

Aus dem
Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Schrader

**Intrakoronare Transplantation
Humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen
(HUVECs)
in das Rattenmyokard:
Machbarkeit und Zellschicksal**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Assmann
2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg (Dekan)

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Emmeran Gams

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
1.1	Akuter Myokardinfarkt – Therapieoption Zelltransplantation	9
1.1.1	<i>Physiologische Möglichkeiten der Herzmuskelregeneration</i>	<i>9</i>
1.1.2	<i>Bedeutung der Erforschung der Regenerationsmöglichkeiten nach akutem Myokardinfarkt.....</i>	<i>10</i>
1.1.3	<i>Therapieoptionen bei akutem Myokardinfarkt.....</i>	<i>11</i>
1.2	Zelltransplantation	11
1.2.1	<i>Graftmaterial.....</i>	<i>11</i>
1.2.2	<i>Applikationswege.....</i>	<i>13</i>
1.2.2.1	Intravenöse Applikation	14
1.2.2.2	Intramyokardiale Applikation.....	14
1.2.2.3	Intrakoronare Applikation.....	16
1.2.3	<i>Überwachung der Herzfunktion</i>	<i>17</i>
1.3	Klinische Zelltransplantations-Studien	17
1.4	Regenerative Transplantat-Einflüsse auf die Herzmuskulatur	19
1.4.1	<i>Transdifferenzierung applizierter Zellen.....</i>	<i>19</i>
1.4.2	<i>Fusion transplanteder Zellen mit Kardiomyozyten</i>	<i>21</i>
1.4.3	<i>Parakrine Effekte und Angiogenese</i>	<i>21</i>
1.5	Apoptose und Gen-Transfer als mögliche Distraktoren	23
1.5.1	<i>Zelldetektion mittels EGFP</i>	<i>23</i>
1.5.2	<i>Apoptotische Körperchen und Gen-Transfer</i>	<i>23</i>
1.6	Ziel der vorliegenden Studie	25
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	MATERIAL.....	27
2.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>27</i>
2.1.2	<i>Antikörper</i>	<i>29</i>
2.1.2.1	Primärantikörper	29
2.1.2.1.1	Monoklonal	29
2.1.2.1.2	Polyklonal	29
2.1.2.2	Sekundärantikörper	30
2.1.3	<i>Medien.....</i>	<i>30</i>

2.1.4	<i>Gebrauchslösungen</i>	31
2.1.5	<i>Geräte und Gebrauchswaren</i>	31
2.1.6	<i>Sterilisation von Lösungen und Geräten</i>	33
2.1.7	<i>Organismen</i>	33
2.2	METHODEN	33
2.2.1	<i>in vitro durchgeführte Methoden</i>	33
2.2.1.1	HUVEC-Isolierung und –Kultivierung	33
2.2.1.2	Isolierung neonataler Kardiomyozyten.....	34
2.2.1.3	Generierung Apoptotischer Körperchen.....	35
2.2.1.4	Zellmarkierung mit CellTracker™ Orange	35
2.2.1.5	Zellmarkierung mit EGFP.....	36
2.2.1.6	Zellmarkierung mit ¹¹¹ Indium-Oxin	36
2.2.1.7	Co-Kultivierung von neoKMs mit HUVECs.....	36
2.2.1.8	Co-Inkubation von neoKMs mit ABs	37
2.2.1.9	Immunfluoreszenz-Färbungen zu den <i>in vitro</i> -Experimenten...	37
2.2.1.10	Immunfluoreszenz-Färbungen zu den <i>in vivo</i> -Experimenten	38
2.2.1.11	Immunhistochemie-Färbungen zu den <i>in vivo</i> -Experimenten	38
2.2.1.12	Versuche mit Ciclosporin A.....	39
2.2.1.13	Nachweis von EGFP-DNA in HUVECs	40
2.2.2	<i>in vivo durchgeführte Methoden</i>	41
2.2.2.1	Intrakoronare Zellapplikation.....	41
2.2.2.2	Echokardiographie	43
2.2.2.3	SPECT nach intrakoronarer HUVEC-Applikation.....	44
2.2.3	<i>Statistik</i>	44
3	ERGEBNISSE	45
3.1	Schicksal intrakoronar applizierter EGFP-HUVECs	45
3.1.1	<i>Kontroll-Untersuchungen zu den in vivo-Experimenten</i>	45
3.1.1.1	Einfluss der EGFP-Expression auf den Phänotyp von HUVECs.....	45
3.1.1.2	Einfluss von CsA auf die Integrität der HUVECs.....	46

3.1.1.3	Intraobserver-Abweichungen bei der Ratten- Echokardiographie.....	47
3.1.2	<i>Verteilung intrakoronar applizierter HUVECs</i>	49
3.1.3	<i>Schicksal intrakoronar applizierter HUVECs</i>	53
3.1.3.1	Intrakoronare EGFP-HUVEC-Lokalisation in den ersten 24 h	54
3.1.3.2	Langzeitbeobachtungen nach Zelltransplantation	56
3.1.3.3	Apoptose intrakoronar transplanteder HUVECs	60
3.1.4	<i>Hämodynamische Auswirkungen der Zelltransplantation</i>	63
3.2	Mechanismus des Apoptose-induzierten EGFP-Transfers von HUVECs in Ratten-Kardiomyozyten	66
3.2.1	<i>Nukleinsäuren-tragende ABs aus Apoptotischen HUVECs</i>	66
3.2.2	<i>Nachweis von EGFP-DNA in HUVECs und deren ABs mittels PCR</i>	67
3.2.3	<i>Co-Kultivierung von neoKMs mit EGFP-HUVECs</i>	68
3.2.4	<i>DNA-Transfer von ABs in neoKMs nach Co-Inkubation</i>	69
3.2.5	<i>Apoptose EGFP-transduzierter Kardiomyozyten</i>	70
3.3	Direkter DNA-Transfer von ABs in Kardiomyozyten <i>in vivo</i>	71
4	DISKUSSION	73
4.1	Intrakoronare HUVEC-Transplantation in der Ratte.....	73
4.1.1	<i>Alternative Transplantationsverfahren</i>	73
4.1.2	<i>Etablierung eines intrakoronaren Applikationsverfahrens</i>	74
4.2	HUVECs transdifferenzieren sich nicht in Kardiomyozyten.....	76
4.2.1	<i>Transdifferenzierungsberichte in der Literatur</i>	76
4.2.2	<i>Transdifferenzierungs- und Fusionspotenzial der HUVECs</i>	77
4.3	Horizontaler EGFP-Transfer von HUVECs in Kardiomyozyten.....	78
4.3.1	<i>Protein-Transfer</i>	79
4.3.2	<i>Nukleinsäuren-Transfer via ABs</i>	79
4.3.3	<i>Mögliche Apoptose-Auslöser</i>	81
4.4	Ausblick	83
4.4.1	<i>EGFP als potenzieller Distraktor</i>	83
4.4.2	<i>Transdifferenzierung und Myokardregeneration</i>	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	86

6	LITERATURVERZEICHNIS	87
7	PUBLIKATIONEN AUS DER VORLIEGENDEN ARBEIT	95
7.1	Journal-Publikationen	95
7.2	Vorträge	95
7.3	Poster-Präsentationen.....	95
8	DANKSAGUNG	96
9	CURRICULUM VITAE.....	97

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AB	Apoptotisches Körperchen
AMI	Akuter Myokardinfarkt
BMC	Knochenmark-Stammzelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CsA	Ciclosporin A
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
ECM	Endothelial cell growth medium
EDD	Enddiastolischer linksventrikulärer Diameter
EDHW	Enddiastolische linksventrikuläre Hinterwanddicke
EDS	Enddiastolische Dicke des interventrikulären Septums
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPC	Endotheliale Progenitorzelle
ESC	Embryonale Stammzelle
ESD	Endsystolischer linksventrikulärer Diameter
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FS	Linksventrikuläre Verkürzungsfraktion
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hM	Humane Mitochondrien
HUVEC	Humane Nabelschnurvenen-Endothelzelle
LV	Linksventrikulär
M.199	Medium 199
MCT-1	Monocarboxylat-Transporter-1
MEM	Dulbecco's Minimum Essential Medium Eagle
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MyHC	Myosin Heavy Chain
neoKM	Neonataler Kardiomyozyt
NGS	Normales Ziegenserum

Verwendete Abkürzungen

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PTCA	Perkutane Transluminale Koronarangioplastie
RT	Raumtemperatur
SMB	Skelettaler Myoblast
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TTE	Transthorakale Echokardiographie
v / v	Volumenanteil
w / v	Massenanteil (Gewicht / Volumen)

1 EINLEITUNG

1.1 Akuter Myokardinfarkt – Therapieoption Zelltransplantation

1.1.1 Physiologische Möglichkeiten der Herzmuskelregeneration

Das menschliche Herz ist nicht in der Lage, nach einem Zelluntergang – z.B. im Rahmen eines Myokardinfarktes – zu regenerieren, da den terminal differenzierten Kardiomyozyten im Gegensatz zu z.B. den Skelettmuskelfasern eine ausreichende Zahl an Satellitenzellen (SMBs) fehlt. Bei den Satellitenzellen handelt es sich um residente Myoblasten mit der Fähigkeit, sich im Falle eines Untergangs von Skelettmuskelzellen in Muskelfasern zu differenzieren. Adulte Kardiomyozyten sind lediglich in der Lage, mittels Zellhypertrophie auf myokardiale Substanzverluste bzw. auf vermehrte Belastung zu reagieren. Mit zunehmender Hypertrophie verschlechtert sich jedoch die Versorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff und Substraten, weil der wachstumsbedingte, progrediente Versorgungsbedarf der Kardiomyozyten durch die umliegenden Kapillaren nicht mehr gedeckt werden kann.

Dem bis heute geltenden Dogma, dass das Herz ein ausschließlich postmitotisches Organ ist, stehen jedoch Beobachtungen entgegen, die auf die Existenz adulter kardialer Stammzellen hinweisen. Arbeiten von *Kajstura et al. (1998)* und *Beltrami et al. (2001)* konnten eine geringe Rate kardiomyozytärer Mitosen in humanen Herzen (n = 9 bzw. n = 10 gesunde Herzen) nachweisen. Die proliferative Aktivität der Kardiomyozyten war bei Kardiomyopathien (n = 27) oder nach akutem Myokardinfarkt (AMI) (n = 13) – im Besonderen in der Infarktregion – deutlich gesteigert. *Beltrami et al. (2003)* beschrieben eine Population kardialer Progenitorzellen ($\text{Lin}^- \text{c-kit}^+$), welche sich als selbsterneuernd, klonal und multipotent erwiesen. So differenzierten sich diese Zellen in Kultur in Myozyten, glatte Muskelzellen oder Endothelzellen und führten zu myokardialer Regeneration im AMI-Rattenmodell nach Transplantation in die Infarkttrandzone. Die Anzahl dieser Zellen im Herzen ist vermutlich ausreichend, den im Laufe des Lebens natürlichen Verlust an

Kardiomyozyten durch z.B. Apoptose auszugleichen (vgl. *Anversa & Nadal-Ginard, 2002*). Die Kompensation vielzelliger Nekrosen, wie sie z.B. im Rahmen eines AMI entstehen, ist jedoch nicht möglich. Allerdings wird zur Zeit in verschiedenen Labors daran gearbeitet, die Proliferation kardialer Stammzellen zu stimulieren, um sie möglicherweise später einmal therapeutisch zu nutzen.

Der Säugetier-Organismus verfügt also über keine ausreichenden Mechanismen, eine größere Schädigung seines zentralen Kreislauforgans durch eine *Restitutio ad integrum* zu kompensieren.

1.1.2 Bedeutung der Erforschung der Regenerationsmöglichkeiten nach akutem Myokardinfarkt

Dass die fehlende Regenerationsfähigkeit des humanen Myokards von großer medizinischer Bedeutung ist, macht das Beispiel der Koronaren Makroangiopathie deutlich. Arteriosklerosebedingte Stenosen in den Herzkranzgefäßen erhöhen den Koronarwiderstand und vermindern somit die Koronarreserve, d.h. die Differenz zwischen Ruhe- und maximaler Koronardurchblutung. Unter vermehrter Belastung z.B. durch gesteigerte Herzarbeit oder nach (sub)totalem Gefäßverschluss tritt – bei zumeist fehlender Kollateralisierung der als Endarterien zu betrachtenden Koronargefäße – distal der Stenose eine Koronarinsuffizienz auf. Dies führt zur Imbalance zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot und damit zu einer lokalen Myokardischämie und zur Schädigung der betroffenen Kardiomyozyten. Wird ein Koronargefäß z.B. nach Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques durch den entstehenden Thrombus verschlossen, kommt es zu einem akuten Myokardinfarkt (AMI) mit postläsionaler Myokardnekrose. Bei ausreichender Größe des infarzierten Areals entwickelt sich in der Folge eine Herzinsuffizienz, die die Lebenserwartung signifikant verringert (vgl. *Hellermann et al., 2005*). Da kardiovaskuläre Erkrankungen – unter denen die koronare Makroangiopathie mit über 50% dominiert – die häufigste Todesursache in der Bevölkerung der Industrienationen sind (vgl. *AHA Statistics Committee, 2006*), kommt der

Erforschung der Regenerationsmöglichkeiten des Myokards eine große Bedeutung zu.

