon durch die bereits zuvor diskutierten Patch-Clamp-Analysen bestätigt werden, da auch hier kein elektrophysiologischer Unterschied zwischen MNP-beladenen und unbeladenen eCM nachzuweisen war.

Eine Injektion von SO-Mag5-beladenen eCM führte dagegen zu einer signifikanten Abnahme in der Auslösbarkeit von VTs. Dies konnte sowohl durch die vorliegende Arbeit als auch von Roell et al., 2007 gezeigt werden. Wurde der Injektionsprozess zusätzlich unter Magnetfeld-Applikation durchgeführt, so hatte dies eine weitere Abnahme der VT-Auslösbarkeit zur Folge. Dies ist, ebenso wie die bereits zuvor diskutierte deutlich verbesserte Herzfunktion, auf die erhöhte Zellintegrationsrate zurückzuführen.

Um weitere mögliche Effekte einer Magnet-basierten Zellinjektion im Hinblick auf eine Neovaskularisierung zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Endothelzellen unter Verwendung des Pecam-Antikörpers durchgeführt. Sowohl mit als auch ohne Magnet-Applikation konnte zu beiden Zeitpunkten eine Pecam-Expression im Infarktareal bei beiden kardialen Zelltypen festgestellt werden, wenn auch nur moderat. Eine verbesserte Neovaskularisierung, welche in anderen Studien gezeigt werden konnte (Kocher et al., 2001; Shintani et al., 2009; Xiang et al., 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gesehen. Allerdings konnten bei den LZ-Studien eGFP<sup>+</sup>-eCM detektiert werden, die eine Ko-Expression mit Pecam aufzeigten. Dieser Effekt wurde aber nur bei einer Magnet-basierten Zellinjektion gesehen. Es handelt sich dabei vermutlich um einzelne Endothelzellen, die neben CM und Fibroblasten aus embryonalen Herzen isoliert wurden und durch eine MNP-Beladung und Magnetfeld-Applikation in einer höheren Zahl im Infarktareal festgehalten werden konnten.

Zum Nachweis der injizierten BMC wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen gegen CD45<sup>+</sup>-Zellen des hämatopoetischen Systems sowie Färbungen gegen unterschiedliche Antigene, wie endotheliale Zellen, Makrophagen und Myofibroblasten angefertigt. Hierbei konnten jedoch keine positive Ko-Färbung mit den DS-Red<sup>+</sup>-BMC gezeigt werden. Lediglich eine Färbung mit dem zytoplasma-ständigen mesenchymalen Zellmarker Vimentin zeigte eine deutliche Ko-Lokalisation mit den DS-Red<sup>+</sup>-BMC auf. Ursache hierfür könnte die für die MNP-Beladung benötigte über Nacht Kultivierung der BMC sein, welche das Anwachsen der adhärennten hämatopoetischen Zellen begünstigt. Da für die intramyokardiale Injektion kein Ablösungsprozess der Suspensionszellen durchgeführt wurde, ist es wahrscheinlicher, dass die adhärennten hämatopoetischen Zellen nicht mit den nicht-adhärennten Zellen aufgenommen und transplantiert wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine MNP-basierte Zellinjektion unter Magnet-Applikation zu einer deutlich erhöhten Zellintegrationsrate (eine Steigerung bis auf das Achtfache) bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen (BMC, eCM und ES-CM) führte. Dies hatte sowohl in KZ- als auch in LZ-Untersuchungen nach einer Injektion von eCM und ES-CM eine deutlich verbesserte Herzfunktion und ein vermindertes VT-Auftreten zur Folge. Im LZ-Verlauf wurden die SO-Mag5-Partikel von den injizierten Zellen abgegeben und von Makrophagen im Myokard aufgenommen. Eine vermehrte Immunreaktion konnte durch den Einsatz von MNP nicht detektiert werden.

## 4.2 Mechanismus einer verbesserten Zellintegrationsrate nach MNP-Beladung und Magnetfeld unterstützter Transplantation

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass eine Magnet-basierte Zellinjektion in Kombination mit einer zuvor durchgeführten MNP-Beladung von verschiedenen Zelltypen, die Zellintegrationsrate, die Hämodynamik und das Auftreten von VTs deutlich verbesserte. Ein Kernpunkt der vorliegenden Arbeit bildete dabei die Untersuchung der Mechanismen, die für diese Effekte verantwortlich sind. Um diese entschlüsseln zu können, wurden mechanische und zellbiologische Phänomene untersucht.

Der mechanische Ansatz geht davon aus, dass durch Applikation eines Magnetfeldes schon intraoperativ, durch Unterbindung des Zell-Refluxes aus dem Stichkanal, mechanisch mehr Zellen im Myokard festgehalten werden können, im Vergleich zu einer Anwendung ohne Magnet. Durch die Ergebnisse der MPS-Analysen zur Bestimmung des Eisengehaltes der injizierten SO-Mag5-Partikel ließen sich diese Vermutung bestätigen. So konnten unter Magnetfeld-Applikation signifikant mehr SO-Mag5-Partikel im Myokard und gleichzeitig signifikant weniger Partikel in der Thoraxhöhle nachgewiesen werden, als ohne Magnet-Anwendung. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die hohe Eigenmagnetisierung der Zellen sein, wodurch die Zellen schon während des Injektionsprozesses durch das äußerlich angebrachte Magnetfeld mechanisch in der sich bildenden Myokardtasche festgehalten werden und danach vermehrt ins Myokard integrieren. Durch die so magnetisierten Zellen ist eine gegenseitige Zellanziehung denkbar, was die Bildung von Zellclustern ermöglicht. Diese Möglichkeit wurde auch von Cheng et al., 2010 in Betracht gezogen, da hier ebenso die transplantierten CDCs drei Wochen nach der Injektion in multi-zellulären Cluster vorlagen.

Die Clusterbildung könnte dabei auch eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gesehenen zellbiologischen Phänomene sein. So lag der Anteil an proliferierenden eGFP<sup>+</sup>-Zellen bei einer Transplantation unter Magnetfeld-Applikation gerade in den ersten beiden Tagen postoperativ deutlich höherer, als bei einer Injektion ohne Magnet und der Anteil apoptotischer eGFP<sup>-</sup>-Zellen mit Magnet-Applikation fiel zugleich deutlich geringer aus. Auch im Rattenmodell konnte dieser zellbiologische Effekt nachgewiesen werden. So zeigte eine Studie von Cheng et al., 2012, dass 3 Wochen nach der Zellinjektion von CDCs deutlich mehr proliferierende Ki-67<sup>+</sup>-CDCs und weniger apoptotische TUNEL<sup>+</sup>-CDCs in der Gruppe mit Magnet-Applikation nachzuweisen waren. Auch Paulis et al., 2013 postulierten, dass von einer eCM-Injektion zugleich eine anti-apoptotische Wirkung und eine gesteigerte

Proliferation ausgeübt wird. Zudem konnten auch Jackson et al., 2002 zeigen, dass eine Transplantation von eCM eine anti-apoptotische Wirkung auf das umliegende Myokard ausübte. So bewahrten integrierten CM Zellen aus der *border zone* teilweise vor dessen Untergang, was zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion führte.

Der Vorteil der Clusterbildung liegt dabei in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen den injizierten Zellen, was eine Kopplung der Zellen untereinander begünstigt (Johnson et al., 2001; Lin et al., 2008; Wang et al., 2009). Diese wirkt sich anscheinend positiv auf das proliferative und das anti-apoptotische Verhalten der Zellen aus, da sich die gegenseitige Kopplung der Zellen untereinander vermutlich essentiell auf die Zellvitalität auswirkt. Dafür würde auch sprechen, dass andere Studien fehlenden Zell-Zell-Kontakte von transplantierten Zellen mit dem umliegenden Myokard oder mit der ECM für das geringe Anwachsen der Zellen im Zeitverlauf verantwortlich machen (Nahrendorf et al., 2010; Passier et al., 2008; Wu et al., 2011). Die Vitalität der Zellen ist dabei ein entscheidender Faktor, da sich die eingebrachten Zellen den Bedingungen des ischämischen Infarktareals stellen müssen. Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass die Ausbildung eines Narbengewebes im ischämischen Infarktareal das Entwicklungsschicksal von adulten Stammzellen nach deren Transplantation begrenzt und beeinflusst (Jessup und Brozena, 2003; Laflamme und Murry, 2005; Murry, 2005). So konnte bereits im Rattenmodell gezeigt werden, dass bedingt durch die ischämischen Bedingungen im Infarktareal, sich etwa 90 % der intramyokardial injizierten neonatalen CM in der Apoptose befanden und abstarben (Zhang et al., 2001).

Zusammenfassend erhärten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die Literatur folgende Annahme: Während der Zellinjektion werden mechanisch deutlich mehr Zellen durch die MNP-assoziierte Magnettherapie in der Myokardtasche festgehalten. Dies wiederum führt neben einer verbesserten Zellintegrationsrate auch zu einer Clusterbildung der Zellen, wodurch Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden, was wiederum die Proliferation der transplantierten Zellen stärkt und die Zell-Apoptose abgeschwächt. Rückkoppelnd wirkt sich dies wiederum positiv auf die Zellintegrationsrate aus, die schließlich in einer verbesserten Herzfunktion resultiert. An dieser Stelle greifen dann die bisherigen Ansätze / Erklärungen für die auftretende verbesserte Herzfunktion bei einer Transplantation von Stammzellen oder deren Derivate. So erklärten Paulis et al., 2013, dass die verringerte Infarktgröße nach einer Injektion von eCM durch eine elektrische Kopplung dieser Zellen untereinander und mit dem Nativmyokard zu erklären ist, wodurch sich die eingebrachten eCM am Kontraktionsprozess beteiligen und daher den auf die Ventrikelwand

ausgeübten Stress verringern können. Andere Studien machten demgegenüber die Ausschüttung parakriner Faktoren für das Überleben von kardialen Zellen und die verbesserte Funktion sowie für die positive Beeinflussung der Angiogenese verantwortlich (Fernandes et al., 2010; Gnechi et al., 2008; Ptaszek et al., 10; Shintani et al., 2009). Vermutlich führt die MNP-assoziierte Magnettherapie zu einer Verstärkung dieser oben genannten Effekte, bedingt durch die vermehrte Zellzahl während der Injektion in Kombination mit einer Clusterbildung und der daraus entstehenden vermehrten und / oder verbesserten Ausbildung von Zell-Zellkontakten.