1.1.3 Therapieoptionen bei akutem Myokardinfarkt

Die derzeitigen Therapieoptionen des AMI sind nach wie vor inadäquat. Durch minimal invasive Verfahren wie die Perkutane Transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder eine Akut-Thrombolyse können zwar die unmittelbaren Ursachen des Infarktes beseitigt werden, nicht jedoch seine Folgen in Form irreversibler Zellnekrosen. Gleiches gilt für die koronare Bypasschirurgie. Die partielle Ventrikulektomie nach *Batista* spielt heute gemäß *Kawaguchi et al. (2005)* keine Rolle mehr, da sie im Verlust großer, teilweise auch nichtinfarzierter Myokardvolumina resultiert und somit nur in Fällen schwerer dilatativer Kardiomyopathie überhaupt indiziert ist. Ist die Funktion eines insuffizienten Herzens pharmakologisch nicht mehr ausreichend aufrechtzuerhalten, ist eine Herztransplantation die Therapie der Wahl. Für allogene Transplantationen steht jedoch nur eine unzureichende Anzahl Spenderorgane zur Verfügung und die klinische Durchführung von Xenotransplantationen ist nicht absehbar (vgl. *Cooper, 2003*). Auch beim Einsatz mechanischer Ersatzherzen besteht noch umfassender Entwicklungsbedarf (vgl. *Gray & Selzman, 2006*). Große Hoffnungen ruhen daher auf der Transplantation von Zellen mit dem Potenzial zur Regeneration humanen Myokards.

1.2 Zelltransplantation

1.2.1 Graftmaterial

Da das humane Myokard keine ausreichende Anzahl Myoblasten enthält, welche sich bei Bedarf in Kardiomyozyten differenzieren können, ist in der

Vergangenheit der Ansatz verfolgt worden, der Herzmuskulatur Zellen zuzuführen, die sich im Herzen in funktionstüchtige Kardiomyozyten umwandeln oder über parakrine Mechanismen die myokardiale Regeneration triggern können. Verschiedenste Zellpopulationen wurden bereits auf ihr Potenzial zur Verbesserung einer alterierten Herzfunktion untersucht. Zu den am häufigsten diskutierten Zellen gehören Embryonale Stammzellen (ESCs) sowie Skelettale Myoblasten (SMBs) und Knochenmark-Stammzellen (BMCs) als Vertreter der adulten Stammzellen.

Einige Studien untersuchten das postischämische myokardiale Regenerationspotenzial transplanteder SMBs. Während z.B. *Brasselet et al. (2005)* im Schafmodell positive Effekte auf die linksventrikuläre Pumpfunktion beobachteten, zeigten andere Arbeitsgruppen den arrhythmogenen Charakter der SMBs (vgl. *Menasche et al., 2003* und *Abraham et al., 2005*), so dass dieses Verfahren wahrscheinlich als zukünftige Therapieoption nicht in Frage kommt.

ESCs besitzen unter den genannten Zellgruppen zwar das größte Differenzierungspotenzial, ihr Einsatz als Graftmaterial geht jedoch mit einer Vielzahl an Schwierigkeiten einher. Neben der immunsystemvermittelten Abstoßungsproblematik nach Transplantation ist zu bedenken, dass die Gewinnung und Verwendung von ESCs kontroverse Diskussionen über ethische Grundfragen ausgelöst hat. Weiterhin lässt im speziellen Fall der Herzmuskelregeneration das von *Zhang et al. (2002)* beschriebene arrhythmogene Potenzial von in Kardiomyozyten differenzierten ESCs deren klinische Nutzbarkeit fragwürdig erscheinen.

Aus Knochenmark lassen sich zahlreiche Stammzelltypen gewinnen, unter denen Hämatopoetische und Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sowie Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) in der Literatur bislang besonders häufig Verwendung als Graftmaterial gefunden haben.

Zu der Gruppe der Endothel- und endothelialen Vorläuferzellen zählen die Humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs). HUVECs sind vergleichsweise einfach zu isolierende Zellen, die unter anspruchsarmen

Kulturbedingungen über zahlreiche Passagen hinweg ihre Zellintegrität nicht verändern. Weitreichende ethische Bedenken im Hinblick auf ihre Verwendung bestehen nicht.

1.2.2 Applikationswege

Bevor die zu transplantierenden Zellen ihre potenzielle Wirkung entfalten können, müssen sie an ihren gewünschten Wirkort – das Myokard – gelangen. Eine effektive Zellverabreichung liegt dann vor, wenn ein großer Teil des Transplantates das Herz erreicht und nicht in anderen Organen akkumuliert. Für die Zellapplikation mit dem Ziel myokardialer Regeneration sind verschiedene Wege beschrieben worden (Abbildung 1.1).

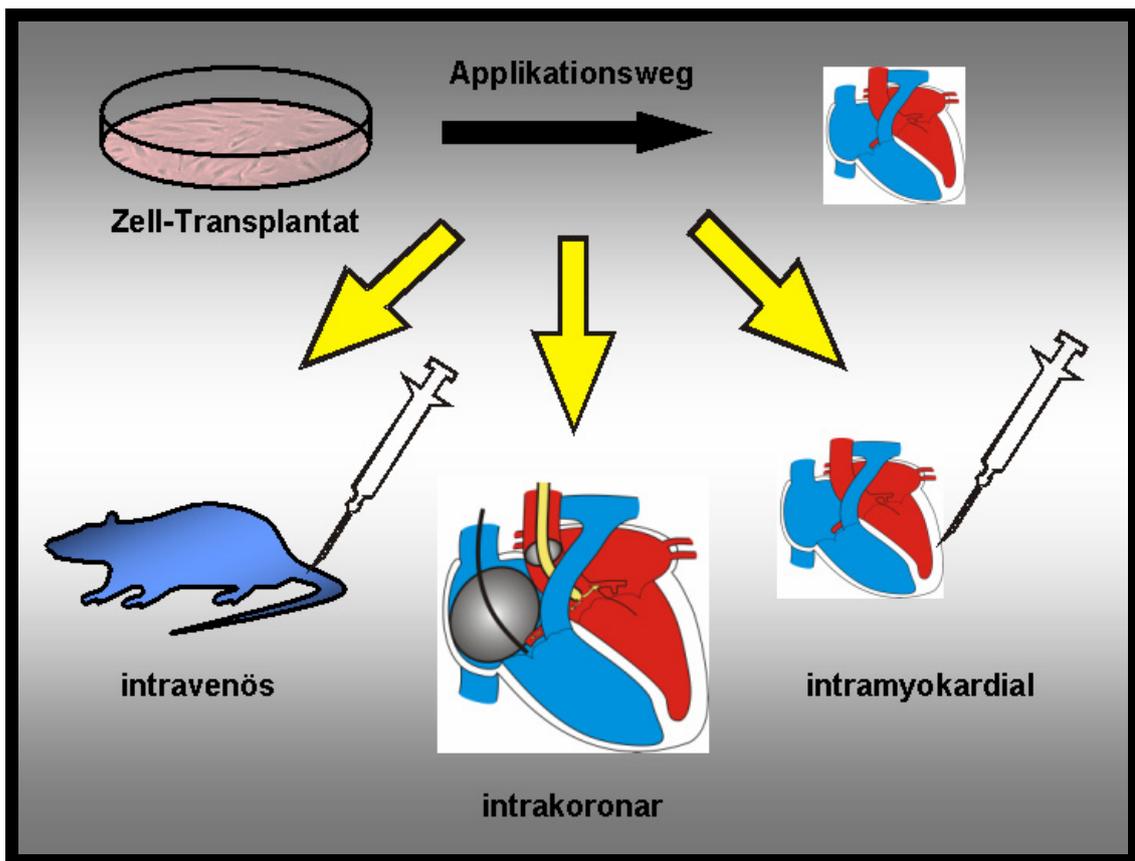


Abb. 1.1: Applikationswege für Zelltransplantationen mit dem Ziel myokardialer Graftdeposition.

1.2.2.1 Intravenöse Applikation

Der methodisch einfachste Weg ist die intravenöse Graftdeposition. Allerdings erreichen nur wenige Zellen das Zielorgan Herz. Lediglich 3 – 5% des Herzzeitvolumens fließen durch die Koronargefäße; außerdem unterliegen die applizierten Zellen einem durch die Passage der Lungenkapillaren verursachten First-Pass-Effekt, so dass ein Teil des Transplantates in der Lunge hängen bleibt. So applizierten *Aicher et al. (2003)* mit ¹¹¹Indium-Oxin markierte EPCs (10⁶ Zellen) über die Schwanzvenen in Ratten. Während in den ersten 96 Stunden ca. 72% der Radioaktivität in Leber, Milz und Nieren zu finden waren, konnte nur ca. 1% der Zellen im Herzen nachgewiesen werden. Um das Ergebnis zu verbessern, erfolgte in einer weiteren Versuchsreihe die Zellapplikation transdiaphragmal in den linken Ventrikel. Bei fehlendem Lungen-First-Pass-Effekt konnte so der Anteil der Radioaktivität im Herzen immerhin verdreifacht werden; dennoch hatten 97% der Zellen das Zielorgan nicht erreicht.

Bei der intravenösen Applikation erhält also nur ein geringer Anteil der eingesetzten Zellen überhaupt Kontakt mit myokardialer Kapillarendothel und somit die Gelegenheit zur Migration in das Zielgebiet. Der überwiegende Anteil wird in andere Organe transportiert und kann hier schwer kontrollierbare Nebenwirkungen verursachen. Aus diesen Gründen kommt die intravenöse Zellapplikation als Therapieoption zur Regeneration des Herzens nach AMI nicht in Betracht.

1.2.2.2 Intramyokardiale Applikation

Eine weitere Möglichkeit ist die direkte intramyokardiale Zellapplikation. Diese hat den Vorteil, dass das komplette Graftmaterial in der Zielregion positioniert werden kann. Um das Myokard zu erreichen, stehen zwei Zugangswege zur Verfügung: die transepikardiale Deposition im Rahmen einer chirurgischen Intervention sowie die transendokardiale Transplantation mittels Angiokatheter.

Beide Varianten sind in verschiedenen tierexperimentellen Studien untersucht worden (vgl. *Kornowski et al., 2000* und *Fuchs et al., 2001*).

Die transepikardiale Route setzt einen invasiven Eingriff mit Punktion des schlagenden Herzens durch das Perikard hindurch voraus und geht daher mit erheblichen Risiken wie Ventrikelperforation und Herzbeutelamponade einher. Allenfalls im Rahmen einer sowieso notwendigen koronaren Bypassoperation – wie von *Menasche et al. (2001)* beschrieben – wäre diese Methode einsetzbar. Eine breite klinische Anwendung erscheint jedoch nicht praktikabel.

Die Technik der transendokardialen Zellverabreichung wurde von *Fuchs et al. (2006)* an 27 Patienten mit schwerer koronarer Makroangiopathie getestet und für sicher erklärt. Um die Zellen (BMCs) nicht in bereits nekrotisierte Myokardareale zu applizieren, wurde zusätzlich ein elektromechanisches Mappingverfahren eingesetzt, das eine dreidimensionale Rekonstruktion des linken Ventrikels erlaubt. Dennoch können intraventrikuläre Manipulation und transendokardiale Punktion Herzrhythmusstörungen wie ventrikuläre Extrasystolen oder Kammertachykardien auslösen oder ein arrhythmogenes ektopes Zentrum schaffen.

Bei beiden Formen der intramyokardialen Zellapplikation wird das Transplantat als Zellsuspension in einen durch die Injektion formierten interzellulären Raum appliziert. Dass die dadurch verursachte Gewebsverletzung einen Inflamationsprozess verursacht, konnten *Merx et al. (2005)* durch intramyokardiale Injektion von HUVEC-Suspensionen in Ratten einen Monat nach Myokardinfarkt-Operation zeigen. Es ist zu vermuten, dass die attrahierten Makrophagen viele der applizierten Zellen abräumen, ehe diese überhaupt ihr Regenerationspotenzial entfalten können. Dem scheinbaren Vorteil der intramyokardialen Zelldeposition wird somit durch technik-immanente Inflamationsvorgänge entgegengewirkt. Darüber hinaus haben in einem suspensionsgefüllten Raum nur wenige randständige Zellen Kontakt zu dem umliegenden Gewebe, während der überwiegende Teil der applizierten Zellen nicht mit den Empfänger-Kardiomyozyten in Verbindung kommt. Zellinteraktionen, die die myokardiale Regeneration unterstützen könnten, sind somit nur wenigen der transplantierten Zellen möglich.

1.2.2.3 Intrakoronare Applikation

Die intrakoronare Applikation über einen endovaskulären Katheter bietet die Möglichkeit, alle transplantierten Zellen unmittelbar mit dem koronaren Endothel in Kontakt zu bringen, ohne das Myokard punktieren zu müssen. In der Literatur finden sich kaum tierexperimentelle Studien, in denen katheterbasierte intrakoronare Zellapplikation eingesetzt wurde. Ein Grund hierfür ist sicherlich die fehlende Verfügbarkeit von Kathetersystemen für Mäuse und Ratten.

Freyman et al. (2006) verglichen die Effektivität des intravenösen, des transendokardialen und des intrakoronaren Applikationsverfahrens mit MSCs am AMI-Schweinemodell. Hierbei ergaben sich die besten Werte nach intrakoronarer Route: 14 Tage nach Intervention konnten 6% der verabreichten Zellen in der Infarktzone detektiert werden, während der entsprechende Wert nach transendokardialer Applikation bei 3% lag. Nach intravenöser Transplantation kam es zu keiner dauerhaften Platzierung von MSCs im Infarktareal. *Hou et al. (2005)* quantifizierten im Schwein die Verteilung 10^7 ^{111}In -Oxin-markierter humaner peripherer mononukleärer Zellen nach intrakoronarer Applikation und die Verteilung nach intramyokardialer Transplantation. Für die intrakoronare Route ergab sich 1 h nach Intervention eine kardiale Depositionseffektivität von < 3% der eingesetzten Zellen. Über den transepikardialen Zugangsweg erreichten durchschnittlich 11% des Graftmaterials das Herz, wobei eine starke interindividuelle Schwankungsbreite imponierte.

Fasst man die Datenlage zu den genannten möglichen Applikationswegen zusammen, ergibt sich, dass der intravenöse Weg wegen mangelnder Effektivität und die intramyokardiale Injektion wegen hohen Risikopotenzials bzw. ineffektiver lokaler Zellakkumulation unzureichend sind. Die intrakoronare Zelltransplantation konnte in Großtierversuchen sowie an Patienten bereits ohne nennenswerte Nebenwirkungen erfolgreich eingesetzt werden. Um diese vielversprechende Technik auch im Rattenmodell verwenden zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit das von *Ding et al. (2004)* entwickelte Kathetermodell

für Nager genutzt, das eine effektive minimal invasive koronare Graftdeposition ermöglicht.

1.2.3 Überwachung der Herzfunktion

Um hämodynamische Veränderungen nach einer Zelltransplantation überwachen zu können, bietet sich die transthorakale Echokardiographie (TTE) als schnell und einfach durchzuführendes Verfahren an. *Litwin et al. (1994)* konnten mittels TTE an AMI-operierten Ratten den linksventrikulären Remodelling-Prozess strukturell und funktionell verfolgen. *Scorsin et al. (1997)* und *Agbulut et al. (2004)* verglichen auf Basis echokardiographisch ermittelter Daten die hämodynamischen Veränderungen in verschiedenen Gruppen zelltransplantierter Ratten miteinander. *Schwarz et al. (1998)* bewerteten in einer umfangreichen Rattenstudie die Einsatzmöglichkeiten unterschiedlicher Echokardiographiemethoden. Mit der TTE konnten sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen über Struktur und Funktion des linken Ventrikels bei Ratten gemacht werden.

Die TTE kann also als kostengünstiges und zeitsparendes Instrument zur validen Beurteilung von Struktur und Funktion des linken Rattenventrikels eingesetzt werden.

1.3 Klinische Zelltransplantations-Studien

Welche Bedeutung die mögliche Regeneration ischämisch geschädigten Myokards durch Zelltransplantation haben könnte, lässt sich u.a. daran ermessen, dass zahlreiche klinische Studien auf der Basis kontroverser tierexperimenteller Ergebnisse durchgeführt wurden und werden.

Die erste Arbeit stammt von *Strauer et al. (2002)* und untersucht die intrakoronare BMC-Applikation bei 10 AMI-Patienten (nicht-randomisierte

Kontrollgruppe: n = 10). Morphologisch und funktionell fassbare Regenerationseffekte der Zelltherapie auf das Myokard wurden hierbei beschrieben. *Perin et al. (2003)* und *Tse et al. (2003)* transplantierten Patienten mit schweren ischämischen Myokardschäden autologe BMCs nach elektromechanischem LV-Mapping transendokardial. Aus beiden Versuchsreihen ergaben sich Erfolge in Bezug auf Myokardperfusion und LV-Funktion. In der ebenfalls nicht randomisierten und darüber hinaus nicht kontrollierten TOPCARE-AMI-Studie kamen *Schachinger et al. (2004)* zu einem vergleichbaren Ergebnis für BMCs (n = 29) und zirkulierende Progenitorzellen (n = 30) und zeigten darüber hinaus eine Normalisierung der koronaren Flussreserve auf (vgl. *Schachinger et al., 2006a*). Drei Arbeitsgruppen publizierten jüngst ihre Erkenntnisse aus randomisierten, kontrollierten Patientenstudien: *Wollert et al. (2004)* beschrieben 6 Monate nach Intervention durch BMC-Applikation (n = 30; Kontrollgruppe idem) nach erfolgreicher PTCA bedingte LV-Funktionsverbesserungen, die in einer Untersuchung nach 18 Monaten jedoch nicht mehr signifikant waren. *Chen et al. (2004)* testeten die Effekte von MSC-Transplantationen an insgesamt 69 AMI-Patienten (inkl. Kontrollgruppe) und zeigten signifikant positive Einwirkungen auf die LV-Pumpfunktion. *Schachinger et al. (2006b)* beobachteten an einem großen AMI-Patientenkollektiv (n = 204) in der BMC-transplantierten Gruppe signifikante Vorteile bezüglich LV-Funktion (Verbesserung der Ejektionsfraktion nach 4 Monaten: $5,5 \pm 7,3\%$ vs. $3,0 \pm 6,5\%$; $p = 0,01$) und klinischen Endpunkten gegenüber der Kontrollgruppe. Eine vierte große, doppelt geblindete, randomisierte, placebokontrollierte Studie zum Regenerationspotenzial nach PTCA intrakoronar applizierter BMCs wurde von *Janssens et al. (2006)* veröffentlicht. Zwar konnte bei den 33 zelltransplantierten Patienten (Placebogabe: n = 34) eine deutliche Reduktion der Infarktgröße festgestellt werden, die globale LV-Funktion allerdings war nicht signifikant verbessert.

Menasche et al. (2003) applizierten 10 Patienten mit schwerer ischämischer Kardiomyopathie im Rahmen koronarer Bypassoperationen autologe SMBs. Obwohl diese Methode als sicher beschrieben wurde, entwickelten 4 Transplantatempfänger anhaltende ventrikuläre Tachykardien, so dass eine Indikation für die Implantation interner Kardio-Defibrillatoren gestellt werden

musste. Sicherlich besteht innerhalb des beschriebenen Patientenkollektivs eine Neigung zu Herzrhythmusstörungen und auch die Bypassoperation an sich birgt dieses Risiko. Andere Studien bestätigten allerdings das arrhythmogene Potenzial der SMBs. *Abraham et al. (2005)* z.B. beschrieben, dass SMBs in Co-Kultur mit Ratten-Kardiomyozyten Reentry-Tachykardien auslösten.

1.4 Regenerative Transplantat-Einflüsse auf die Herzmuskulatur

In einigen der erwähnten tierexperimentellen und klinischen Studien konnte nach Zelltransplantation eine Verbesserung der kardialen Pumpfunktion beobachtet werden. Wurden Zellen in infarzierte Herzen appliziert, fand sich in manchen Fällen eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. Als Ursache der beschriebenen regenerativen Veränderungen kommen verschiedene Mechanismen in Frage: Transdifferenzierung der Graftzellen in Kardiomyozyten, Fusion des Transplantats mit Kardiomyozyten und parakrine Effekte der transplantierten Zellen auf Kardiomyozyten.

1.4.1 Transdifferenzierung applizierter Zellen

Ein häufig untersuchter Mechanismus, mit dem die zelltherapeutische Regeneration ischämisch geschädigter Herzmuskulatur erklärt werden könnte, besteht in der Transdifferenzierung applizierter Zellen in Kardiomyozyten und Integration derselben in den myokardialen Gewebeverband. Den positiven Transdifferenzierungs-Berichten über die verschiedenen Transplantatzellen stehen jeweils Publikationen gegenüber, die eine Transdifferenzierung ausschließen.

Orlic et al. (2001) applizierten EGFP-exprimierende BMCs männlicher Mäuse intramyokardial in die Infarkttrandzone weiblicher Mäuseherzen. Neun Tage nach Transplantation wurden im AMI-Areal EGFP- und Y-Chromosom-positive

Myozyten, Endothel- und glatte Muskelzellen beobachtet. Eine Transdifferenzierung der BMCs in die genannten Zelltypen wurde als Erklärung postuliert. *Tomita et al. (1999)* berichteten über *in vitro*-Transdifferenzierung von BMCs in Kardiomyozyten unter Einfluss des DNA-Methylierungs-Inhibitors 5-Azacytidin. Eine autologe Transplantation dieser vorbehandelten BMCs in Rattenherzen resultierte in signifikant verbesserter Herzfunktion und vermehrter Angiogenese, welche auch nach Transplantation nicht mit Azacytidin vorbehandelter Zellen nachgewiesen werden konnte. *Murry et al. (2004)* und *Balsam et al. (2004)* untersuchten in fallstarken Studien am ischämisch geschädigten Mäuseherzen das Transdifferenzierungspotenzial derselben BMC-Subpopulation (Lin⁻ c-kit⁺), die in der vielzitierten Arbeit von *Orlic et al. (2001)* verwendet worden war. In beiden Experimentalreihen konnten keine Nachweise für Transdifferenzierung von BMCs in Kardiomyozyten erbracht werden.

In einer Arbeit von *Badorff et al. (2003)* wird nach Co-Kultivierung mit neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (neoKMs) die *in vitro*-Transdifferenzierung humaner EPCs in Kardiomyozyten berichtet. Diese bildeten Gap Junctions zu angrenzenden Herzmuskelzellen aus und zeigten für funktionell aktive Kardiomyozyten typische Oszillationen der Calciumkonzentration. Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer Studie von *Gruh et al. (2006)*, in der während einer Co-Kultivierung von humanen EPCs mit neoKMs keine Anzeichen für Transdifferenzierung gefunden wurden.

Über den Mechanismus der Transdifferenzierung erklärten auch *Condorelli et al. (2001)* ihre Beobachtungen an Co-Kulturen EGFP-exprimierender HUVECs mit neoKMs: Nach einigen Tagen fanden sich EGFP-positive Zellen, die sich in nicht speziesspezifischen Antikörperfärbungen positiv für sarkomerisches Myosin und vonWillebrand-Faktor präsentierten. Eine Studie von *Ishisaki et al. (2003)* führte zu dem Ergebnis, dass sich HUVECs unter Entzug von FGF-1 (Fibroblast Growth Factor-1) in glatte Muskelzellen transdifferenzieren und unter FGF-1-Reapplikation gegensinnig wieder in HUVECs transdifferenzieren können. Im Gegensatz zu *Condorellis* These vermuteten *Welikson et al. (2006)* vereinzelte Zellfusionen von HUVECs mit neoKMs.

1.4.2 Fusion transplanteder Zellen mit Kardiomyozyten

Eine weitere Erklärungsoption für myokardial regenerative Einflüsse durch transplantierte Zellen ist ihre Fusion mit Kardiomyozyten.

Matsuura et al. (2004) beobachteten in Co-Kultur-Experimenten die Fusion von neoKMs mit HUVECs und EPCs sowie in Transplantationsversuchen die Fusion von Kardiomyozyten mit HUVECs und skelettalen Myoblasten (SMBs). In einer Studie von *Oh et al. (2003)* wurden Mäusen in der Reperfusionphase nach AMI kardiale Progenitorzellen intravenös appliziert. Nach 14 Tagen konnte gezeigt werden, dass transplantierte Zellen in die Infarkttrandzone eingewandert waren und dort mit Kardiomyozyten fusionierten.

1.4.3 Parakrine Effekte und Angiogenese

Eine dritte Möglichkeit, die die myokardiale Regeneration nach Zelltransplantation beeinflusst haben könnte, ist die Einwirkung parakriner Effekte der Graftzellen auf die Kardiomyozyten. In der Literatur finden sich vor allem zwei parakrin verursachte Effekte: Angiogeneseinduktion und Apoptosehemmung. In den folgenden Abschnitten werden diese beiden Optionen für verschiedene Zellen vorgestellt.

Viele Befunde liegen für die Transplantation von BMCs vor. *Fuchs et al. (2001)* stellten nach transendokardialer BMC-Transplantation in infarzierte Schweineherzen eine Verbesserung der linksventrikulären Kontraktilität fest. Als mögliche Erklärung zeigte sich vermehrte Kollateralperfusion, die durch die *in vitro* nachgewiesene Sekretion der Angiogenesevermittler VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und MCP-1 (Macrophage Chemoattractant Protein-1) durch BMCs getriggert worden sein könnte. Die beobachtete Verbesserung der LV-Funktion bei Ratten, denen in ischämisches Myokard BMCs transplantiert wurden, begründeten *Nishida et al. (2003)* über gesteigerte Neovaskularisation, welche durch die signifikant erhöhten myokardialen Level an Angiopoetin-1 und VEGF ausgelöst worden war. *Ziegelhoeffer et al. (2004)* untersuchten BMCs am murinen Hinterlauf-Ischämie-Modell auf

neovaskularisationsfördernde Effekte. Die applizierten Zellen gruppierten sich um neu gebildete Gefäße, ohne sich jedoch selbst in die Gefäßwände zu integrieren. Allerdings exprimierten sie die Wachstumsfaktoren FGF-2 und VEGF sowie das Chemokin MCP-1. Da diese als Angiogenese-Promotoren bekannt sind, liegt nahe, dass sich die BMCs auf parakrinem Wege an der Neovaskularisation der ischämischen Muskulatur beteiligt hatten. *Hiasa et al. (2004)* beobachteten, dass transplantierte, VEGF-sezernierende, mononukleäre BMCs eine Apoptosehemmung in postinfarziösen Kardiomyozyten induzierten.

Auch für MSCs gibt es Berichte über parakrin vermittelte anti-apoptotische Wirkung. Nach Untersuchungen von *Mangi et al. (2003)* führt die Transplantation von mit dem Akt1-Gen transduzierten MSCs in ischämische Rattenherzen durch parakrine Effekte des Anti-Apoptose-Proteins auf die benachbarten Kardiomyozyten zu einer funktionellen wie strukturellen Myokardregeneration und bremst das postischämische Remodelling. *Silva et al. (2003)* erstellten ein Gen-expressionsprofil für MSCs. Für das darin enthaltene Thymosin $\beta 4$ konnten *Bock-Marquette et al. (2004)* am AMI-Modell der Maus positive Effekte auf die Migration und den Apoptoseschutz von Kardiomyozyten nachweisen. *Malinda et al. (1997)* zeigten, dass Thymosin $\beta 4$ chemoattrahierend wirkt und durch Stimulation der Endothelzell-Migration Angiogenese fördert.

Für die Applikation von EPCs liegt eine Studie vor, die hämodynamisch relevante Neovaskularisation beschreibt. *Kawamoto et al. (2003)* hatten die Zellen im Anschluss an elektromechanisches Mapping transendokardial in ischämische Schweineherzen transplantiert und nach 4 Wochen eine signifikante Zunahme an myokardialer Kapillardichte, Koronar-Kollateralentwicklung und LV-Funktion beobachtet.