Somit konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass zugleich mechanische und zellbiologische Faktoren, wie Proliferation und Apoptose der Zellen, von einer Magnet-basierten Zellinjektion positiv beeinflusst werden, in einer deutlich gesteigerten Zellintegrationsrate und verbesserten Herzfunktion resultiert.

### 4.3 Ausblick

Durch diese Arbeit konnten deutlich die Vorteile und Möglichkeiten einer MNP-basierten Zellinjektion in Kombination mit einer lokalen Magnetfeldanwendung aufgezeigt werden. Der nächste sinnvolle Schritt besteht nun darin, dieses vielversprechende Verfahren vom Mausmodell ins Großtiermodell zu übertragen, um untersuchen zu können, ob auch hier eine Magnet-basierte Zellinjektion zu einer deutlich verbesserten Zellintegrationsrate führt. Bei erfolgreicher Etablierung dieser Methode im Großtiermodell wäre langfristig auch eine klinische Anwendung denkbar.

Neben dem Verfahren der intramyokardialen Zellinjektion bietet die MNP-assoziierte Magnettherapie aber auch noch andere interessante Therapieformen auf. Ein alternativer und weniger invasiver Therapieansatz umfasst dabei die intravenöse Injektion verschiedener therapeutischer Substanzen in Kombination mit gefäß- und mikrozirkulationsgängigen MNP und speziell designter extrakorporaler Magnetfelder. Dies würde eine lokale Positionierung und eine örtlich gezielte und weniger invasive Therapieform ermöglichen.

Um dieses Verfahren methodisch etablieren zu können, sollen im ersten Schritt *ex vivo*-Perfusionsexperimente durchgeführt werden, bei denen ein Mauserz retrograd über die Aorta im Langendorff-Perfusionssystem mit MNP / Transgen-Komplexen perfundiert wird. Die Perfusion soll dabei unter einer Magnet-Applikation durchgeführt werden, damit sich die Komplexe lokal im gewünschten Areal positionieren lassen, um gezielt den

Infarktbereich beispielsweise durch die Transgene therapieren zu können. Nach der Etablierung dieses Verfahrens kann dann über eine Perfusion mit verschiedenen therapeutischen Substanzen nachgedacht werden. Hierbei wären verschiedene Gene / Transgene (Scimia et al., 2014), Lenti- oder Adenoviren (Connexin43-Lentivirus; Roell et al., 2007), VEGF-Adenoviren (Haider et al., 2004; Iwasaki et al., 2011; Symes et al., 1999; Tao et al., 2011) oder Proteine (anti-Apoptose Protein B-cell lymphoma 2; Dai et al., 2008; Iwata et al., 2010) denkbar. So wurde bereits die MNP-assozierte Magnettherapie in der endothelialen Zellersatztherapie erfolgreich eingesetzt. Hier ermöglichte das magnetische Targeting eine gezielte Anhaftung von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen und von pulmonalen Rinderendothelzellen (bPAECs = *bovine pulmonary endothelial cells*) im geschädigten vaskulären System, trotz der vorherrschenden hohen Blutflussgeschwindigkeit (Kyrtatos et al., 2009; Pislaru et al., 2006; Wenzel et al., 2012). Auch Shimizu et al., 2007 nutzen MNP-beladene Fibroblasten zur Re-Besiedelung von Gefäßen ohne Zellschicht. Neben der Beladung und lokalen Positionierung von Zellen finden MNP auch Anwendung als Vehikel für biologische und pharmakologische Substrate. So ist das magnetische Targeting ebenso in der Zell-basierten Gentherapie ansässig. Bereits Trueck et al., 2012 verifizierten, dass sich mit diesem Verfahren auch der lentivirale Gentransfer, genauer gesagt, die Transduktionseffizienz von Endothelzellen optimieren lässt. Auch eine gezielte Gentherapie ohne zusätzlichen Zelleinsatz konnte durch das magnetische Targeting verbessert werden. Einer Arbeitsgruppe von Zhang et al., 2012 gelang so im Rattenmodell die lokale Positionierung des MNP-beladenen Wachstumsfaktors VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) im Myokard, welches die Gefäßneubildung anregte.

Somit könnte das Verfahren der intravenösen Injektion in Kombination mit einer MNP-assozierten Magnettherapie auch für eine myokardialen Therapieform herangezogen werden, um das *kardiale Remodeling* nach einem Myokardinfarkt zu verbessern und die elektrophysiologischen Eigenschaften zu modulieren.





## 5. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in der westlichen Hemisphäre. Der Verlust von funktionellen Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) und die fehlende Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels nach einem akuten Myokardinfarkt vermindern die Pumpfunktion des Herzens und führen zum klinischen Bild der Herzinsuffizienz. Als aussichtsreiche kausale Therapieform zur Regeneration akuter oder chronisch ischämischer Herzerkrankungen wird bereits der zelluläre Gewebeersatz (Kardiomyoplastie) wissenschaftlich behandelt. Ein großes Hindernis dieser Therapieform stellt jedoch ein großer Zellverlust dar, bedingt durch den Injektionskanal und die Herzkontraktion während und unmittelbar nach der intramyokardialen Injektion, was in einer geringen Zellintegrationsrate im Infarktareal und in einer nur moderaten Verbesserung der Herzfunktion resultiert. Um dieser Problematik entgegenzuwirken, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zelltypen, wie Knochenmarkzellen (BMC), embryonale Kardiomyozyten (eCM) und ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten (ES-CM), mit Magnetischen Nanopartikeln (MNP) beladen und in Kombination mit einem geeigneten Magnetfeld intramyokardial injiziert, um die Zellintegrationsrate sowie die Herzfunktion für eine Kurz- und Langzeit- Therapie deutlich verbessern zu können.

Zunächst wurden verschiedene *in vitro* Vor-Experimenten unter Verwendung von eCM (E13.5 – 15.5) durchgeführt, um den für eine Zellbeladung am besten geeigneten MNP charakterisieren zu können. Dabei zeigten MPS- (*magnetic particle spectroscopy*) und Toxizitätsanalysen, dass der MNP SO-Mag5 eine gute Zellbeladungseffizienz aufwies und keine toxischen Auswirkungen auf die Zell-Vitalität hatte.

Basierend auf den Ergebnissen der *in vitro* Vor-Versuche wurden für die *in vivo* Experimente BMC, eCM und ES-CM mit SO-Mag5-Partikeln beladen und intramyokardial in ein kryoinfarziertes Mausherz injiziert. Um die transplantierten Zellen postoperativ bereits im nativen Myokard identifizieren zu können, wurden transgene Mäuse und Stammzelllinien verwendet, die das Reportergen eGFP bzw. DS-Red exprimierten. Während und 10 Minuten nach der Injektion wurde ein 1,3 Tesla Stabmagnet in einem Abstand von 5 mm über dem Herzen positioniert. In der Kontrollgruppe wurde auf das Magnetfeld verzichtet.

Mit Magnetischem Targeting konnte bei allen verwendeten Zelltypen 14 Tage nach der Zelltransplantation eine bis zu 7-fach verbesserte Zellintegrationsrate nachgewiesen werden, gegenüber einer Injektion ohne Magnet, bei einem Großteil der Zellen bereits während und

unmittelbar nach der Injektion aus dem Myokard gespült wurden. Quantitative Fluoreszenz-Untersuchungen und Biolumineszenz-Analysen von Luciferase transduzierten eCM bestätigten die signifikant verbesserte intramyokardiale Zellintegration, bedingt durch das Magnetische Targeting. Die Effektivität der Magnet-basierten Zellinjektion wurde besonders durch Langzeitversuche deutlich, da auch hier 8 Wochen nach der Zellinjektion eine dreifach verbesserte Zellintegrationsrate unter Magnet-Applikation festgestellt werden konnte. Zudem wurden mit Hilfe der links- und rechtsventrikulären Katheterisierung eine deutlich verbesserte Herzfunktion bei Kurz- und Langzeit-Studien sowie eine verminderte elektrische Vulnerabilität in Kurzzeit-Studien unter Einsatz eines Magnetfeldes aufgezeigt.

Um den Mechanismus der Magnet-basierten Zellinjektion entschlüsseln zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit MPS-Analysen zur Bestimmung des Eisengehaltes der injizierten SO-Mag5-Partikel durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch das Magnetische Targeting schon intraoperativ, durch Unterbindung des Zell Refluxes aus dem Stichkanal, mechanisch mehr Zellen im Myokard festgehalten werden können, als ohne Magnet-Applikation. Zudem zeigten Caspase3 und Ki-67 Färbungen eine signifikant geringere Apoptose- und höhere Proliferationsraten in der frühen postoperativen Phase (Tag 2 und 3) bei der Magnet-basierten Zellinjektion auf. Zusätzliche Phosphohistone-H3-Färbungen bestätigten das signifikant erhöhte proliferative Verhalten der unter Magnetkraft injizierten SO-Mag5 beladenen eCM.

Zusammenfassend konnten durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass die MNP-basierten Zellinjektion unter lokaler Magnetfeldanwendung zu einer signifikant verbesserten Zellinjektionsrate (bis Faktor 7) und zu einer deutlich verbesserten Herzfunktion, auch im Langzeitverlauf, führte. Dabei spielen zugleich mechanische und biologische Mechanismen eine entscheidende Rolle.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., and Lübke, A.S. (2000). Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting. *Cancer Res.* *60*, 6641–6648.
- Angert, D., Berretta, R.M., Kubo, H., Zhang, H., Chen, X., Wang, W., Ogorek, B., Barbe, M., and Houser, S.R. (2011). Repair of the Injured Adult Heart Involves New Myocytes Potentially Derived From Resident Cardiac Stem Cells. *Circ. Res.* *108*, 1226–1237.
- Arsianti, M., Lim, M., Marquis, C.P., and Amal, R. (2010). Polyethylenimine Based Magnetic Iron-Oxide Vector: The Effect of Vector Component Assembly on Cellular Entry Mechanism, Intracellular Localization, and Cellular Viability. *Biomacromolecules* *11*, 2521–2531.
- Au, K.-W., Liao, S.-Y., Lee, Y.-K., Lai, W.-H., Ng, K.-M., Chan, Y.-C., Yip, M.-C., Ho, C.-Y., Wu, E.X., Li, R.A., et al. (2009). Effects of iron oxide nanoparticles on cardiac differentiation of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *379*, 898–903.
- Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., and Robbins, R.C. (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* *428*, 668–673.
- Barratt, G. (2003). Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *60*, 21–37.
- Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., and TILL, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* *197*, 452–454.
- Benden, C., Goldfarb, S.B., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Christie, J.D., Dipchand, A.I., Dobbels, F., Levvey, B.J., Lund, L.H., Meiser, B., et al. (2014). The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official pediatric lung and heart-lung transplantation report--2014; focus theme: retransplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* *33*, 1025–1033.
- Bergmann, O., and Jovinge, S. (2012). Isolation of Cardiomyocyte Nuclei from Post-mortem Tissue. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., et al. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* *324*, 98–102.
- Van Berlo, J.H., Kanisicak, O., Maillet, M., Vagnozzi, R.J., Karch, J., Lin, S.-C.J., Middleton, R.C., Marbán, E., and Molkenkin, J.D. (2014). c-kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* *509*, 337–341.
- Berry, C.C., and Curtis, A.S. (2003). Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. Appl. Phys.* *36*, R198.
- Bhirde, A., Xie, J., Swierczewska, M., and Chen, X. (2011). Nanoparticles for cell labeling. *Nanoscale* *3*, 142–153.