Schließlich werden auch HUVECs parakrine Einflüsse auf die myokardiale Regeneration zugeschrieben. Im Rattenmodell transplantierten *Merx et al. (2005)* HUVECs transepikardial in die Infarkttrandzone und konnten zeigen, dass die HUVECs durch Makrophagen phagozytiert worden waren. Als Ursache der im Rahmen des offensichtlich angestoßenen Inflammationsprozesses verbesserten linksventrikulären Funktion beschrieben sie Neoangiogenese.

1.5 Apoptose und Gen-Transfer als mögliche Distraktoren

Bei einer Befundinterpretation sollten stets auch die durch die eingesetzte Methode bedingten Distraktoren berücksichtigt werden. Besondere Vorsicht ist bei der Deutung von Marker-Detektionen geboten.

Um die denkbaren Mechanismen der Myokardregeneration nach Zelltransplantation – insbesondere die Transdifferenzierung in Kardiomyozyten – zu untersuchen, wird von vielen Arbeitsgruppen der Zellmarker EGFP eingesetzt.

1.5.1 Zelldetektion mittels EGFP

Um transplantierte oder *in vitro* (co-)kultivierte Zellen auch nach längeren Zeiträumen lokalisieren zu können, wird häufig die zelluläre Expression von EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) als Markerprotein angewendet. Seit seiner Einführung als Monitor-Werkzeug für Genexpression durch *Chalfie et al. (1994)* wird das Protein, dessen – erstmals durch *Prasher et al. (1992)* kloniertes und sequenziertes – Gen durch virale Transduktion in die DNA der zu markierenden Zelle integriert wird, zur Zelldetektion eingesetzt. Insbesondere die dauerhafte und stabile Expression von EGFP in der transduzierten Zelle galt bislang als Kriterium für die sichere Identifikation einer markierten Zelle über lange Beobachtungszeiträume hinweg.

1.5.2 Apoptotische Körperchen und Gen-Transfer

Die sichere Verfolgung bzw. Lokalisation einer EGFP-markierten Zelle ist nur unter der Voraussetzung möglich, dass die in das Zellgenom integrierte EGFP-DNA die Zelle nicht verlässt und nach deren Tod nicht mehr transkribiert wird. Denkbar ist jedoch, dass in einer EGFP-transduzierten Zelle Apoptose eingeleitet wird und DNA-Fragmente – die auch das EGFP-Gen einschließen können – die sterbende Zelle verlassen. Wenn diese Nukleinsäuren von

anderen Zellen wie z.B. Kardiomyozyten aufgenommen und in deren Genom eingebaut werden könnten, wäre der Kardiomyozyt ab diesem Zeitpunkt in der Lage, selbst EGFP zu exprimieren. Es hätte ein Gen-Transfer stattgefunden, der – unkritisch betrachtet – als Transdifferenzierung einer transplantierten Zelle in einen Kardiomyozyten fehlgedeutet werden könnte.

Um den geschilderten Gen-Transfer zu ermöglichen, müsste eine apoptotische Zelle ihre DNA in einer Form abgeben, die umliegenden Zellen eine Aufnahme ermöglicht. Hierzu gibt es bereits einige Berichte:

Henson et al. (2001) beschrieben, dass in Apoptose begriffene Zellen auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin präsentieren, welches durch entsprechende Rezeptoren auf der Phagozytenmembran erkannt wird. Nach ihrer Bindung werden die apoptotischen Zellen von zumeist Makrophagen vermutlich durch Makropinozytose aufgenommen und verdaut.

Hristov et al. (2004) initiierten durch Einsatz von serum- und wachstumsfaktorenfreiem Medium Apoptose in HUVEC-Kulturen. Im Rahmen ihres programmierten Unterganges bildeten die Zellen vesikuläre Fragmente, sogenannte Apoptotische Körperchen (ABs). Wurden diese im Überstand der apoptotischen Zellkultur enthaltenen ABs mit EPCs in Kontakt gebracht, so wurden EPCs zu Proliferation und Differenzierung angeregt.

Mehrere Arbeitsgruppen konnten einen horizontalen Gen-Transfer via ABs induzieren: *Holmgren et al. (1999)* co-kultivierten ABs von EBV-tragenden Zelllinien mit Endothelzellen, Fibroblasten oder Monozyten und entdeckten EBV-spezifische Marker in den verschiedenen Empfängerzellen. AB-vermittelten Onkogen-Transfer von tumorösen in angrenzende Zellen beschrieben *Bergsmedh et al. (2001)*. Sie lieferten damit eine mögliche Erklärung für die Akkumulation genetischer Defekte in einer Zelle, welche malignes Tumorwachstum initiieren können. *Dini et al. (1995)* beobachteten die Phagozytose von ABs durch sinusoidale Leber-Endothelzellen.

Die genannten Publikationen belegen, dass apoptotische Zellen ABs bilden, welche das genetische Material der Ursprungszelle in andere Zellen transportieren können. Der Transfer von EGFP-DNA aus einer in Apoptose

begriffenen transduzierten Zelle via ABs in eine benachbarte Zelle ist also denkbar.

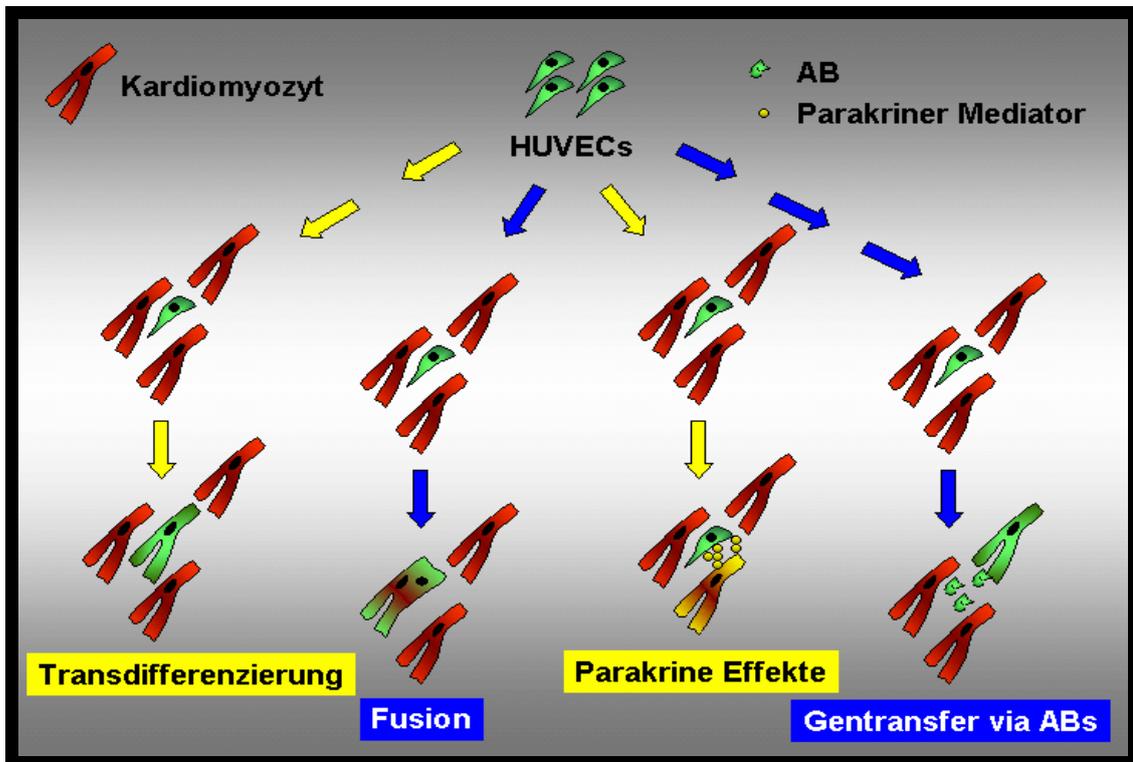


Abb. 1.2: Mögliches Schicksal myokardial transplantierte HUVECs.

1.6 Ziel der vorliegenden Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, das Differenzierungspotenzial von HUVECs unter *in vivo*- und *in vitro*-Bedingungen zu untersuchen. Folgende Fragestellungen sollten im Einzelnen bearbeitet werden:

- I. Ist die intrakoronare HUVEC-Transplantation in Ratten möglich ?
- II. Welchem Schicksal unterliegen intrakoronar applizierte HUVECs ?
Können HUVECs in Kardiomyozyten transdifferenzieren ?

Um die Frage nach dem Schicksal der intrakoronar transplantierten Zellen und somit nach möglichen myokardregenerierenden Einflüssen zu beantworten, sollten im Besonderen folgende in der Literatur diskutierte Mechanismen untersucht werden: Veröffentlichungen der letzten Jahre hatten HUVECs das Potenzial zur *in vitro*-Transdifferenzierung in Kardiomyozyten (*Condorelli et al., 2001*), zur *in vitro*-Fusion mit neoKMs (*Matsuura et al., 2004*) und zur Unterstützung von Neoangiogenese am ischämisch geschädigten Rattenherzen (*Merx et al., 2005*) zugeschrieben. Eigene Arbeiten ließen es ebenfalls möglich erscheinen, dass sich HUVECs in Kardiomyozyten transdifferenzieren können. Es war das Ziel der vorliegenden Arbeit, in experimentell klar definierten Modellen zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren.

Darüber hinaus wurde geprüft, ob horizontaler DNA-Transfer des EGFP-Zellmarker-Gens als Distraktor bei der Interpretation histologischer (Transdifferenzierungs-)Beobachtungen in Frage kommt.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien

Acetylcholin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aqua Polymount®	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit	Biovision, Mountain View, CA, USA
CellTracker™ Orange	Molecular Probes / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ciclosporin A (Sandimmun® Optoral)	Novartis, Nürnberg, Deutschland
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
3,3-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dneasy® Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
EGFP-Forward-Primer (10 mM; 5'-acgtaaaccggccacaagttc-3')	
EGFP-Reverse-Primer (10 mM; 5'-cacatgaagcagcagcactt-3')	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Epinephrin	Hoechst GmbH, Frankfurt, Deutschland
Esmolol (Brevibloc®)	Gensia, Irvine, CA, USA
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Linde, Pullach, Deutschland
Fuchsin-Substrat-Chromagen-System	DAKO, Hamburg, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
¹¹¹ Indium-Oxin	Tyco Healthcare, Neustadt / Donau, Deutschland
Isofluran	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Kollagenase-Pulver	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Lidocain	Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Na ⁺ -Acetat	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Na ⁺ -Azid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Bikarbonat	B.Braun Medical AG, Sempach-Station, Schweiz
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Normales Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd-Pulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
S-EDTA-Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex	

	DAKO, Hamburg, Deutschland
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex	
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Taq PCR Core Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Vecta-Shield [®]	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

2.1.2.1.1 Monoklonal

Maus anti- α -Actinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Maus anti-hM	Chemicon, Temecula, CA, USA
Maus anti-MyHC	Chemicon, Temecula, CA, USA
Maus anti-CD31	DAKO, Hamburg, Deutschland
Maus anti-Smooth-Muscle-Actin	DAKO, Hamburg, Deutschland

2.1.2.1.2 Polyklonal

Huhn anti-Ratten-MCT-1	Chemicon, Temecula, CA, USA
Kaninchen anti-aktivierte-Caspase-3	Pharmingen, San Diego, CA, USA
Kaninchen anti- α -Actinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaninchen anti-Caveolin-1	Transduction, Lexington, KY, USA
Kaninchen anti-hM	Chemicon, Temecula, CA, USA
Kaninchen anti-phosphorylierte-Akt1 / PKB α	Upstate, Lake Placid, NY, USA

2.1.2.2 Sekundärantikörper

biotinylierter Ziege anti-Huhn	Promega, Madison, WI, USA
biotinylierter Ziege anti-Kaninchen	DAKO, Hamburg, Deutschland
biotinylierter Ziege anti-Maus	DAKO, Hamburg, Deutschland
biotinylierter Schaf anti-Ratte	Amersham, Buckinghamshire, England
Ziege anti-Huhn-Cy3	Promega, Madison, WI, USA
Ziege anti-Kaninchen-Cy2	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ziege anti-Maus-Cy5	DAKO, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus-FITC	Dianova, Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus-PhycoErythrin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.1.3 Medien

Dulbecco's MEM Eagle	Gibco / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Gibco / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Medium 199 (M. 199)	Gibco / Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nabelmedium	8,18 g NaCl 0,3 g KCl 2,69 g 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure (HEPES) 1,98 g D-Glukose ad 1 l Aqua dest (pH 7,4)

Alle Zellkultur-Medien enthielten 1% (v / v) Penicillin (100 U / ml) / Streptomycin (100 µg / ml) (Gibco / Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) sowie 0,1% (v / v) Amphotericin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland).

2.1.4 Gebrauchslösungen

Hank's Balanced Salt Solution	8,0 g NaCl
	0,4 g KCl
	0,048 g Na ₂ HPO ₄
	0,06 g KH ₂ PO ₄
	0,35 g NaHCO ₃
	1,0 g D-Glukose
	ad 1 l Aqua dest (pH 7,4)
Phosphate Buffered Saline	8,0 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	ad 1 l Aqua dest (pH 7,4)
S-Ethylendiamintetraacetat	0,2 g EDTA
	8,0 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	ad 1 l Aqua dest (pH 7,4)
Tris-Acetat-EDTA	4,85 g Tris
	3,88 g EDTA
	1,2 g Eisessig
	ad 1 l Aqua dest (pH 8,3)
Tris Buffered Saline	3,0 g Tris
	8,0 g NaCl
	0,2 g KCl
	ad 1 l Aqua dest (pH 7,4)

2.1.5 Geräte und Gebrauchswaren

6-Loch-Zellkultur-Platten	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
arterieller 2F-Ballon-Katheter	Edwards Life Science, Irvine, CA, USA
Chamber Slides™ (Lab-Tek™)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Chirurgische Fäden	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Chirurgische Instrumente	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Digitalkamera (PowerShot A95)	Canon, Krefeld, Deutschland

Material und Methoden

Dosimeter	MED Nuklear-Medizintechnik, Dresden, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop BX 50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Injektionskanülen	B.Braun Medical AG, Sempach-Station, Schweiz
Kleintier-OP-Instrumente	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Kleintier-Ventilator	Harvard Apparatus, Kent, England
Konfokales Laserscanningmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kryo-Mikrotom	Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland
Mastercycler [®] gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Metall-Oliven mit Spritzenaufsatz	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Nylon-Netz (100 µm)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
PRISM [™] 2000 XP (SPECT-Kamera)	Philips / Picker, Hamburg, Deutschland
Rollerpumpe	Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA
Sonos 5500 [®] Ultraschallgerät	Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA
Spritzen	B.Braun Medical AG, Sempach-Station, Schweiz
sterile Glasplättchen	DAKO, Hamburg, Deutschland
Venenverweilkatheter	B.Braun Medical AG, Sempach-Station, Schweiz
venöser 3F-Ballon-Katheter	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland
Versuchstier-Rasierer	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Zellkultur-Flaschen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

Zellkultur-Petrischalen	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugen-Röhrchen (Falcon™)	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

2.1.6 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Zwecks Sterilisation wurden Materialien für 30 min bei 121 °C autoklaviert.

2.1.7 Organismen

EGFP-exprimierendes Lentivirus	freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Helmut Hanenberg aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland, bereitgestellt
Wistar-Ratten	Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

2.2 METHODEN

2.2.1 *in vitro* durchgeführte Methoden

2.2.1.1 HUVEC-Isolierung und –Kultivierung

Humane Nabelschnüre wurden bis zur Isolierung der Zellen in Nabelmedium gelagert (0 – 3 Tage; 5 °C). Die Isolierung Humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) wurde in Anlehnung an *Jaffe et al. (1973)* durchgeführt. Nabelschnurstücke (15 – 20 cm lang) wurden zunächst nach Einführung einer Metall-Olive mit Spritzen-Aufsatz in das eine Ende der *V.umbilicalis* mit 2 × 20 ml Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gespült.

Anschließend wurde das andere Ende der Vene mit einer Klemme nach *Kocher* verschlossen und zum Ablösen der Endothelzellen 10 – 15 ml 0,1%ige (w / v) Kollagenase-Lösung (in HBSS) über das noch offene Ende injiziert. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Zellen enthaltende Kollagenase-Lösung in ein 50ml-Zentrifugen-Röhrchen getropft, in das 10 ml Medium 199 (M.199) + 20% (v / v) Fetales Kälberserum (FCS) vorgelegt worden waren. Nun wurden die restlichen Zellen durch Spülen der Vene mit 20 ml M.199 ausgewaschen. Beide Zellsuspensionen wurden vereinigt und bei 120 × g pelletiert (10 min). Der Überstand wurde verworfen und das zellhaltige Pellet in 5 ml M.199 + 20% (v / v) FCS resuspendiert. Die Zellsuspensionen zweier Nabelschnurstücke wurden in eine Gelatine-beschichtete (0,1% v / v; 10 min) Zellkultur-Flasche überführt und für 3 – 5 h im Brutschrank (37 °C, 5% v / v CO₂-Begasung) inkubiert.

Die adhärenenten HUVECs wurden mit 10 ml Endothelial Cell Growth Medium (ECM) überschichtet. Erreichten die Zellen 90% Konfluenz, wurden sie mit Hilfe von 2 × 5 ml S-EDTA (Ethyldiamintetraacetat) und 5 ml S-EDTA-Trypsin von dem Zellkultur-Gefäß gelöst und zur weiteren Kultivierung im Verhältnis 1 : 3 auf neue Gelatine-beschichtete Zellkultur-Petrischalen überführt.

Für alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurden HUVECs der ersten bis dritten Passage verwendet.

2.2.1.2 Isolierung neonataler Kardiomyozyten

Die Isolierung neonataler Kardiomyozyten (neoKMs) wurde in Anlehnung an *Simpson & Savion (1982)* durchgeführt. Das Ventrikelmyokard neugeborener Wistar-Ratten wurde in PBS (5 °C) homogenisiert und anschließend 3 – 5 × 15 min mit S-EDTA-Trypsin bei 37 °C inkubiert. Nach jeder Digestions-Prozedur wurde der Überstand durch ein steriles Nylon-Netz (100 µm) gefiltert. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden in Dulbecco's Minimum Essential Medium Eagle (MEM) + 20% (v / v) FCS auf Zellkultur-Petrischalen ausgesät. Nach 2 h bei 37 °C wurden alle nicht adhärenenten neoKMs von den Platten

gespült und in MEM + 10% (v / v) FCS + 5% (v / v) L-Glutamin (10 mM) aufgenommen.

Für alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurden neoKMs der ersten bis dritten Passage verwendet.

2.2.1.3 Generierung Apoptotischer Körperchen

Die Generierung Apoptotischer Körperchen (AB) wurde in Anlehnung an *Hristov et al. (2004)* durchgeführt. HUVEC-Kulturen (90% konfluent) wurden für 24 h mit ECM (ohne Serum und Wachstumsfaktoren) bei 37 °C und 5% (v / v) CO₂-Begasung inkubiert. Zur Färbung der Zellkerne wurden gegebenenfalls während der Inkubation 0,5 µg / ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) + 0,5 µg / ml Ethidiumbromid (EtBr) zugesetzt.

Anschließend wurde der AB-haltige Zellkultur-Überstand 10 min bei 800 × g zentrifugiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation des Überstands bei 16 000 × g für 20 min. Das resultierende Pellet wurde schließlich im entsprechenden Medium resuspendiert und – im Falle der DAPI- und EtBr-Färbung – mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop durchmustert.

2.2.1.4 Zellmarkierung mit CellTracker™ Orange

HUVEC-Kulturen (90% konfluent) wurden mit M.199 + 20% (v / v) FCS + 1% (v / v) L-Glutamin (2 mM) + 10 µM CellTracker™ Orange für 45 min bei 37 °C und 5% (v / v) CO₂-Begasung inkubiert. Anschließend folgte eine weitere 30minütige Inkubation im gleichen Medium ohne CellTracker™ Orange, bevor die Zellen trypsinisiert (siehe Abschnitt 2.2.1.1) wurden.

2.2.1.5 Zellmarkierung mit EGFP

HUVEC-Kulturen der 2. Passage (90% konfluent) wurden mit Lentiviren (Derivat des HIV1-Vektors pGJ3-CSCGW) inkubiert, welche Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) unter Kontrolle des U3-Promoters des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) exprimierten. Die viralen Partikel wurden mit dem Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G (VSV-G) pseudotypisiert. Vor weiterer Verwendung wurden die Zellen ausgiebig ($10 \times$) gewaschen und passagiert.

2.2.1.6 Zellmarkierung mit 111 Indium-Oxin

HUVEC-Kulturen der 2. Passage (90% konfluent) wurden 10 min mit 7 MBq 111 Indium-Oxin (37 MBq / ml) in ECM inkubiert. Ungebundene Radioaktivität wurde durch zwei Waschgänge mit ECM entfernt. Die Markierungs-Effektivität wurde mit einem Dosimeter gemessen, die Zellvitalität 90 min nach Markierung mittels Trypanblau-Färbung.

2.2.1.7 Co-Kultivierung von neoKMs mit HUVECs

Die Co-Kultivierung erfolgte in Anlehnung an *Condorelli et al. (2001)*. In die Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkultur-Platte wurden je 60 000 neoKMs auf ein zuvor eingelegtes steriles Glasplättchen ($d = 22$ mm) ausgesät und für 24 h mit 3 ml MEM + 10% (v / v) FCS + 5% (v / v) L-Glutamin (10 mM) im Brutschrank inkubiert. Nach Austausch des Mediums wurden 60 000 EGFP-positive HUVECs hinzugefügt.

Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt und an Tag 6 erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4% (w / v) Paraformaldehyd (PFA) in Phosphate Buffered Saline (PBS) (20 min) auf den Glasplättchen sowie im Anschluss daran die Färbung mittels Immunfluoreszenz (Abschnitt 2.2.1.9).

2.2.1.8 Co-Inkubation von neoKMs mit ABs

In die Vertiefungen einer 6-Loch-Zellkultur-Platte wurden je 25 000 neoKMs auf ein zuvor eingelegtes steriles Glasplättchen (d = 22 mm) ausgesät und für 24 h mit MEM + 10% (v / v) FCS + 5% (v / v) L-Glutamin (10 mM) im Brutschrank inkubiert. Nach Austausch des Mediums wurden je Loch die aus zwei konfluent auf Zellkultur-Petrischalen (100 × 20 mm) gewachsenen EGFP-positiven HUVEC-Kulturen gewonnenen ABs hinzugegeben.

Mediumwechsel und Fixierung an Tag 4 erfolgten wie in Abschnitt 2.2.1.7 beschrieben.

2.2.1.9 Immunfluoreszenz-Färbungen zu den *in vitro*-Experimenten

Die fixierten Kulturen wurden für 10 min mit 2,5% (v / v) Triton[®] X-100 + 0,3% (w / v) NH₄Cl in 0,05 M Tris Buffered Saline (TBS) inkubiert und danach 3 × 5 min in TBS gewaschen. Es folgte die Blockierung nicht-spezifischer Bindungsstellen mit 5% (v / v) Bovinem Serumalbumin (BSA) in TBS für 1 h bei Raumtemperatur (RT).

Die Zellen wurden 5 min mit 0,8% (v / v) BSA (in TBS) gewaschen. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte in 0,8% (v / v) BSA (in TBS) für 1 h bei RT. Als Primärantikörper wurden verwendet: Huhn anti-Ratten-Monocarboxylat-Transporter-1- (MCT-1) (1:200), Maus anti-Myosin Heavy Chain- (MyHC) (1:400) und Maus anti-humane Mitochondrien-Antikörper (hM) (1:400).

Die Zellen wurden 3 × 5 min mit TBS gewaschen und anschließend 45 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (in 0,8% v / v BSA in TBS) inkubiert (bei RT): Ziege anti-Huhn-Cy3- (1:1000) und Ziege anti-Maus-Cy5-Antikörper (1:500).

Nach drei abschließenden 5minütigen Wasch-Schritten mit TBS bei Dunkelheit wurden die gefärbten Zellen mit Aqua Polymount[®] eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.1.10 Immunfluoreszenz-Färbungen zu den *in vivo*-Experimenten

Von gefrorenen Herzen wurden mit einem Kryo-Mikrotom 7 µm-Schnitte angefertigt, auf Objektträger übertragen und an Luft getrocknet. Zum Blockieren wurde 5% (v / v) BSA (in 0,05 M TBS; 1 h) verwendet.

Als Primärantikörper fanden Maus anti-CD31- (1:800), Kaninchen anti-Caveolin-1- (1:500), Kaninchen anti-hM- (1:1000), Huhn anti-Ratten-MCT-1- (1:1000) und Maus anti- α -Actinin-Antikörper (1:400) in TBS + 0,8% (v / v) BSA bei 4 °C über Nacht Verwendung.

Als sekundäre Antikörper wurden biotinylierte Ziege anti-Kaninchen-, Ziege anti-Maus-, Ziege anti-Huhn- und Schaf anti-Ratten-Antikörper (je 1:400) in 0,8% (v / v) BSA (in TBS) für 1 h eingesetzt.

Zwecks Sichtbarmachung der Immunglobuline fand ein Extravidin-Alexa 586-Komplex für 1 h Verwendung.

Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop betrachtet.

2.2.1.11 Immunhistochemie-Färbungen zu den *in vivo*-Experimenten

Von gefrorenen Herzen wurden mit einem Kryo-Mikrotom 7 µm-Schnitte angefertigt, welche mit 3% H₂O₂ (v / v) und anschließend mit 0,25% (v / v) Triton[®] X-100 + 0,5 M NH₄Cl (in 0,05 M TBS) 10 min inkubiert wurden.

Nach 1stündiger Blockierung mit 5% (v / v) BSA (in TBS) wurden folgende Primärantikörper (in 0,8% v / v BSA) über Nacht bei 4 °C eingesetzt: Kaninchen

anti-aktivierte-Caspase-3- (1:500) bzw. Kaninchen anti-phosphorylierte-Akt1 / PKB α -Antikörper (1:500).

Nach 3 \times 5 min Waschen mit TBS folgte als Sekundärantikörper biotinylierter Ziege anti-Kaninchen-Antikörper (1:400) für 1 h bei RT.

Zwecks Detektion der biotinylierten Antikörper wurde 1 h mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (1:150) inkubiert, bevor abschließend 15 min mit dessen Substrat 3,3-Diamino-benzidin-tetrahydrochlorid (in 0,1 M PBS) gefärbt wurde.

Im Falle der Doppelfärbung gegen aktivierte-Caspase-3 und humane mitochondriale Proteine wurde der Primärantikörper Maus anti-hM-Antikörper so eingesetzt, wie es in Abschnitt 2.2.1.10 für Kaninchen anti-hM-Antikörper beschrieben worden ist. Als sekundärer Antikörper fungierte biotinylierter Ziege anti-Maus-Antikörper (1:400) für 1 h bei RT. Es folgten eine 1stündige Inkubation mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplex sowie zwecks Visualisierung eine Inkubation mit einem Fuchsin-Substrat-Chromagen-System für 1 min bei RT.