- Bikram, M., Gobin, A.M., Whitmire, R.E., and West, J.L. (2007). Temperature-sensitive hydrogels with SiO<sub>2</sub>-Au nanoshells for controlled drug delivery. *J. Controlled Release* *123*, 219–227.
- Bloch, W., Huggel, K., Sasaki, T., Grose, R., Bugnon, P., Addicks, K., Timpl, R., and Werner, S. (2000). The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J.*
- Bloom, S., and Peric-Golia, L. (1989). Geographic variation in the incidence of myocardial calcification associated with acute myocardial infarction. *Hum. Pathol.* *20*, 726–731.
- Boateng, S., and Sanborn, T. (2013). Acute myocardial infarction. *Dis. Mon.* *59*, 83–96.
- Van der Bogt, K.E.A., Sheikh, A.Y., Schrepfer, S., Hoyt, G., Cao, F., Ransohoff, K., Swijnenburg, R.-J., Pearl, J., Fischbein, M., Contag, C.H., et al. (2008). Comparison of Different Adult Stem Cell Types for Treatment of Myocardial Ischemia. *Circulation* *118*, S121–S129.
- Bonnemain, B. (1998). Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A Review. *J. Drug Target.* *6*, 167–174.
- Van den Bos, E.J., and Taylor, D.A. (2003). Cardiac transplantation of skeletal myoblasts for heart failure. *Minerva Cardioangiol.* *51*, 227–243.
- Van den Bos, E.J., Mees, B.M.E., de Waard, M.C., de Crom, R., and Duncker, D.J. (2005). A novel model of cryoinjury-induced myocardial infarction in the mouse: a comparison with coronary artery ligation. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *289*, H1291–H1300.
- Bourrinet, P., Bengel, H.H., Bonnemain, B., Dencausse, A., Idee, J.-M., Jacobs, P.M., and Lewis, J.M. (2006). Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Invest. Radiol.* *41*, 313–324.
- Braunwald, E., and Pfeffer, M.A. (1991). Ventricular enlargement and remodeling following acute myocardial infarction: mechanisms and management. *Am. J. Cardiol.* *68*, 1D – 6D.
- Brazel, C.S. (2009). Magneto-thermally-responsive Nanomaterials: Combining Magnetic Nanostructures and Thermally-Sensitive Polymers for Triggered Drug Release. *Pharm. Res.* *26*, 644–656.
- Breitbach, M., Bostani, T., Roell, W., Xia, Y., Dewald, O., Nygren, J.M., Fries, J.W.U., Tiemann, K., Bohlen, H., Hescheler, J., et al. (2007). Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* *110*, 1362–1369.
- Briley-Saebo, K.C., Mani, V., Hyafil, F., Cornily, J.-C., and Fayad, Z.A. (2008). Fractionated feridex and positive contrast: In vivo MR imaging of atherosclerosis. *Magn. Reson. Med.* *59*, 721–730.
- Bruegmann, T., Malan, D., Hesse, M., Beiert, T., Fuegeman, C.J., Fleischmann, B.K., and Sasse, P. (2010). Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat. Methods* *7*, 897–900.
- Buja, L.M., and Vela, D. (2010). Immunologic and Inflammatory Reactions to Exogenous Stem Cells: Implications for Experimental Studies and Clinical Trials for Myocardial Repair. *J. Am. Coll. Cardiol.* *56*, 1693–1700.

- Caspi, O., Huber, I., Kehat, I., Habib, M., Arbel, G., Gepstein, A., Yankelson, L., Aronson, D., Beyar, R., and Gepstein, L. (2007). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Improves Myocardial Performance in Infarcted Rat Hearts. *J. Am. Coll. Cardiol.* *50*, 1884–1893.
- Chen, H.H., Josephson, L., and Sosnovik, D.E. (2011). Imaging of apoptosis in the heart with nanoparticle technology. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* *3*, 86–99.
- Cheng, K., Li, T.-S., Malliaras, K., Davis, D., Zhang, Y., and Marban, E. (2010). Magnetic Targeting Enhances Engraftment and Functional Benefit of Iron-Labeled Cardiosphere-Derived Cells in Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *106*, 1570–1581.
- Cheng, K., Malliaras, K., Li, T.-S., Sun, B., Houde, C., Galang, G., Smith, J., Matsushita, N., and Marbán, E. (2012). Magnetic Enhancement of Cell Retention, Engraftment, and Functional Benefit After Intracoronary Delivery of Cardiac-Derived Stem Cells in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion. *Cell Transplant.* *21*, 1121–1135.
- Cheng, W., Kajstura, J., Nitahara, J.A., Li, B., Reiss, K., Liu, Y., Clark, W.A., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., et al. (1996). Programmed Myocyte Cell Death Affects the Viable Myocardium after Infarction in Rats. *Exp. Cell Res.* *226*, 316–327.
- Chithrani, B.D., and Chan, W.C.W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* *7*, 1542–1550.
- Cleland, J., Torabi, A., and Khan, N. (2005). Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart* *91*, ii7–ii13.
- Coates, A., Abraham, S., Kaye, S.B., Sowerbutts, T., Frewin, C., Fox, R.M., and Tattersall, M.H.N. (1983). On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* *19*, 203–208.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37–44.
- Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L., and O'Connor, C.J. (2004). Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* *104*, 3893–3946.
- Dai, Y., Ashraf, M., Zuo, S., Uemura, R., Dai, Y.-S., Wang, Y., Haider, H.K., Li, T., and Xu, M. (2008). Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 607–617.
- Daneshvar, D.A., Czer, L.S.C., Phan, A., Trento, A., and Schwarz, E.R. (2010). Heart transplantation in the elderly: why cardiac transplantation does not need to be limited to younger patients but can be safely performed in patients above 65 years of age. *Ann. Transplant. Q. Pol. Transplant. Soc.* *15*, 110–119.
- Desai, N. (2012). Challenges in Development of Nanoparticle-Based Therapeutics. *AAPS J.* *14*, 282–295.
- Dickstein, K., Cohen-Solal, A., Filippatos, G., McMurray, J.J.V., Ponikowski, P., Poole-Wilson, P.A., Strömberg, A., Veldhuisen, D.J. van, Atar, D., Hoes, A.W., et al. (2008). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed

in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur. Heart J.* *29*, 2388–2442.

Di Diego, J.M., and Antzelevitch, C. (2011). Ischemic Ventricular Arrhythmias Experimental Models and Their Clinical Relevance. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* *8*, 1963–1968.

Dimmeler, S., Zeiher, A.M., and Schneider, M.D. (2005). Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J. Clin. Invest.* *115*, 572–583.

Dobrovolskaia, M.A., and McNeil, S.E. (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* *2*, 469–478.

Dobson, G.P. (2003). ON BEING THE RIGHT SIZE: HEART DESIGN, MITOCHONDRIAL EFFICIENCY and LIFESPAN POTENTIAL. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *30*, 590–597.

Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *87*, 27–45.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D., and Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* *72*, 8463–8471.

Erdö, F., Bührle, C., Blunk, J., Hoehn, M., Xia, Y., Fleischmann, B., Föcking, M., Küstermann, E., Kolossov, E., Hescheler, J., et al. (2003). Host-Dependent Tumorigenesis of Embryonic Stem Cell Transplantation in Experimental Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* *23*, 780–785.

Etzion, S., Battler, A., Barbash, I.M., Cagnano, E., Zarin, P., Granot, Y., Kedes, L.H., Kloner, R.A., and Leor, J. (2001). Influence of Embryonic Cardiomyocyte Transplantation on the Progression of Heart Failure in a Rat Model of Extensive Myocardial Infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *33*, 1321–1330.

Fernandes, S., Amirault, J.-C., Lande, G., Nguyen, J.-M., Forest, V., Bignolais, O., Lamirault, G., Heudes, D., Orsonneau, J.-L., Heymann, M.-F., et al. (2006). Autologous myoblast transplantation after myocardial infarction increases the inducibility of ventricular arrhythmias. *Cardiovasc. Res.* *69*, 348–358.

Fernandes, S., Naumova, A.V., Zhu, W.Z., Laflamme, M.A., Gold, J., and Murry, C.E. (2010). Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes engraft but do not alter cardiac remodeling after chronic infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *49*, 941–949.

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

Frangogiannis, N.G., Smith, C.W., and Entman, M.L. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* *53*, 31–47.

Fukushima, S., Varela-Carver, A., Coppen, S.R., Yamahara, K., Felkin, L.E., Lee, J., Barton, P.J.R., Terracciano, C.M.N., Yacoub, M.H., and Suzuki, K. (2007). Direct Intramyocardial But Not Intracoronary Injection of Bone Marrow Cells Induces Ventricular Arrhythmias in a Rat Chronic Ischemic Heart Failure Model. *Circulation* *115*, 2254–2261.

- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schürch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., Heyder, J., and Gehr, P. (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* *113*, 1555–1560.
- Gelbrich, T., Feyen, M., and Schmidt, A.M. (2006). Magnetic Thermoresponsive Core-Shell Nanoparticles. *Macromolecules* *39*, 3469–3472.
- Gemeinhart, R.A., Luo, D., and Saltzman, W.M. (2005). Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* *21*, 532–537.
- Gerdes et al., J. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associ... [J Immunol. 1984] - PubMed - NCBI.
- Gessner, A., Waicz, R., Lieske, A., Paulke, B.-R., Mäder, K., and Müller, R.. (2000). Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *Int. J. Pharm.* *196*, 245–249.
- Gnecchi, M., He, H., Liang, O.D., Melo, L.G., Morello, F., Mu, H., Noiseux, N., Zhang, L., Pratt, R.E., Ingwall, J.S., et al. (2005). Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.* *11*, 367–368.
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A., and Dzau, V.J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ. Res.* *103*, 1204–1219.
- Goldman, L., Hashimoto, B., Cook, E.F., and Loscalzo, A. (1981). Comparative reproducibility and validity of systems for assessing cardiovascular functional class: advantages of a new specific activity scale. *Circulation* *64*, 1227–1234.
- Gonzalez, A., Rota, M., Nurzynska, D., Misao, Y., Tillmanns, J., Ojaimi, C., Padin-Iruegas, M.E., Müller, P., Esposito, G., Bearzi, C., et al. (2008). Activation of Cardiac Progenitor Cells Reverses the Failing Heart Senescent Phenotype and Prolongs Lifespan. *Circ. Res.* *102*, 597–606.
- Gratton, S.E.A., Ropp, P.A., Pohlhaus, P.D., Luft, J.C., Madden, V.J., Napier, M.E., and DeSimone, J.M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11613–11618.
- Guan, K., and Hasenfuss, G. (2007). Do stem cells in the heart truly differentiate into cardiomyocytes? *J. Mol. Cell. Cardiol.* *43*, 377–387.
- Gupta, A.K., and Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* *26*, 3995–4021.
- Gupta, A.K., Naregalkar, R.R., Vaidya, V.D., and Gupta, M. (2007). Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomed.* *2*, 23–39.
- Hagège, A.A., Marolleau, J.-P., Vilquin, J.-T., Alhéritière, A., Peyrard, S., Duboc, D., Abergel, E., Messas, E., Mousseaux, E., Schwartz, K., et al. (2006). Skeletal Myoblast Transplantation in Ischemic Heart Failure Long-Term Follow-Up of the First Phase I Cohort of Patients. *Circulation* *114*, I – 108 – I – 113.

Haider, H.K., Ye, L., Jiang, S., Ge, R., Law, P.K., Chua, T., Wong, P., and Sim, E.K.W. (2004). Angiomyogenesis for cardiac repair using human myoblasts as carriers of human vascular endothelial growth factor. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *82*, 539–549.

Hajjar, R.J., Monte, F. del, Matsui, T., and Rosenzweig, A. (2000). Prospects for Gene Therapy for Heart Failure. *Circ. Res.* *86*, 616–621.

Hansky, B., Vogt, J., Zittermann, A., Güldner, H., Heintze, J., Schulz, U., Horstkotte, D., Tenderich, G., and Körfer, R. (2009). Cardiac Resynchronization Therapy: Long-Term Alternative to Cardiac Transplantation? *Ann. Thorac. Surg.* *87*, 432–438.

Hatzistergos, K.E., Quevedo, H., Oskouei, B.N., Hu, Q., Feigenbaum, G.S., Margitich, I.S., Mazhari, R., Boyle, A.J., Zambrano, J.P., Rodriguez, J.E., et al. (2010). Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Circ. Res.* *107*, 913–922.

Hellermann, J.P., Jacobsen, S.J., Redfield, M.M., Reeder, G.S., Weston, S.A., and Roger, V.L. (2005). Heart failure after myocardial infarction: clinical presentation and survival. *Eur. J. Heart Fail.* *7*, 119–125.

Hellstern, D., Schulze, K., Schöpf, B., Petri-Fink, A., Steitz, B., Kamau, S., Hilbe, M., Koch-Schneidemann, S., Vaughan, L., Hottiger, M., et al. (2006). Systemic distribution and elimination of plain and with Cy3.5 functionalized poly(vinyl alcohol) coated superparamagnetic maghemite nanoparticles after intraarticular injection in sheep in vivo. *J. Nanosci. Nanotechnol.* *6*, 3261–3268.

Henkel, D.M., Witt, B.J., Gersh, B.J., Jacobsen, S.J., Weston, S.A., Meverden, R.A., and Roger, V.L. (2006). Ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction: A 20-year community study. *Am. Heart J.* *151*, 806–812.

Hodgson, D.M., Behfar, A., Zingman, L.V., Kane, G.C., Perez-Terzic, C., Alekseev, A.E., Pucéat, M., and Terzic, A. (2004). Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *287*, H471–H479.

Hoff, D., Sheikh, L., Bhattacharya, S., Nayar, S., and Webster, T.J. (2013). Comparison study of ferrofluid and powder iron oxide nanoparticle permeability across the blood-brain barrier. *Int. J. Nanomedicine* *8*, 703–710.

Hu, X., Wang, J., Chen, J., Luo, R., He, A., Xie, X., and Li, J. (2007). Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *31*, 438–443.

Huang, Z., Shen, Y., Pei, N., Sun, A., Xu, J., Song, Y., Huang, G., Sun, X., Zhang, S., Qin, Q., et al. (2013). The effect of nonuniform magnetic targeting of intracoronary-delivering mesenchymal stem cells on coronary embolisation. *Biomaterials* *34*, 9905–9916.

Huikuri, H.V., Castellanos, A., and Myerburg, R.J. (2001). Sudden Death Due to Cardiac Arrhythmias. *N. Engl. J. Med.* *345*, 1473–1482.

Hutcheson, K.A., Atkins, B.Z., Hueman, M.T., Hopkins, M.B., Glower, D.D., and Taylor, D.A. (2000). Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant.* *9*, 359–368.



- Huwer, H., Winning, J., Vollmar, B., Welter, C., Löhbach, C., Menger, M.D., and Schäfers, H.-J. (2003). Long-term cell survival and hemodynamic improvements after neonatal cardiomyocyte and satellite cell transplantation into healed myocardial cryoinfarcted lesions in rats. *Cell Transplant.* *12*, 757–767.
- Imamura, T., Kinugawa, K., Kato, N., Kagami, Y., Endo, M., Kaneko, N., Minatsuki, S., Muraoka, H., Inaba, T., Maki, H., et al. (2013). Successful Treatment of Hemodynamic Compromise Caused by Antibody-Mediated and Cellular Rejection in a Recipient 12 years After Heart Transplantation. *Int. Heart. J.* *54*, 328–331.
- Iwasaki, H., Kawamoto, A., Tjwa, M., Horii, M., Hayashi, S., Oyamada, A., Matsumoto, T., Suehiro, S., Carmeliet, P., and Asahara, T. (2011). PlGF repairs myocardial ischemia through mechanisms of angiogenesis, cardioprotection and recruitment of myo-angiogenic competent marrow progenitors. *PloS One* *6*, e24872.
- Iwata, A., Morgan-Stevenson, V., Schwartz, B., Liu, L., Tupper, J., Zhu, X., Harlan, J., and Winn, R. (2010). Extracellular BCL2 proteins are danger-associated molecular patterns that reduce tissue damage in murine models of ischemia-reperfusion injury. *PloS One* *5*, e9103.
- Jackson, B.M., Gorman III, J.H., Moainie, S.L., Guy, T.S., Narula, N., Narula, J., St. John-Sutton, M.G., Edmunds Jr, L.H., and Gorman, R.C. (2002). Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *40*, 1160–1167.
- Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* *107*, 1395–1402.
- Jain, M., DerSimonian, H., Brenner, D.A., Ngoy, S., Teller, P., Edge, A.S.B., Zawadzka, A., Wetzel, K., Sawyer, D.B., Colucci, W.S., et al. (2001). Cell Therapy Attenuates Deleterious Ventricular Remodeling and Improves Cardiac Performance After Myocardial Infarction. *Circulation* *103*, 1920–1927.
- Jain, T.K., Reddy, M.K., Morales, M.A., Leslie-Pelecky, D.L., and Labhasetwar, V. (2008). Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Mol. Pharm.* *5*, 316–327.
- Jessup, M., and Brozena, S. (2003). Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* *348*, 2007–2018.
- Jhund, P.S., MacIntyre, K., Simpson, C.R., Lewsey, J.D., Stewart, S., Redpath, A., Chalmers, J.W.T., Capewell, S., and McMurray, J.J.V. (2009). Long-Term Trends in First Hospitalization for Heart Failure and Subsequent Survival Between 1986 and 2003 A Population Study of 5.1 Million People. *Circulation* *119*, 515–523.
- Johnson, W.E., Eisenstein, S.M., and Roberts, S. (2001). Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect. Tissue Res.* *42*, 197–207.
- Kaiser, A., Gelbrich, T., and Schmidt, A.M. (2006). Thermosensitive magnetic fluids. *J. Phys. Condens. Matter* *18*, S2563.

Kanno, S., Lerner, D.L., Schuessler, R.B., Betsuyaku, T., Yamada, K.A., Saffitz, J.E., and Kovacs, A. (2002). Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* *15*, 601–609.

Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., et al. (1999). Significance of Myocytes With Positive DNA In Situ Nick End-Labeling (TUNEL) in Hearts With Dilated Cardiomyopathy Not Apoptosis but DNA Repair. *Circulation* *99*, 2757–2764.

Kaushal, S., Jacobs, J.P., Gossett, J.G., Steele, A., Steele, P., Davis, C.R., Pahl, E., Vijayan, K., Asante-Korang, A., Boucek, R.J., et al. (2009). Innovation in Basic Science: Stem Cells and their role in the treatment of Paediatric Cardiac Failure – Opportunities and Challenges. *Cardiol. Young* *19*, 74–84.

Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* *108*, 407–414.

Kilgus, C., Heidsieck, A., Ottersbach, A., Roell, W., Trueck, C., Fleischmann, B.K., Gleich, B., and Sasse, P. (2012). Local Gene Targeting and Cell Positioning Using Magnetic Nanoparticles and Magnetic Tips: Comparison of Mathematical Simulations with Experiments. *Pharm. Res.* *29*, 1380–1391.

Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S.E. (2004). Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation* *109*, 1543–1549.

Klopsch, C., Donndorf, P., Kaminski, A., Ma, N., and Steinhoff, P.D.G. (2011). Zellquellen für kardiovaskuläres Tissue Engineering. *Chir.* *82*, 295–302.

Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., and Field, L.J. (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J. Clin. Invest.* *98*, 216–224.

Knuefermann, P., Vallejo, J., and Mann, D.L. (2004). The Role of Innate Immune Responses in the Heart in Health and Disease. *Trends Cardiovasc. Med.* *14*, 1–7.

Køber, L., and Torp-Pedersen, C. (1995). Clinical Characteristics and Mortality of Patients Screened for Entry Into the Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study. *Am. J. Cardiol.* *76*, 1–5.

Køber, L., Torp-Pedersen, C., Jørgensen, S., Eliasen, P., Camm, A.J., and on behalf of the TRACE Study Group (1998). Changes in Absolute and Relative Importance in the Prognostic Value of Left Ventricular Systolic Function and Congestive Heart Failure After Acute Myocardial Infarction. *Am. J. Cardiol.* *81*, 1292–1297.

Kocher, A.A., Schuster, M.D., Szabolcs, M.J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N.M., and Itescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* *7*, 430–436.

Kocovski, L., and Fernandes, J. (2015). Sudden Cardiac Death: A Modern Pathology Approach to Hypertrophic Cardiomyopathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *139*, 413–416.

- Kolossov, E., Lu, Z., Drobinskaya, I., Gassanov, N., Duan, Y., Sauer, H., Manzke, O., Bloch, W., Bohlen, H., Hescheler, J., et al. (2005). Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *FASEB J.*
- Kolossov, E., Bostani, T., Roell, W., Breitbach, M., Pillekamp, F., Nygren, J.M., Sasse, P., Rubenchik, O., Fries, J.W.U., Wenzel, D., et al. (2006). Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J. Exp. Med.* *203*, 2315–2327.
- Kubinová, Š., and Syková, E. (2010). Nanotechnologies in regenerative medicine. *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* *19*, 144–156.
- Kyrtatos, P.G., Lehtolainen, P., Junemann-Ramirez, M., Garcia-Prieto, A., Price, A.N., Martin, J.F., Gadian, D.G., Pankhurst, Q.A., and Lythgoe, M.F. (2009). Magnetic tagging increases delivery of circulating progenitors in vascular injury. *JACC Cardiovasc. Interv.* *2*, 794–802.
- Laake, L.W. van, Passier, R., Doevendans, P.A., and Mummery, C.L. (2008). Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Cardiac Repair in Rodents. *Circ. Res.* *102*, 1008–1010.
- Van Laake, L.W., Passier, R., Monshouwer-Kloots, J., Verkleij, A.J., Lips, D.J., Freund, C., den Ouden, K., Ward-van Oostwaard, D., Korving, J., Tertoolen, L.G., et al. (2007). Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem Cell Res.* *1*, 9–24.
- Laaksonen, T., Santos, H., Vihola, H., Salonen, J., Riikonen, J., Heikkilä, T., Peltonen, L., Kumar, N., Murzin, D.Y., Lehto, V.-P., et al. (2007). Failure of MTT as a toxicity testing agent for mesoporous silicon microparticles. *Chem. Res. Toxicol.* *20*, 1913–1918.
- Laflamme, M.A., and Murry, C.E. (2005). Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* *23*, 845–856.
- Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1015–1024.
- Lai, J.J., Hoffman, J.M., Ebara, M., Hoffman, A.S., Estournès, C., Wattiaux, A., and Stayton, P.S. (2007). Dual Magnetic-/Temperature-Responsive Nanoparticles for Microfluidic Separations and Assays. *Langmuir* *23*, 7385–7391.
- Lee, J., Stagg, M.A., Fukushima, S., Soppa, G.K.R., Siedlecka, U., Youssef, S.J., Suzuki, K., Yacoub, M.H., and Terracciano, C.M.N. (2009). Adult progenitor cell transplantation influences contractile performance and calcium handling of recipient cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *296*, H927–H936.
- Leobon, B., Garcin, I., Menasche, P., Vilquin, J.-T., Audinat, E., and Charpak, S. (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7808–7811.
- Leor, J., Gerecht, S., Cohen, S., Miller, L., Holbova, R., Ziskind, A., Shachar, M., Feinberg, M.S., Guetta, E., and Itskovitz-Eldor, J. (2007). Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium. *Heart* *93*, 1278–1284.

Levy, D., Kenchaiah, S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Kupka, M.J., Ho, K.K.L., Murabito, J.M., and Vasan, R.S. (2002). Long-Term Trends in the Incidence of and Survival with Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* *347*, 1397–1402.

Li, R.K., Mickle, D.A., Weisel, R.D., Rao, V., and Jia, Z.Q. (2001). Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann. Thorac. Surg.* *72*, 1957–1963.

Li, Z., Lee, A., Huang, M., Chun, H., Chung, J., Chu, P., Hoyt, G., Yang, P., Rosenberg, J., Robbins, R.C., et al. (2009). Imaging Survival and Function of Transplanted Cardiac Resident Stem Cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* *53*, 1229–1240.

Lin, R.-Z., Lin, R.-Z., and Chang, H.-Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* *3*, 1172–1184.

Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Gannon, J., and Lee, R.T. (2011). Bone Marrow-Derived Cell Therapy Stimulates Endogenous Cardiomyocyte Progenitors and Promotes Cardiac Repair. *Cell Stem Cell* *8*, 389–398.

Long, T.C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G.V., and Veronesi, B. (2007). Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ. Health Perspect.* *115*, 1631–1637.

Lübbe, A.S., Alexiou, C., and Bergemann, C. (2001). Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting. *J. Surg. Res.* *95*, 200–206.

Makkar, R.R., Lill, M., and Chen, P.-S. (2003). Stem cell therapy for myocardial repair: Is it arrhythmogenic? *J. Am. Coll. Cardiol.* *42*, 2070–2072.

Mannell, H., Pircher, J., Räthel, T., Schilberg, K., Zimmermann, K., Pfeifer, A., Mykhaylyk, O., Gleich, B., Pohl, U., and Krötz, F. (2012a). Targeted Endothelial Gene Delivery by Ultrasonic Destruction of Magnetic Microbubbles Carrying Lentiviral Vectors. *Pharm. Res.* *29*, 1282–1294.

Mannell, H., Pircher, J., Fochler, F., Stampnik, Y., Räthel, T., Gleich, B., Plank, C., Mykhaylyk, O., Dahmani, C., Wörnle, M., et al. (2012b). Site directed vascular gene delivery in vivo by ultrasonic destruction of magnetic nanoparticle coated microbubbles. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* *8*, 1309–1318.

Marelli, D., Desrosiers, C., el-Alfy, M., Kao, R.L., and Chiu, R.C. (1992). Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant.* *1*, 383–390.

Martin-Rendon, E., Brunskill, S., Doree, C., Hyde, C., Watt, S., Mathur, A., and Stanworth, S. (2008). Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* *4*.

McKee, P.A., Castelli, W.P., McNamara, P.M., and Kannel, W.B. (1971). The Natural History of Congestive Heart Failure: The Framingham Study. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1441–1446.

McMurray, J.J.V. (2010). Systolic Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* *362*, 228–238.

McMurray, J.J.V., Adamopoulos, S., Anker, S.D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M.A., et al. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and

treatment of acute and chronic heart failure 2012 The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur. J. Heart Fail.* *14*, 803–869.

Menasché, P. (2009). [Cell therapy: results in Cardiology]. *Bull. Académie Natl. Médecine* *193*, 559–568; discussion 568–569.

Menasché, P., Hagège, A.A., Vilquin, J.-T., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., et al. (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *41*, 1078–1083.

Mias, C., Lairez, O., Trouche, E., Roncalli, J., Calise, D., Seguelas, M.-H., Ordener, C., Piercecchi-Marti, M.-D., Auge, N., Salvayre, A.N., et al. (2009). Mesenchymal Stem Cells Promote Matrix Metalloproteinase Secretion by Cardiac Fibroblasts and Reduce Cardiac Ventricular Fibrosis After Myocardial Infarction. *STEM CELLS* *27*, 2734–2743.

Moghimi, S.M., and Szebeni, J. (2003). Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res.* *42*, 463–478.

Møller, J.E., Brendorp, B., Ottesen, M., Køber, L., Egstrup, K., Poulsen, S.H., and Torp-Pedersen, C. (2003). Congestive heart failure with preserved left ventricular systolic function after acute myocardial infarction: clinical and prognostic implications. *Eur. J. Heart Fail.* *5*, 811–819.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* *65*, 55–63.

Moss, A.J., Zareba, W., Hall, W.J., Klein, H., Wilber, D.J., Cannom, D.S., Daubert, J.P., Higgins, S.L., Brown, M.W., and Andrews, M.L. (2002). Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients with Myocardial Infarction and Reduced Ejection Fraction. *N. Engl. J. Med.* *346*, 877–883.

Mullens, W., Keyser, J.D., and Droogne, W. (2006). Myocardial calcification: a rare cause of diastolic dysfunction. *Heart* *92*, 195–195.

Müller-Ehmsen, J., Whittaker, P., Kloner, R.A., Dow, J.S., Sakoda, T., Long, T.I., Laird, P.W., and Kedes, L. (2002). Survival and Development of Neonatal Rat Cardiomyocytes Transplanted into Adult Myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *34*, 107–116.

Murry, C.E. (2005). Cell-Based Cardiac Repair: Reflections at the 10-Year Point. *Circulation* *112*, 3174–3183.

Murry, C.E., Wiseman, R.W., Schwartz, S.M., and Hauschka, S.D. (1996). Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.* *98*, 2512–2523.

Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B.S., Ismail Virag, J., Bartelmez, S.H., Poppa, V., et al. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* *428*, 664–668.

Mykhaylyk, O., Antequera, Y.S., Vlaskou, D., and Plank, C. (2007). Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat. Protoc.* *2*, 2391–2411.

Mykhaylyk, O., Zelphati, O., Hammerschmid, E., Anton, M., Rosenecker, J., and Plank, C. (2009). Recent advances in magnetofection and its potential to deliver siRNAs in vitro. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *487*, 111–146.

Mykhaylyk, O., Sobisch, T., Almstätter, I., Sanchez-Antequera, Y., Brandt, S., Anton, M., Döblinger, M., Eberbeck, D., Settles, M., Braren, R., et al. (2012a). Silica-Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Modified for Gene Delivery: A Search for Optimum and Quantitative Criteria. *Pharm. Res.* *29*, 1344–1365.

Mykhaylyk, O., Sobisch, T., Almstätter, I., Sanchez-Antequera, Y., Brandt, S., Anton, M., Döblinger, M., Eberbeck, D., Settles, M., and Braren, R. (2012b). Silica-Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Modified for Gene Delivery: A Search for Optimum and Quantitative Criteria. *Pharm. Res.* *29*, 1344–1365.

Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., et al. (2005). Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* *112*, 1128–1135.

Nahrendorf, M., Pittet, M.J., and Swirski, F.K. (2010). Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair. *Circulation* *121*, 2437–2445.

Nakanishi, C., Yamagishi, M., Yamahara, K., Hagino, I., Mori, H., Sawa, Y., Yagihara, T., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2008). Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *374*, 11–16.

Neuberger, T., Schöpf, B., Hofmann, H., Hofmann, M., and von Rechenberg, B. (2005). Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J. Magn. Magn. Mater.* *293*, 483–496.