2.2.1.12 Versuche mit Ciclosporin A

Chamber SlidesTM (4,2 cm² pro Kammer) mit 40 000 HUVECs pro Kammer wurden mit 6 μ g / ml Ciclosporin A (CsA) (in ECM) inkubiert. Täglich fanden ein Mediumwechsel sowie eine mikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie statt. Am 7. Tag der Zellkultur wurden die HUVECs 10 min mit 1 ml Zamboni (4% w / v PFA + 15% w / v Pikrinsäure) inkubiert. Nach gründlichem Waschen der Zellen mit PBS wurde 1 h mit 5% (v / v) Normalem Ziegenserum (NGS) + 0,2% (w / v) Saponin + 0,1% (w / v) Na⁺-Azid (in PBS) bei RT blockiert.

Als Primärantikörper wurden Maus anti-CD31- (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule (PECAM)) (1:40), Kaninchen anti- α -Actinin- (1:100) und Maus anti-Smooth-Muscle-Actin-Antikörper (1:50) in PBS + 2% (v / v) NGS + 0,1% (w / v) Saponin bei RT eingesetzt.

Nach 90minütiger Inkubation und dreimaligem Waschen mit PBS + 0,1% (w / v) Saponin wurden folgende Sekundärantikörper (in PBS + 2% v / v NGS + 0,1% w / v Saponin) entsprechend zugegeben (bei RT): Ziege anti-Maus-PhycoErythrin- (1:60), Ziege anti-Kaninchen-Cy2- (1:100) und Ziege anti-Maus-FITC-Antikörper (1:30).

Nach 45minütiger Inkubation, zweimaligem Waschen mit PBS + 0,1% (w / v) Saponin und abschließendem Spülen mit PBS wurden alle Slides mit Vecta-Shield® betropft, mit einem Deckglas versehen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.1.13 Nachweis von EGFP-DNA in HUVECs

Die EGFP-positiven HUVECs einer konfluent bewachsenen Zellkultur-Petrischale (100 × 20 mm) wurden – wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben – trypsiniert und anschließend in 180 µl PBS aufgenommen.

ABs wurden – wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben – von einer zweiten konfluenten Schale EGFP-positiver HUVECs gewonnen und ebenfalls in 180 µl PBS suspendiert.

Zur DNA-Reinigung aus HUVECs sowie deren ABs wurde das Dneasy® Tissue Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Um die DNA der ABs zu konzentrieren, wurde wie folgt vorgegangen: 200 µl DNA-enhaltende Lösung wurden 20 µl 10 M Na⁺-Acetat (pH 4,6) sowie 500 µl Ethanol (100%) zugesetzt. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 16 000 × g wurde das Pellet in 500 µl Ethanol (70% v / v) gewaschen und 10 min bei 16 000 × g zentrifugiert. Das Pellet wurde nach vorsichtiger Trocknung (50 °C) in 15 µl Aqua dest gelöst.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte in Anlehnung an *Mullis & Falbona (1987)* in einem Mastercycler® gradient unter Verwendung eines Taq PCR Core Kit. Der Reaktionsansatz enthielt 2 µl DNA-Lösung (aus EGFP-positiven sowie

–negativen HUVECs und jeweils deren ABs) + 12,5 pmol EGFP-Forward-Primer + 12,5 pmol EGFP-Reverse-Primer + 40 nmol dNTPs + 10 U Taq-Polymerase + 5 µl Zehnfach-Puffer + 34,5 µl Aqua dest. An einen initialen Denaturierungsschritt (2 min bei 94 °C) schlossen sich 35 Zyklen aus Denaturierung der DNA (30 s bei 94 °C), Anlagerung der Primer an die Matrizen-DNA (45 s bei 57 °C) und Extension des zu synthetisierenden Strangs (75 s bei 72 °C) an. Nach abschließender Extensionsphase (2 min bei 72 °C) wurde der Reaktionsansatz auf 4 °C abgekühlt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in Anlehnung an *Maniatis et al. (1975)* in einer Gelelektrophoresekammer (1 h bei 80 V Gleichspannung). Es wurden ein 1,5%iges (w / v) Agarose-Gel (in Tris-Acetat-EDTA (TAE)) unter Zusatz von 0,3 µg / ml Ethidium-Bromid im Gel sowie 0,05% (v / v) Bromphenolblau (in TAE + 0,1% v / v Glycerin) in der Probe verwendet. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht (300 nm Wellenlänge) mit einer Digitalkamera fotografiert.

2.2.2 *in vivo* durchgeführte Methoden

2.2.2.1 Intrakoronare Zellapplikation

Die Tierversuche wurden im Rahmen des von der Bezirksregierung genehmigten Tierversuchs-Antrags und gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Für alle Experimente wurden männliche Wistar-Ratten (350 – 450 g) eingesetzt.

Die für die Zellapplikation notwendige Katheterisierung wurde in Anlehnung an *Ding et al. (2004)* durchgeführt. Wildtyp-Ratten wurden mittels Venenverweilkathetern intubiert und unter permanenter Ventilation (80 maschinelle Beatmungen / min) mit Isofluran (1,5% v / v in 100% Sauerstoff) narkotisiert. Nach lokaler Rasur wurde die rechte *V.jugularis interna* freipräpariert und in Längsrichtung inzidiert. Nun wurde ein 3F-Ballon-Katheter

eingeführt und bis in den rechten Vorhof geschoben. Nach Präparation und Inzision der rechten *A.carotis communis* wurde über diese ein 2F-Ballon-Katheter mit zentralem Lumen in die *Pars ascendens aortae* platziert. Im Anschluss an die vaskulär okkludierende Inflation beider Katheter wurde mit 1 mM Esmolol + 1 μ M Acetylcholin (in 1 ml PBS) ein transients Herzstillstand provoziert. Nun wurden über das Lumen des arteriellen Katheters entweder 250 000 HUVECs (in 500 μ l MEM) oder 500 μ l MEM (Sham-Operation) appliziert. Abbildung 2.1 zeigt die Lage beider Katheter im Rattenherzen zum Zeitpunkt der Zelltransplantation bzw. der Mediuminjektion.

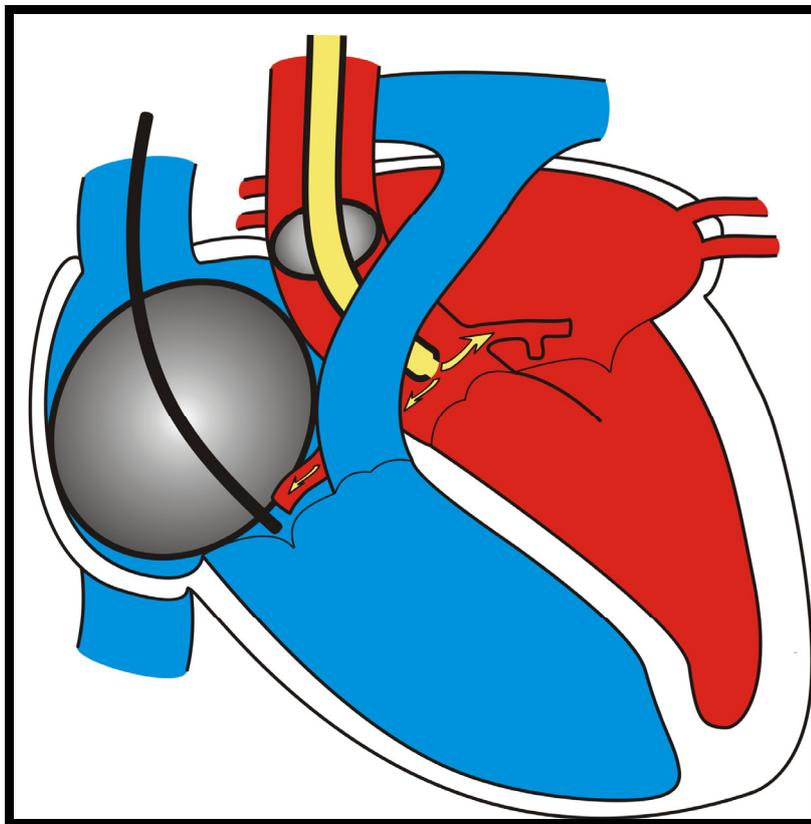


Abb. 2.1: Zum Zeitpunkt der HUVEC- bzw. Medium-Applikation in das Rattenherz lag der venöse Katheter mit luftgefülltem Ballon im *Atrium dextrum*. Der Ballon des arteriellen Katheters wurde in der *Pars ascendens aortae* aufgeblasen, so dass über das zentrale Lumen mit seiner distalen Öffnung direkt auf Höhe der beiden Koronarostien appliziert werden konnte. Dies führte funktionell zu einer intrakoronaren Verabreichung der HUVECs bzw. des Mediums.

Nach 150 s Herzstillstand wurde die Luft aus den Katheter-Ballons abgelassen, 0,02 mg / kg Epinephrin und 0,5 mEq / kg Natrium-Bikarbonat injiziert und die kardiopulmonale Reanimation mit etwa 200 Kompressionen / min durchgeführt.

Auf die hämodynamische Kreislaufstabilisierung folgten Lokalanästhesie mit Lidocain und Wundverschluss. Schließlich wurden die Tiere unter Reduktion der Isofluran-Konzentration extubiert. Mehr als 90% der Ratten überlebten die Operation.

Am Tag vor der Operation erhielten alle Tiere 30 mg / kg CsA intraperitoneal; die tägliche Erhaltungsdosis betrug 15 mg / kg. Kontrollen der Wirkstoffkonzentration im Blut erfolgten 1 bzw. 3 Tage postoperativ.

Nach experimentell vorbestimmten Zeiträumen wurden die Ratten wiederum mit Isofluran narkotisiert und eine mediane Sternotomie durchgeführt. Unter Einsatz eines Kleintier-Thorax-Sperrers wurden der linke Ventrikel kanüliert, die *Aorta ascendens* mit einer Kleintier-Klemme verschlossen und der rechte Vorhof inzidiert. Mit einer Rollerpumpe konnten nun 3 min × 15 ml / min PBS sowie 10 min × 15 ml / min 4% (w / v) PFA (in PBS) über die in der Aorta liegende Kanüle in die Koronarien gespült werden. Anschließend wurde das Herz entnommen und für jeweils 24 h in 4% (w / v) PFA und anschließend in 18% (w / v) Saccharose (in PBS) überführt, so dass Immunfluoreszenz-Färbungen (siehe Abschnitt 2.2.1.10) durchgeführt werden konnten. Für die Immunhistochemie-Färbungen (siehe Abschnitt 2.2.1.11) wurde das Herz direkt nach Thoraxeröffnung entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Unabhängig von der geplanten Färbung wurden die Herzen direkt im Anschluss bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.2 Echokardiographie

Die TTE erfolgte in Anlehnung an *Litwin et al. (1994)*. Ratten wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben narkotisiert und thorakal rasiert. Mit einem 15 MHz Linearschallkopf, angeschlossen an ein Hewlett Packard Sonos 5500[®] Ultraschallgerät, wurden in der parasternalen Längsachse sowie der kurzen Achse direkt unter der Ventilebene Bilder in B-Mode- und M-Mode-Darstellung aufgenommen. Abschließend wurden die Tiere entweder extubiert oder getötet.

2.2.2.3 SPECT nach intrakoronarer HUVEC-Applikation

Zwecks Durchführung der Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) wurden Wildtyp-Ratten in einer SPECT-Kamera mit zwei Detektorköpfen (PRISM™ 2000 XP) platziert. Narkose, Katheterisierung, Herzstillstand, Zellinjektion, Reanimation und Wundverschluss wurden wie in Abschnitt 2.2.2.1 dargelegt durchgeführt. Mit Beginn der Injektion von 250 000 ¹¹¹Indium-Oxin-markierten HUVECs wurde die Verteilung der Radioaktivität im tierischen Organismus planar für 20 × 15 s und anschließend für 8 × 5 min sowie nach 48 h (1 × 5 min) mit Hilfe der SPECT-Kamera mit parallelen Loch-Kollimatoren bestimmt. Zur 3D-Darstellung der ¹¹¹Indium-Verteilung wurde die Ratte 90 min nach Zellgabe für 30 min einer SPECT-Messung mit Multipinhole-Kollimator unterzogen (6 °-Schritte; je 300 s / Schritt).

2.2.3 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Schicksal intrakoronar applizierter EGFP-HUVECs

Auf Basis verschiedener Vorberichte über das *in vitro*-Potenzial von HUVECs zur Transdifferenzierung in Kardiomyozyten bzw. zur Fusion mit letztgenannten sollte das HUVEC-Schicksal nach intrakoronarer Transplantation in durch CsA immunsupprimierte Ratten verfolgt werden.

3.1.1 Kontroll-Untersuchungen zu den *in vivo*-Experimenten

3.1.1.1 Einfluss der EGFP-Expression auf den Phänotyp von HUVECs

Um das Schicksal intrakoronar applizierter HUVECs über mehrere Wochen verfolgen zu können, wurden diese vor der Transplantation in das Rattenherz mittels eines EGFP-codierende DNA tragenden Lentivirus (Derivat des HIV1-Vektors pGJ3-CSCGW) transduziert (vgl. *Leurs et al., 2003*). Da von EGFP berichtet wurde, es könne den Phänotyp der exprimierenden Zelle verändern, erfolgte die lentivirale Transduktion so, dass maximal ein viraler Vektor pro HUVEC aufgenommen wurde. Bezugnehmend auf die statistischen Untersuchungen von *Kustikova et al. (2003)* führte die Integration durchschnittlich eines Vektors je Zelle bei 30% der HUVECs zu einem EGFP-Gen-Transfer und somit zu 30% grünfluoreszierenden Zellen in der zu markierenden Kultur. Der exakte Markierungsgrad der HUVECs wurde jeweils vor der Transplantation der Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt. Weiterhin zeigten FACS-Analysen, dass die EGFP-transduzierten HUVECs auch nach ihrer neunten Passage die endothelialen Marker-Proteine PECAM-1 und VE-Cadherin in unveränderter Stärke exprimierten. Unter der erreichten Transduktionsrate fand offensichtlich keine Phänotypveränderung der HUVECs im Hinblick auf die untersuchten Marker statt.