Neumann, T., Biermann, J., Erbel, R., Neumann, A., Wasem, J., Ertl, G., and Dietz, R. (2009). Heart Failure: the Commonest Reason for Hospital Admission in Germany. *Dtsch. Ärztebl. Int.* *106*, 269–275.

Neuwelt, E.A., Hamilton, B.E., Varallyay, C.G., Rooney, W.R., Edelman, R.D., Jacobs, P.M., and Watnick, S.G. (2009). Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)? *Kidney Int.* *75*, 465–474.

Niemeyer, C.M. (2001). Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew. Chem. Int. Ed.* *40*, 4128–4158.

Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Säwén, P., Röhl, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K., and Jacobsen, S.E.W. (2004). Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat. Med.* *10*, 494–501.

Odorico, J.S., Kaufman, D.S., and Thomson, J.A. (2001). Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *STEM CELLS* *19*, 193–204.

Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., et al. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12313–12318.

- Okamoto, null (1998). Endocytosis and transcytosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29, 215–228.
- Olivetti, G., Capasso, J.M., Sonnenblick, E.H., and Anversa, P. (1990). Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ. Res.* 67, 23–34.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 10344–10349.
- Osmancik, P.P., Stros, P., and Herman, D. (2008). In-hospital arrhythmias in patients with acute myocardial infarction—the relation to the reperfusion strategy and their prognostic impact. *Acute Card. Care* 10, 15–25.
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K., and Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. Appl. Phys.* 36, R167.
- Passier, R., van Laake, L.W., and Mummery, C.L. (2008). Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 453, 322–329.
- Paulis, L.E., Klein, A.M., Ghanem, A., Geelen, T., Coolen, B.F., Breitbach, M., Zimmermann, K., Nicolay, K., Fleischmann, B.K., Roell, W., et al. (2013). Embryonic Cardiomyocyte, but Not Autologous Stem Cell Transplantation, Restricts Infarct Expansion, Enhances Ventricular Function, and Improves Long-Term Survival. *PLoS ONE* 8.
- Peskin, A.V., and Winterbourn, C.C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin. Chim. Acta* 293, 157–166.
- Pfeifer, A., and Hofmann, A. (2009). Lentiviral transgenesis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 530, 391–405.
- Pislaru, S.V., Harbuzariu, A., Agarwal, G., Witt, T., Gulati, R., Sandhu, N.P., Mueske, C., Kalra, M., Simari, R.D., and Sandhu, G.S. (2006). Magnetic forces enable rapid endothelialization of synthetic vascular grafts. *Circulation* 114, I314–I318.
- Ponomarev, V. (2009). Nuclear Imaging of Cancer Cell Therapies. *J. Nucl. Med.* 50, 1013–1016.
- Porrello, E.R., and Olson, E.N. (2010). Building a New Heart From Old Parts. *Circ. Res.* 107, 1292–1294.
- Ptaszek, L.M., Mansour, M., Ruskin, J.N., and Chien, K.R. (10). Towards regenerative therapy for cardiac disease. *The Lancet* 379, 933–942.
- Qiao, H., Zhang, H., Yamanaka, S., Patel, V.V., Petrenko, N.B., Huang, B., Muenz, L.R., Ferrari, V.A., Boheler, K.R., and Zhou, R. (2011). Long-term improvement in postinfarct left ventricular global and regional contractile function is mediated by embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ. Cardiovasc. Imaging* 4, 33–41.
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A.P., Finato, N., Beltrami, C.A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., and Anversa, P. (2002). Chimerism of the Transplanted Heart. *N. Engl. J. Med.* 346, 5–15.

Al-Quteimat, O.M., and Al-Badaineh, M.A. (2013). Intraperitoneal chemotherapy: Rationale, applications, and limitations. *J. Oncol. Pharm. Pract.* 1078155213506244.

Rae, T. (1975). A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages in vitro. *J. Bone Joint Surg. Br.* 57, 444–450.

Raz, I., Havivi, Y., and Yarom, R. (1988). Reduced negative surface charge on arterial endothelium of diabetic rats. *Diabetologia* 31, 618–620.

Reinecke, H. (2002). Skeletal Muscle Stem Cells Do Not Transdifferentiate Into Cardiomyocytes After Cardiac Grafting. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 241–249.

Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T., and Murry, C.E. (1999). Survival, Integration, and Differentiation of Cardiomyocyte Grafts A Study in Normal and Injured Rat Hearts. *Circulation* 100, 193–202.

Reinecke, H., MacDonald, G.H., Hauschka, S.D., and Murry, C.E. (2000). Electromechanical Coupling between Skeletal and Cardiac Muscle. *J. Cell Biol.* 149, 731–740.

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377, 159–169.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.

Ribeiro, K.C., Mattos, E.C., Werneck-de-castro, J.P.S., Ribeiro, V.P., Costa-e-Sousa, R.H., Miranda, A., Olivares, E.L., Farina, M., Mill, J.G., Goldenberg, J.R.C. dos S., et al. (2006). Ectopic ossification in the scar tissue of rats with myocardial infarction. *Cell Transplant.* 15, 389–397.

Rieter, W.J., Kim, J.S., Taylor, K.M.L., An, H., Lin, W., Tarrant, T., and Lin, W. (2007). Hybrid Silica Nanoparticles for Multimodal Imaging. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, 3680–3682.

Robey, T.E., Saiget, M.K., Reinecke, H., and Murry, C.E. (2008). Systems Approaches to Preventing Transplanted Cell Death in Cardiac Repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 567–581.

Roell, W., Lu, Z.J., Bloch, W., Siedner, S., Tiemann, K., Xia, Y., Stoecker, E., Fleischmann, M., Bohlen, H., Stehle, R., et al. (2002a). Cellular Cardiomyoplasty Improves Survival After Myocardial Injury. *Circulation* 105, 2435–2441.

Roell, W., Fan, Y., Xia, Y., Stoecker, E., Sasse, P., Kolossov, E., Bloch, W., Metzner, H., Schmitz, C., Addicks, K., et al. (2002b). Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. *Transplantation* 73, 462–465.

Roell, W., Lewalter, T., Sasse, P., Tallini, Y.N., Choi, B.-R., Breitbach, M., Doran, R., Becher, U.M., Hwang, S.-M., Bostani, T., et al. (2007). Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 450, 819–824.

Rothen-Rutishauser, B.M., Schürch, S., Haenni, B., Kapp, N., and Gehr, P. (2006). Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4353–4359.



- Rubart, M., and Zipes, D.P. (2005). Mechanisms of sudden cardiac death. *J. Clin. Invest.* *115*, 2305–2315.
- Rudge, S., Peterson, C., Vessely, C., Koda, J., Stevens, S., and Catterall, L. (2001). Adsorption and desorption of chemotherapeutic drugs from a magnetically targeted carrier (MTC). *J. Controlled Release* *74*, 335–340.
- Ruehm, S.G., Corot, C., Vogt, P., Kolb, S., and Debatin, J.F. (2001). Magnetic resonance imaging of atherosclerotic plaque with ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide in hyperlipidemic rabbits. *Circulation* *103*, 415–422.
- Ruenraroengsak, P., Cook, J.M., and Florence, A.T. (2010). Nanosystem drug targeting: Facing up to complex realities. *J. Controlled Release* *141*, 265–276.
- Sakai, T., Li, R.K., Weisel, R.D., Mickle, D.A., Jia, Z.Q., Tomita, S., Kim, E.J., and Yau, T.M. (1999). Fetal cell transplantation: a comparison of three cell types. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *118*, 715–724.
- Sandhiya, S., Dkhar, S.A., and Surendiran, A. (2009). Emerging trends of nanomedicine – an overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.* *23*, 263–269.
- Sasse, P., Malan, D., Fleischmann, M., Roell, W., Gustafsson, E., Bostani, T., Fan, Y., Kolbe, T., Breitbach, M., Addicks, K., et al. (2008). Perlecan is critical for heart stability. *Cardiovasc. Res.* *80*, 435–444.
- Sassoli, C., Pini, A., Mazzanti, B., Quercioli, F., Nistri, S., Saccardi, R., Orlandini, S.Z., Bani, D., and Formigli, L. (2011). Mesenchymal stromal cells affect cardiomyocyte growth through juxtacrine Notch-1/Jagged-1 signaling and paracrine mechanisms: Clues for cardiac regeneration. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *51*, 399–408.
- Schmidt, A.M. (2007). Thermoresponsive magnetic colloids. *Colloid Polym. Sci.* *285*, 953–966.
- Schroeder, U., Sommerfeld, P., Ulrich, S., and Sabel, B.A. (1998). Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *J. Pharm. Sci.* *87*, 1305–1307.
- Schuh, A., Breuer, S., Dashti, R.A., Sulemanjee, N., Hanrath, P., Weber, C., Uretsky, B.F., and Schwarz, E.R. (2005). Administration of Vascular Endothelial Growth Factor Adjunctive to Fetal Cardiomyocyte Transplantation and Improvement of Cardiac Function in the Rat Model. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* *10*, 55–66.
- Scimia, M.C., Gumpert, A.M., and Koch, W.J. (2014). Cardiovascular gene therapy for myocardial infarction. *Expert Opin. Biol. Ther.* *14*, 183–195.
- Segers, V.F.M., and Lee, R.T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature* *451*, 937–942.
- Shah, K.B., and Parameshwar, J. (2011). Advances in heart transplantation: The year in review. *J. Heart Lung Transplant.* *30*, 241–246.
- Shah, K.B., Tang, D.G., Cooke, R.H., Harton, S., Flattery, M., Katlaps, G.J., Kasirajan, V., and Hess, M.L. (2011). Implantable Mechanical Circulatory Support: Demystifying Patients With Ventricular Assist Devices and Artificial Hearts. *Clin. Cardiol.* *34*, 147–152.

Shah et al., A.M. (2013). Ventricular Remodeling in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Curr. Heart Fail. Rep.* 1–9.

Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W.-Z., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N.J., Gantz, J., Moyes, K.W., Reinecke, H., et al. (2012). hESC-Derived Cardiomyocytes Electrically Couple and Suppress Arrhythmias in Injured Hearts. *Nature* 489, 322–325.

Shimizu, K., Ito, A., Arinobe, M., Murase, Y., Iwata, Y., Narita, Y., Kagami, H., Ueda, M., and Honda, H. (2007). Effective cell-seeding technique using magnetite nanoparticles and magnetic force onto decellularized blood vessels for vascular tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 472–478.

Shinkai, M. (2002). Functional magnetic particles for medical application. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 606–613.