3.1.1.2 Einfluss von CsA auf die Integrität der HUVECs

Um eine Reaktion des Ratten-Immunsystems auf die zu applizierenden HUVECs zu verhindern, wurde den Tieren das Immunsuppressivum CsA injiziert. Die Initialdosis am Tag vor den Transplantationen betrug 30 mg / kg Körpergewicht und wurde ab dem Tag der Intervention auf eine Erhaltungsdosis von 15 mg / kg Körpergewicht reduziert.

Der CsA-Gehalt des Blutes CsA-vorbehandelter Ratten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Abbildung 3.1 zeigt die CsA-Konzentrationen im Blut dreier Wistar-Ratten am vierten Tag nach Beginn der medikamentösen Therapie. Bei relativ großer Schwankungsbreite betrugen der mittlere CsA-Wert $4 \mu\text{g} / \text{ml} \pm 2 \mu\text{g} / \text{ml}$ und der höchste gemessene Wert $6 \mu\text{g} / \text{ml}$ in „Ratte 01“.

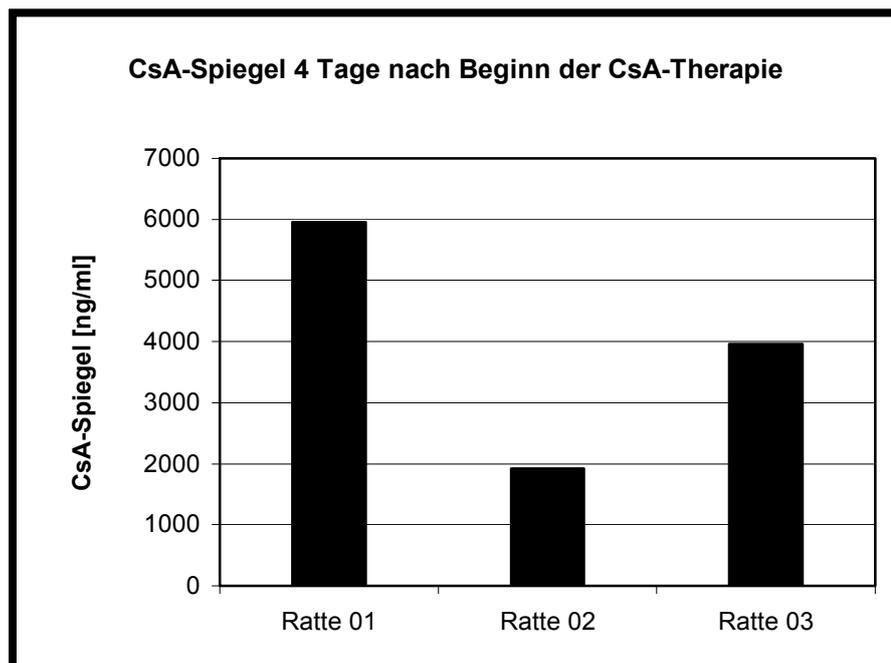


Abb. 3.1: CsA-Spiegel im Blut CsA-therapierter Ratten (n = 3; 4 Tage nach Therapiebeginn; Initialdosis am ersten Tag: 30 mg / kg; Erhaltungsdosis ab dem Folgetag: 15 mg / kg).

Um mögliche Einflüsse des Immunmodulators auf HUVECs auszuschließen, wurden HUVEC-Kulturen (n = 3) für 7 Tage mit der höchsten *in vivo* bestimmten CsA-Konzentration ($6 \mu\text{g}$ CsA pro 1 ml Medium) inkubiert. Die Wirkung von CsA

auf die HUVECs wurde durch tägliche lichtmikroskopische Kontrollen überprüft, welche eine deutliche Längsstreckung der Zellen unter CsA-Einfluss im Vergleich zu Kontrollkulturen ergaben. In Abbildung 3.2 B ist exemplarisch eine repräsentative lichtmikroskopische Darstellung der elongierten HUVECs am 5. Tag nach Therapiebeginn zu sehen. Abbildung 3.2 A zeigt eine HUVEC-Kontrollkultur ohne CsA.

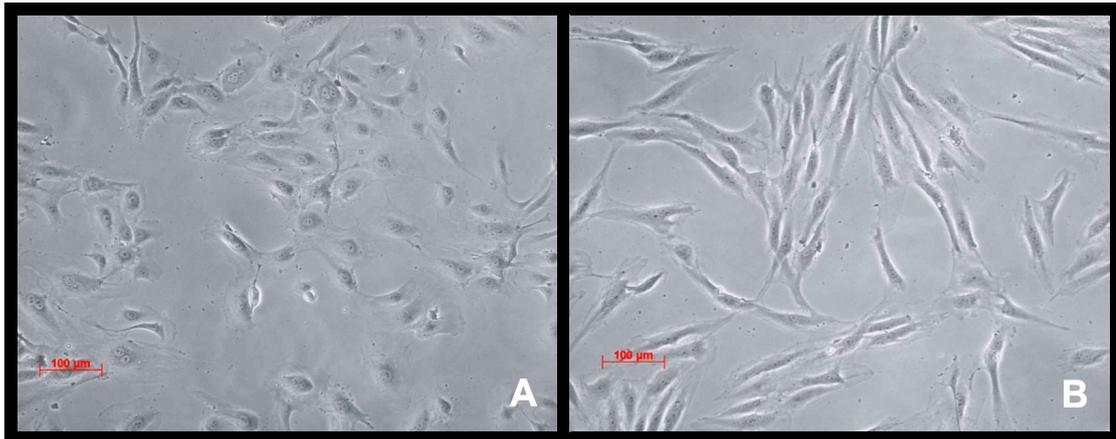


Abb. 3.2: Einfluss von CsA auf die HUVEC-Morphologie: Am 5. Tag der Inkubation von HUVEC-Kulturen mit der maximalen *in vivo* gemessenen CsA-Konzentration von 6 µg / ml präsentierten sich die Zellen morphologisch elongiert (B) gegenüber Kontrollkulturen ohne CsA (A).

Zusätzlich wurden die Zellen nach 7 Tagen mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Dabei stellten sich die CsA-behandelten HUVECs positiv für den endothelialen Zelloberflächen-Marker CD31 sowie negativ für die nicht-endothelialen zytoskelettären Markerproteine Smooth-Muscle-Actin und α -Actinin dar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die höchste *in vivo* gemessene CsA-Konzentration *in vitro* zwar zu einer Elongation der HUVECs führt. Das endothel-spezifische Protein-Expressionsmuster bleibt jedoch erhalten.

3.1.1.3 Intraobserver-Abweichungen bei der Ratten-Echokardiographie

Die hämodynamischen Auswirkungen der Zelltransplantationen auf die Ratten wurden mittels TTE bestimmt. Zwecks Feststellung der Reproduzierbarkeit von Messdaten wurden zwei Wildtyp-Wistar-Ratten an drei bzw. vier verschiedenen

Zeitpunkten im Abstand von 2 Tagen echokardiographiert. An jedem Messpunkt wurden fünf M-Mode-Sequenzen aufgenommen und jeweils der endsystolische sowie der enddiastolische linksventrikuläre Diameter (ESD bzw. EDD) gemessen. Abbildung 3.3 zeigt eine repräsentative M-Mode-Sequenz, in der hämodynamisch relevante Strecken des linken Ventrikels vermessen wurden.

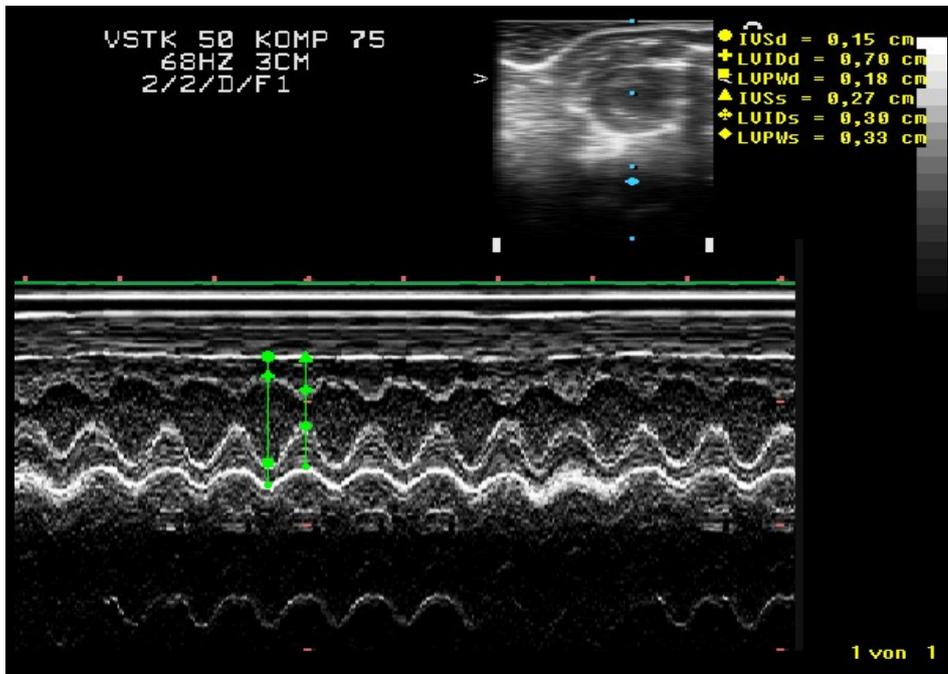


Abb. 3.3: Echokardiographisch ermittelte M-Mode-Sequenz, in der u.a. ESD (im Bild: LVIDs) und EDD (im Bild: LVIDd) vermessen wurden.

Aus ESD und EDD wurden die linksventrikuläre Verkürzungsfraction ($FS = [EDD - ESD] / EDD$) sowie die nach *Teichholz et al. (1976)* korrigierte linksventrikuläre Ejektionsfraction ($EF = [EDV - ESV] / EDV$ mit $EDV = 7 / [2,4 + EDD] \times EDD^3$ bzw. $ESV = 7 / [2,4 + ESD] \times ESD^3$) errechnet. Für jeden Messpunkt wurden mittels der fünf erhaltenen FS- bzw. EF-Werte die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, welche in Abbildung 3.4 für beide hämodynamischen Parameter dargestellt sind.

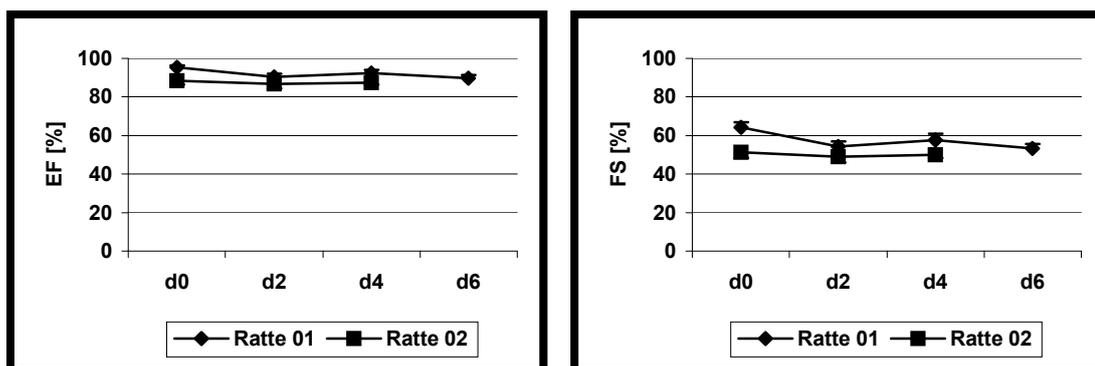


Abb. 3.4: Intraobserver-Reliabilität TTE-gestützter Hämodynamik-Messungen bei Ratten: Auf der Basis echokardiographischer M-Mode-Bilder ($n = 5$ je Zeitpunkt) wurden bei zwei Ratten FS- bzw. EF-Werte berechnet. Sowohl die Abweichungen zwischen den fünf Berechnungen jedes einzelnen Messpunktes – dargestellt durch Standardabweichungsbalken – als auch die Abweichungen der Mittelwerte verschiedener Zeitpunkte voneinander – erkennbar am nahezu horizontalen zeitlichen Verlauf der Kurven – waren sehr gering. Die Standardabweichungen betragen für die EFs 1 – 3% der Mittelwerte, für die FSs 2 – 6%.

Die präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Intraobserver-Abweichungen zwischen zu verschiedenen Zeitpunkten echokardiographisch bestimmten FS- bzw. EF-Werten gering sind. Die TTE bei Ratten kann somit als zuverlässiges Verfahren für die Beurteilung hämodynamischer Veränderungen eingesetzt werden.

3.1.2 Verteilung intrakoronar applizierter HUVECs

Um die Verteilung transplanteder Zellen in der Ratte darzustellen und somit die Effektivität des intrakoronaren Applikationsweges zu untersuchen, wurden HUVECs mit $^{111}\text{Indium-Oxin}$ markiert und nach intrakoronarer Applikation mittels SPECT-Messungen nachgewiesen. Sowohl in den planaren als auch in den 3D-Darstellungen zeigte sich eine spezifisch kardiale Radioaktivitäts-Anreicherung, die über alle Regionen des Rattenherzens gleichmäßig verteilt war. Die restliche Radioaktivität konnte ubiquitär im Tierkörper mit Schwerpunkten in Lunge und Milz detektiert werden. Abbildung 3.5 veranschaulicht die beschriebene Verteilung in einer planaren Aufnahme 45 min nach Zellapplikation.