Shintani, Y., Fukushima, S., Varela-Carver, A., Lee, J., Coppen, S.R., Takahashi, K., Brouillette, S.W., Yashiro, K., Terracciano, C.M.N., Yacoub, M.H., et al. (2009). Donor cell-type specific paracrine effects of cell transplantation for post-infarction heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 47, 288–295.

Shreenivas, S.S., Rame, J.E., and Jessup, M. (2010). Mechanical Circulatory Support as a Bridge to Transplant or for Destination Therapy. *Curr. Heart Fail. Rep.* 7, 159–166.

Slowing, I.I., Vivero-Escoto, J.L., Zhao, Y., Kandel, K., Peeraphatdit, C., Trewyn, B.G., and Lin, V.S.-Y. (2011). Exocytosis of mesoporous silica nanoparticles from mammalian cells: from asymmetric cell-to-cell transfer to protein harvesting. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 7, 1526–1532.

Smart, N., Risebro, C.A., Melville, A.A.D., Moses, K., Schwartz, R.J., Chien, K.R., and Riley, P.R. (2007). Thymosin  $\beta$ 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445, 177–182.

Smart, N., Bollini, S., Dube, K.N., Vieira, J.M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A.N., Lythgoe, M.F., et al. (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474, 640–644.

Smith, A.G. (2001). EMBRYO-DERIVED STEM CELLS: Of Mice and Men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435–462.

Smith, R.R., Barile, L., Messina, E., and Marbán, E. (2008). Stem cells in the heart: What's the buzz all about? Part 2: Arrhythmic risks and clinical studies. *Heart Rhythm* 5, 880–887.

Smits, A.M., Vliet, P., Hassink, R.J., Goumans, M.-J., and Doevendans, P.A. (2005). The role of stem cells in cardiac regeneration. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 25–36.

Solomon, S.D., Zelenkofske, S., McMurray, J.J.V., Finn, P.V., Velazquez, E., Ertl, G., Harsanyi, A., Rouleau, J.L., Maggioni, A., Kober, L., et al. (2005). Sudden Death in Patients with Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction, Heart Failure, or Both. *N. Engl. J. Med.* 352, 2581–2588.

Soonpaa, M.H., and Field, L.J. (1997). Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 272, H220–H226.

Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Klug, M.G., and Field, L.J. (1994). Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264, 98–101.

- Sosnovik, D.E., Nahrendorf, M., Deliolanis, N., Novikov, M., Aikawa, E., Josephson, L., Rosenzweig, A., Weissleder, R., and Ntziachristos, V. (2007). Fluorescence Tomography and Magnetic Resonance Imaging of Myocardial Macrophage Infiltration in Infarcted Myocardium In Vivo. *Circulation* *115*, 1384–1391.
- Statistisches Bundesamt Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis).
- Stearns, R.C., Paulauskis, J.D., and Godleski, J.J. (2001). Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *24*, 108–115.
- Strauer, B.-E., and Steinhoff, G. (2011). 10 Years of Intracoronary and Intramyocardial Bone Marrow Stem Cell Therapy of the Heart: From the Methodological Origin to Clinical Practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* *58*, 1095–1104.
- Sun, S., and Zeng, H. (2002). Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 8204–8205.
- Sun, S., Murray, C.B., Weller, D., Folks, L., and Moser, A. (2000). Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. *Science* *287*, 1989–1992.
- Suzuki, K., Murtuza, B., Fukushima, S., Smolenski, R.T., Varela-Carver, A., Copen, S.R., and Yacoub, M.H. (2004). Targeted Cell Delivery Into Infarcted Rat Hearts by Retrograde Intracoronary Infusion: Distribution, Dynamics, and Influence on Cardiac Function. *Circulation* *110*, II – 225 – II – 230.
- Symes, J.F., Losordo, D.W., Vale, P.R., Lathi, K.G., Esakof, D.D., Mayskiy, M., and Isner, J.M. (1999). Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann. Thorac. Surg.* *68*, 830–836; discussion 836–837.
- Takenaka, S., Karg, E., Kreyling, W.G., Lentner, B., Möller, W., Behnke-Semmler, M., Jennen, L., Walch, A., Michalke, B., Schramel, P., et al. (2006). Distribution pattern of inhaled ultrafine gold particles in the rat lung. *Inhal. Toxicol.* *18*, 733–740.
- Tang, G.H.L., Fedak, P.W.M., Yau, T.M., Weisel, R.D., Kulik, A., Mickle, D.A.G., and Li, R.-K. (2003). Cell transplantation to improve ventricular function in the failing heart. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* *23*, 907–916.
- Tao, Z., Chen, B., Tan, X., Zhao, Y., Wang, L., Zhu, T., Cao, K., Yang, Z., Kan, Y.W., and Su, H. (2011). Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2064–2069.
- Tarzami, S. (2011). Chemokines and inflammation in heart disease: adaptive or maladaptive?
- Taylor, D.A. (2001). Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure. *Curr. Control. Trials Cardiovasc. Med.* *2*, 208–210.
- Taylor, D.A., Atkins, B.Z., Hungspreugs, P., Jones, T.R., Reedy, M.C., Hutcheson, K.A., Glower, D.D., and Kraus, W.E. (1998). Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat. Med.* *4*, 929–933.

- Teng, Y.D., Liao, W.-L., Choi, H., Konya, D., Sabharwal, S., Langer, R., Sidman, R.L., Snyder, E.Y., and Frontera, W.R. (2006). Physical activity-mediated functional recovery after spinal cord injury: potential roles of neural stem cells. *Regen. Med.* *1*, 763–776.
- Terrovitis, J., Stuber, M., Youssef, A., Preece, S., Leppo, M., Kizana, E., Schär, M., Gerstenblith, G., Weiss, R.G., Marbán, E., et al. (2008). Magnetic Resonance Imaging Overestimates Ferumoxide-Labeled Stem Cell Survival After Transplantation in the Heart. *Circulation* *117*, 1555–1562.
- Terrovitis, J., Lautamaki, R., Bonios, M., Fox, J., Engles, J.M., Yu, J., Leppo, M.K., Pomper, M.G., Wahl, R.L., Seidel, J., et al. (2009). Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *J. Am. Coll. Cardiol.* *54*, 1619–1626.
- Terrovitis, J.V., Smith, R.R., and Marban, E. (2010). Assessment and Optimization of Cell Engraftment after Transplantation into the Heart. *Circ. Res.* *106*, 479–494.
- Torchilin, V.P. (2000). Drug targeting. *Eur. J. Pharm. Sci.* *11, Supplement 2*, S81–S91.
- Torney, F., Trewyn, B.G., Lin, V.S.-Y., and Wang, K. (2007). Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Nat. Nanotechnol.* *2*, 295–300.
- Tresilwised, N., Pithayanukul, P., Mykhaylyk, O., Holm, P.S., Holzmüller, R., Anton, M., Thalhammer, S., Adigüzel, D., Döblinger, M., and Plank, C. (2010). Boosting oncolytic adenovirus potency with magnetic nanoparticles and magnetic force. *Mol. Pharm.* *7*, 1069–1089.
- Trueck, C., Zimmermann, K., Mykhaylyk, O., Anton, M., Vosen, S., Wenzel, D., Fleischmann, B.K., and Pfeifer, A. (2012). Optimization of Magnetic Nanoparticle-Assisted Lentiviral Gene Transfer. *Pharm. Res.* *29*, 1255–1269.
- Uchida, S., De Gaspari, P., Kostin, S., Jenniches, K., Kilic, A., Izumiya, Y., Shiojima, I., Grosse Kreymborg, K., Renz, H., Walsh, K., et al. (2013). Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Rep.* *1*, 397–410.
- Veiseh, O., Gunn, J.W., and Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *62*, 284–304.
- Verfaillie, C.M., Pera, M.F., and Lansdorp, P.M. (2002). Stem Cells: Hype and Reality. *ASH Educ. Program Book 2002*, 369–391.
- Vintersten, K., Monetti, C., Gertsenstein, M., Zhang, P., Laszlo, L., Biechele, S., and Nagy, A. (2004). Mouse in red: Red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals. *Genesis* *40*, 241–246.
- Walsh, S., Pontén, A., Fleischmann, B.K., and Jovinge, S. (2010). Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo—an analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc. Res.* *86*, 365–373.
- Wang, C.-C., Chen, C.-H., Lin, W.-W., Hwang, S.-M., Hsieh, P.C.H., Lai, P.-H., Yeh, Y.-C., Chang, Y., and Sung, H.-W. (2008). Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. *Cardiovasc. Res.* *77*, 515–524.

- Wang, C.-C., Chen, C.-H., Hwang, S.-M., Lin, W.-W., Huang, C.-H., Lee, W.-Y., Chang, Y., and Sung, H.-W. (2009). Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 724–732.
- Wenzel, D., Rieck, S., Vosen, S., Mykhaylyk, O., Trueck, C., Eberbeck, D., Trahms, L., Zimmermann, K., Pfeifer, A., and Fleischmann, B.K. (2012). Identification of Magnetic Nanoparticles for Combined Positioning and Lentiviral Transduction of Endothelial Cells. *Pharm. Res.* 29, 1242–1254.
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P., and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 178, 411–414.
- Wobus, A.M., Wallukat, G., and Hescheler, J. (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differ. Res. Biol. Divers.* 48, 173–182.
- Wollert, K.C., and Drexler, H. (2005). Clinical Applications of Stem Cells for the Heart. *Circ. Res.* 96, 151–163.
- Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K., and Krug, H.F. (2006). Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett.* 6, 1261–1268.
- Wottrich, R., Diabaté, S., and Krug, H.F. (2004). Biological effects of ultrafine model particles in human macrophages and epithelial cells in mono- and co-culture. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207, 353–361.
- Wu, J., Li, J., Zhang, N., and Zhang, C. (2011). Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. *Basic Res. Cardiol.* 106, 317–324.
- Xiang, G., Schuster, M.D., Seki, T., Kocher, A.A., Eshghi, S., Boyle, A., and Itescu, S. (2004). Down-regulation of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Expression Promotes Myocardial Neovascularization by Bone Marrow Progenitors. *J. Exp. Med.* 200, 1657–1666.
- Xing, X., He, X., Peng, J., Wang, K., and Tan, W. (2005). Uptake of silica-coated nanoparticles by HeLa cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5, 1688–1693.
- Yadav et al. (2005). Implantable Cardioverter Defibrillators. Prophylactic Use. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* 5, 1–74.
- Yasuda, T., Weisel, R.D., Kiani, C., Mickle, D.A.G., Maganti, M., and Li, R.-K. (2005). Quantitative analysis of survival of transplanted smooth muscle cells with real-time polymerase chain reaction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 129, 904–911.
- Ye, L., Haider, H.K., Guo, C., and Sim, E.K.W. (2007). Cell-Based VEGF Delivery Prevents Donor Cell Apoptosis After Transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 83, 1233–1234.
- Yoon, Y.-S., Park, J.-S., Tkebuchava, T., Luedeman, C., and Losordo, D.W. (2004). Unexpected Severe Calcification After Transplantation of Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 109, 3154–3157.

Zhang, D., Wang, L., Zhang, F., Li, C., Zhu, T., Cao, K., Ma, W., and Yang, Z. (2013). Nine-year follow-up of local implantation of autologous skeletal myoblasts in a patient with coronary heart disease. *Am. J. Case Rep.* *14*, 139–142.

Zhang, M., Methot, D., Poppa, V., Fujio, Y., Walsh, K., and Murry, C.E. (2001). Cardiomyocyte Grafting for Cardiac Repair: Graft Cell Death and Anti-Death Strategies. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *33*, 907–921.

Zhang, Y., Li, W., Ou, L., Wang, W., Delyagina, E., Lux, C., Sorg, H., Riehemann, K., Steinhoff, G., and Ma, N. (2012). Targeted Delivery of Human VEGF Gene via Complexes of Magnetic Nanoparticle-Adenoviral Vectors Enhanced Cardiac Regeneration. *PLoS ONE* *7*.

Zimmermann, K., Scheibe, O., Kocourek, A., Muelich, J., Jurkiewicz, E., and Pfeifer, A. (2011). Highly efficient concentration of lenti- and retroviral vector preparations by membrane adsorbers and ultrafiltration. *BMC Biotechnol.* *11*, 55.

Zolotareva, A.G., and Kogan, M.E. (1978). Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa* *20*, 308–314.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MHC	<i>Alpha-myosin heavy chain</i> / Alpha-Myosin Schwere Kette
$\alpha$ -Myosin	Herz-spezifischer Promotor $\alpha$ -MHC
$\alpha$ -PIG-Zellen	<i>Alpha-MHC-Pur-IRES-eGFP</i>
$\alpha$ -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
ADP 90	Aktionspotentialdauer bei 90 % der Repolaristaion
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHK21	Nierezellen des Hamsters
Bl6	C57BL/6
BMC	<i>Bone marrow cells</i> = Knochenmarkzellen
bPAECs	<i>Bovine pulmonary endothelial cells</i>
BR	<i>Basophile Rattenleukämiezellen</i>
CAC	Kalzifizierung der Koronararteria
CAG	Beta-Aktin Promotor des Huhns mit Cytomegalie-Virus Verstärker
CdSe	Kolloidalen Cadmiumselenid
CD1 WT	CD1 Wild-Typ
CDC	<i>Cardiosphere-derived cells</i>
CHO	<i>Chinesische Hamsterovarienzellen</i>
CM	Kardiomyozyten
CMV	Cytomegalie-Virus
CRP	C-reaktives Protein
Cx43	Connexin43
DIC	Differentialinterferenzkontrast
d	Durchmesser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS-Red	Rot fluoreszierende Protein
E	Tag der Embryonalentwicklung
EB	<i>Embryoid Bodies</i> / Embryonalkörper
ECM	Extrazelluläre Matrix
eCM	Embryonale Kardiomyozyten
EDP	Enddiastolischer Druck
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddistolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> / Verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EM	Elektronenmikroskopie
env	Hüllprotein
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ES-CM	ES-Zell abgeleitete Kardiomyozyten
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
Fc	Konstanter Teil der schweren Kette
FKS	Fötale Kälberserum
Fluka	Eindeckmedium auf Wasserbasis
FSH	Follikelstimulierendes Hormon

## Abkürzungsverzeichnis

---

h	Höhe
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin- Eosin
HF	Herzfrequenz
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i> = Hämatopetische Stammzellen
HTx	Herztransplantation
HZV	Herzzeitvolumen
ICR	Interkostalraum
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
IONP	Eisen Oxid Nanopartikeln
IP	Infektiösen Viruspartikel
i.p.	Intraperitoneal
KHK	Koronare Herzerkrankung
KI	Kryoinfarkt
KZ	Kurzzeit (14 Tagen)
LAD	<i>Left anterior descending coronary artery</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LHK	Linksherzkatheter
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LV	Lentivirale Vektoren
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVSD	Linsventrikuläre systolische Dysfunktion
LZ	Langzeit (56 Tagen)
+ M	Mit Magnet
- M	Ohne Magnet
Max. dV/dt	Geschwindigkeit der Spannungsänderung
MEM	Nicht essentielle Aminosäure
mES-Zellen	Murine embryonale Stammzellen
Min	Minuten
MNP	Magnetische Nanopartikel
MPS	<i>magnetic particle spectroscopy</i>
MR	Membranwiderstand
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i> = Mesenchymale Stammzellen
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N / n	Anzahl
NDT	NDT-Mag1
NMR	Kernspinresonanz
NYHA	<i>New-York-Heart-Association</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Perkutane Koronarintervention
PCM1	<i>Pericentriolar Material 1</i>
PALD	PALD2-Mag1
PEI	Polyethylenimin (PEI-Mag2)
PFA	Paraformaldehyd
PHH3	Phosphohiston H3
RHK	Rechtsherzkatheter
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>



---

RMP	Ruhemembranpotential
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-Zellkulturmedium</i>
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Reversen Transkriptase
RT	Raumtemperatur
RVU	Relative Volumeneinheit
SEM	<i>Standard Error of the mean</i> , Standardfehler
SIN	Selbst inaktivierend
SM	Skeletale Myoblasten
SO	Siliziumoxid (SO-Mag5)
SPIO	Superparamagnetische Eisenoxidnanopartikel
SPM	Superparamagnetische Mikrosphären
SV	Schlagvolumen
SV129	129S2/SvPasCrl
TCA	Trichloressigsäure
TF	TF-HES-Mag
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP biotin nick end labeling</i>
Tx	Transplantation
USPIO	<i>Ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
veffLuc	Condon-optimierte <i>firefly Luciferase</i>
Vim	Vimentin
VP	Viruspartikel
VTs	Ventrikuläre Tachykardien
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat
$\alpha$ -MHC	<i>Alpha-myosin heavy chain</i> / Alpha-Myosin Schwere Kette
$\alpha$ -Myosin	Herz-spezifischen Promotor $\alpha$ -MHC
$\alpha$ -PIG-Zellen	<i><math>\alpha</math>-MHC-Pur-IRES-eGFP</i>
$\alpha$ -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>



## 8. Anhang

### 8.1 Publikationsliste

**Ottersbach A**, Zimmermann K, Eberbeck D, Heidsieck A, Mykhaylyk O, Gleich B, Trahms L, Plank C., Pfeifer A, Bloch W, Fleischmann BK, Roell W. *Sitespecific positioning of magnetic nanoparticle loaded cells improves cell homing and myocardial function in a murine myocardial infarction model*. Manuskript in Vorbereitung

Raulf A, Horder H, Tarnawski L, Geisen C, **Ottersbach A**, Röhl W, Jovinge S, Fleischmann BK, Hesse M. *Transgenic systems for unequivocal identification of cardiac myocyte nuclei and analysis of cardiomyocyte cell cycle status*. Basic Res Cardiol. **2015** May; 110(3):489

Vogt CC\*, Bruegmann T\*, Malan D, **Ottersbach A**, Roell W, Fleischmann BK, Sasse P. *Systemic gene transfer enables optogenetic pacing of mouse hearts*. Cardiovasc Res. **2015** May 1; 106(2):338-43.

Kilgus C, Heidsieck A, **Ottersbach A**, Roell W, Trueck C, Fleischmann BK, Gleich B, Sasse P. *Local gene targeting and cell positioning using magnetic nanoparticles and magnetic tips: comparison of mathematical simulations with experiments*. Pharm Res. **2012** May; 29(5):1380-91

Herz K\*, Heinemann JC\*, Hesse M, **Ottersbach A**, Geisen C, Fuegemann CJ, Röhl W, Fleischmann BK, Wenzel D. *Live monitoring of small vessels during development and disease using the *flt-1* promoter element*. Basic Res Cardiol. **2012** March; 107(2):257

\* geteilte Erstautorenschaft

## 8.2 Vorträge und Posterbeiträge auf Konferenzen

*Site-specific positioning of magnetic nanoparticle (MNP) loaded progenitors improves survival of the grafted cells and long-term myocardial function upon myocardial infarction*, Vortrag im Rahmen der 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Freiburg, 02/2014.

*Site-specific positioning of magnetic nanoparticle loaded cells improves cell homing in a murine myocardial infarction model*, Vortrag im Rahmen der 92. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Heidelberg, 03/2013.

*Site-specific positioning of magnetic nanoparticle (MNP) loaded cells improves cell homing and cardiac function*, Vortrag im Rahmen der 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Freiburg, 02/2013.

*Site-specific positioning of magnetic nanoparticle loaded progenitors improves survival of the grafted cells and myocardial function upon myocardial infarction*, Vortrag im Rahmen des Jahrestreffens der Bonner Graduiertenschule THEME (Theoretical and Experimental Medicine) in Bad Honnef, 10/2012.

### 8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all denjenigen zu bedanken, die mit Ihrer Hilfe zur Entstehung dieser Dissertationsschrift beigetragen haben.

Ich möchte mich an erster Stelle ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. B. K. Fleischmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Möglichkeit dieses spannende Promotionsthema übernehmen zu dürfen und die vertrauensvolle Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. D. O. Fürst danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Zweitbetreuung von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Höhfeld und Herrn Prof. Dr. K. Mohr bedanke ich mich ganz herzlich für die Bereitschaft als Mitglied der Promotionskommission beizuwohnen.

Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. W. Röhl, der mit seinen hilfreichen Ideen, seinem Wissen und Ratschlägen zur erfolgreichen Planung und Umsetzung der Experimente beigetragen hat.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Physiologie I sowie ehemaligen Kollegen für das angenehme Arbeitsklima. Ihr habt eine Atmosphäre geschaffen, in der man mit Freude an die Arbeit gehen konnte. Ein großes Dankeschön geht hier besonders an Frau Dr. Stephanie Friedrichs und an Herrn Christoph Vogt, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne deren Unterstützung ich nicht soweit im Leben gekommen wäre. Euer unerschütterlicher Glaube an mich hat mich stets wieder aufgebaut. Ohne eure Hilfe wären mein Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank für alles!