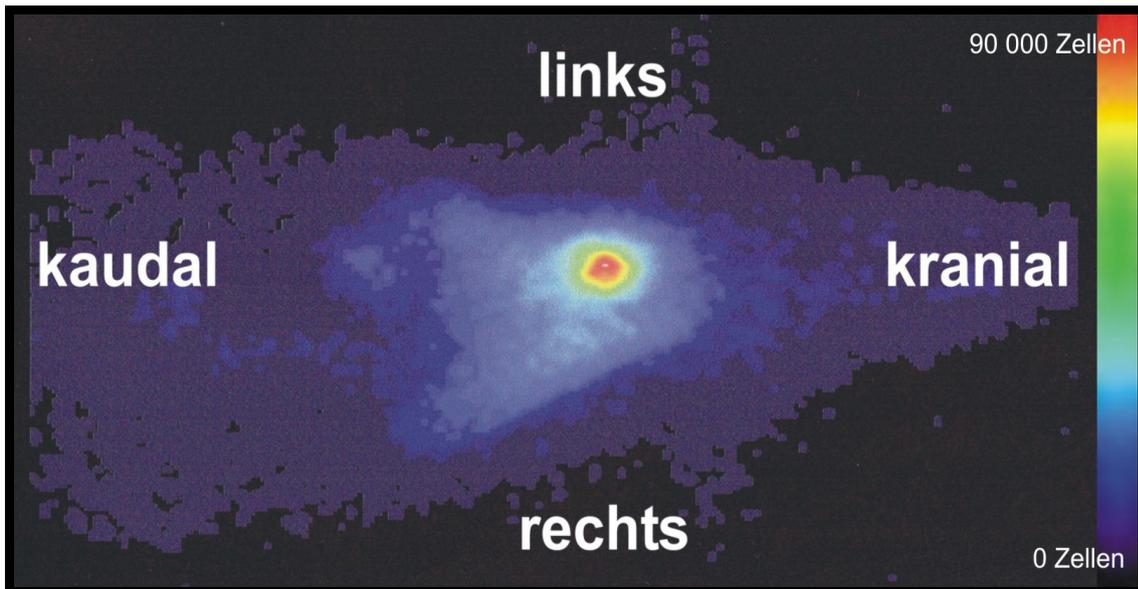


Abb. 3.5: Verteilung intrakoronar applizierter HUVECs in der SPECT-Diagnostik: Nach kathetergestützter, intrakoronärer Applikation ¹¹¹Indium-Oxin-markierter HUVECs zeigte sich in der planaren SPECT-Messung 45 min nach Zellinjektion eine lokale Konzentration (rot) der Radioaktivität im Rattenherzen.

Um den Anteil der intrakoronar verbleibenden HUVECs zu quantifizieren, wurde die in der Herzregion der Ratte befindliche Radioaktivitätsmenge zu verschiedenen Zeitpunkten in Relation zur insgesamt verabreichten Radioaktivität gesetzt. Der zeitliche Verlauf des Anteils kardial lokalisierter Indium-markierter HUVECs ist in Abbildung 3.6 dargestellt. Während der ersten Minute nach Applikation fanden sich 36% der Radioaktivität unmittelbar in den Herzen. Dieser Wert nahm über die Zeit langsam ab und erreichte nach 45 min konstante 18%.

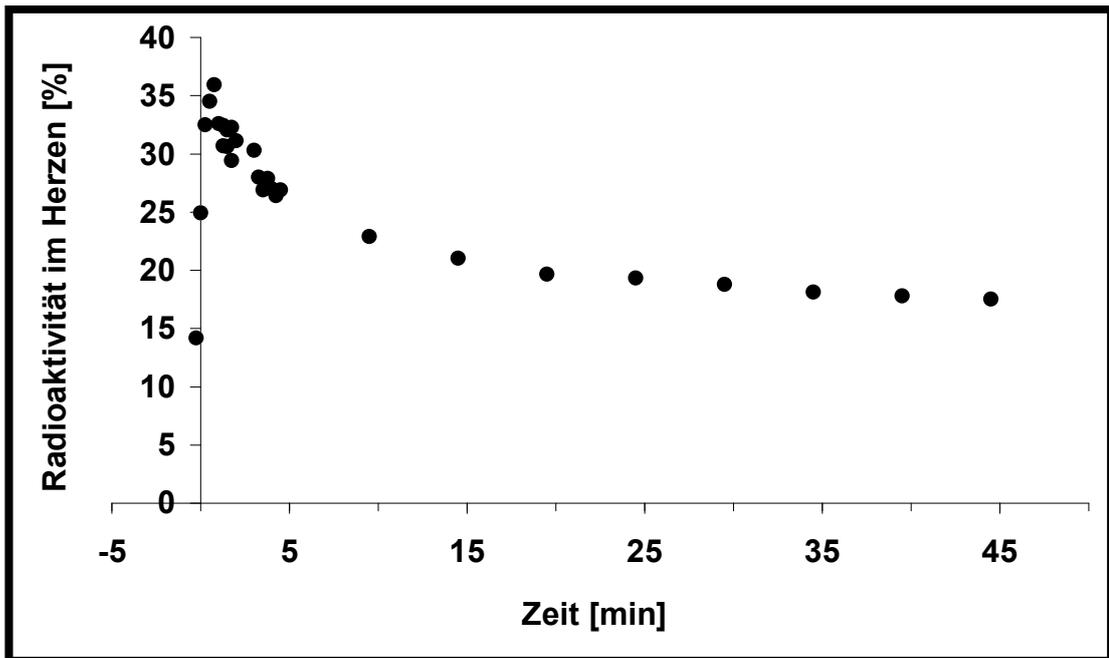


Abb. 3.6: Zeitabhängige Veränderung des Radioaktivitätsanteils im Rattenherzen bei kathetergestützter, intrakoronarer Applikation $^{111}\text{Indium-Oxin}$ -markierter HUVECs: Nach initialem Anstieg sinkt der Anteil der in den Herzkranzgefäßen deponierten Zellen langsam ab und erreicht schließlich einen konstanten Wert von 18%. Dieser Zellanteil konnte also stabil intrakoronar transplantiert werden.

Eine Kontrollmessung nach 48 h ergab noch 3% der ursprünglich verabreichten Radioaktivität im Rattenherzen, während in Leber und vor allem Niere eine deutliche Indium-Anreicherung zu verzeichnen war. Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung durch Austritt des Marker-Isotops aus den HUVECs – vor allem infolge induzierter Zellnekrose – erklärt werden kann, wurden HUVECs in Kultur (200 000 Zellen) mit $^{111}\text{Indium-Oxin}$ (1,5 MBq) markiert. Während nach 90 min noch 60% der Ausgangsmenge zu detektieren waren, fiel der zelluläre Anteil nach 6 h auf 18%, und nach 48 h auf 3%. Der offensichtlich zelltoxische Einfluss von $^{111}\text{Indium-Oxin}$ auf die inkorporierenden Zellen ist bekannt. Die geringe kardiale Restaktivität 48 h nach Zellapplikation in die Ratten-Koronarien könnte also durch die Zelltoxizität von $^{111}\text{Indium-Oxin}$ verursacht worden sein. Für Langzeitbeobachtungen ist die Markierung mit $^{111}\text{Indium-Oxin}$ also ungeeignet.

Zwecks Verifizierung der gleichmäßigen Zellverteilung innerhalb der Rattenherzen wurden 20 Tieren mit CellTracker™ Orange markierte HUVECs transplantiert. Nach 0 – 4 h folgten Herzentnahme und Fluoreszenzmikroskopie von parallel zur Ventilebene verlaufenden Schnitten durch alle Ventrikelareale. Hierbei war zu allen Zeitpunkten eine homogen über beide Herzkammerwände verteilte Deposition der HUVECs zu erkennen. Abbildung 3.7 zeigt drei repräsentative Schnitte durch das linksventrikuläre Myokard im Bereich der Herzbasis (A), der Herzmitte (B) sowie der Herzspitze (C) – exemplarisch 1 h nach Zellapplikation.

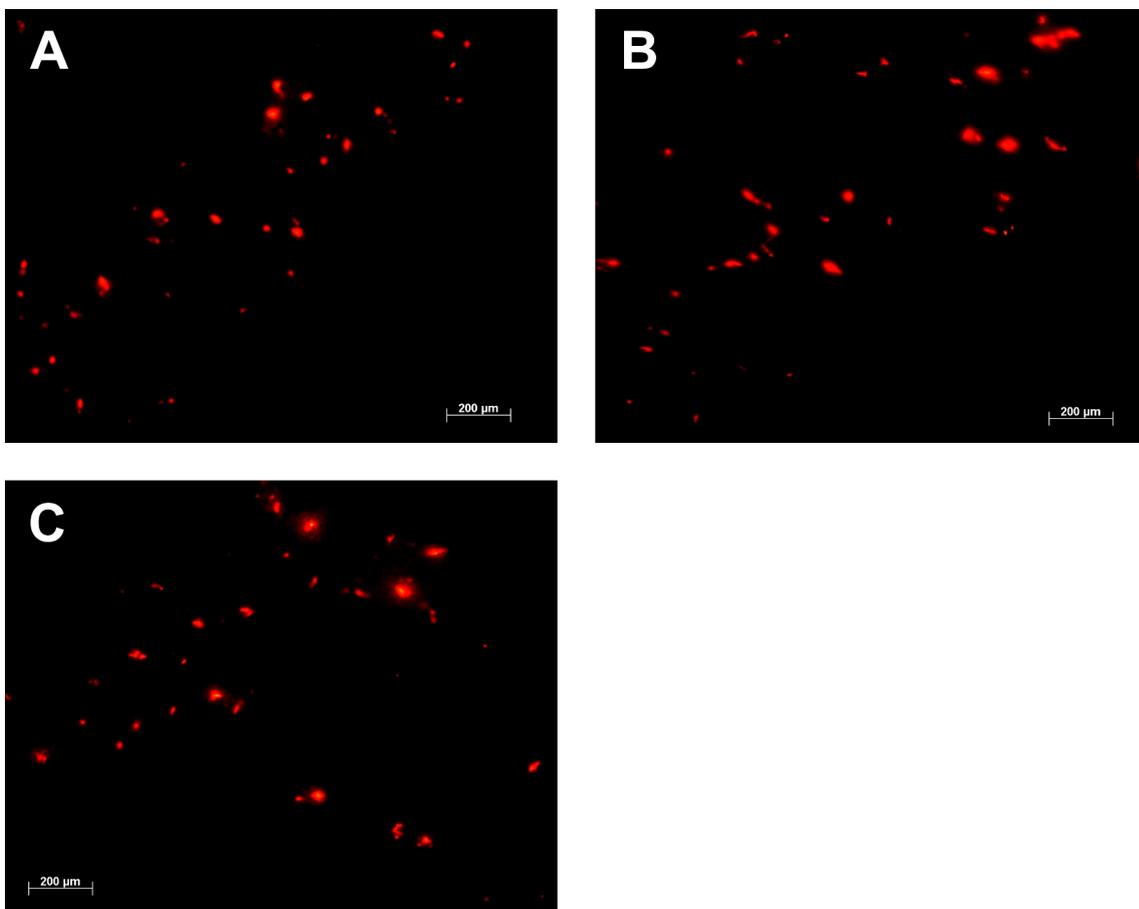


Abb. 3.7: Myokardiale Verteilung der HUVECs 1 h nach intrakoronarer Transplantation: Mit CellTracker™ Orange markierte HUVECs lagen homogen über das ventrikuläre Myokard verteilt: Herzbasis (A), Herzmitte (B), Herzspitze (C).

Um nachzuweisen, dass eine gleichmäßige Zellverteilung im Rattenherzen nicht nur direkt (0 – 4 h) nach Transplantation vorlag, sondern auch über einen längeren Zeitraum erhalten blieb, wurden EGFP-exprimierende HUVECs

intrakoronar transplantiert. Im transmuralen Schnitt in Abbildung 3.8 ist zu erkennen, dass sich auch noch 7 Tage nach Zellgabe in allen Schichten der linksventrikulären Kammerwand EGFP-positive HUVECs befanden.

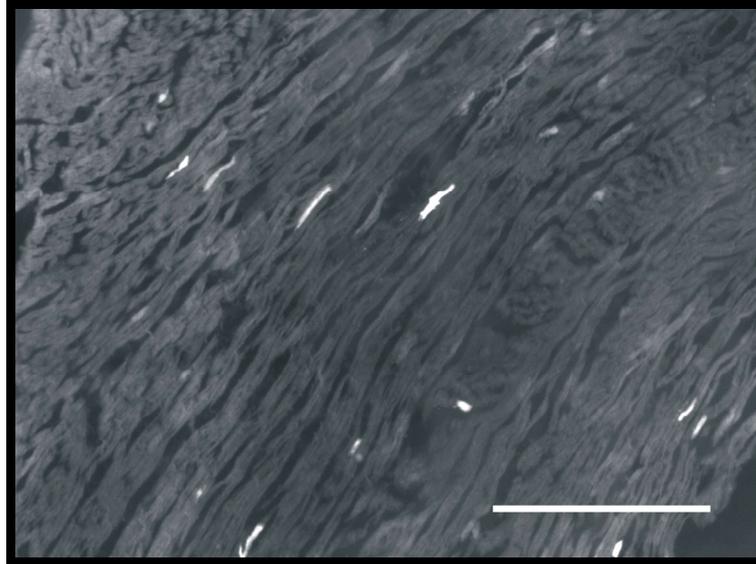


Abb. 3.8: Myokardiale Verteilung der HUVECs 7 Tage nach intrakoronarer Transplantation: EGFP-markierte HUVECs (weiß) waren homogen in allen Myokard-Arealen positioniert. (Balken entspricht 500 μm)

Aufgrund dieser Befunde kann man davon ausgehen, dass es sich bei der verwendeten, kathetergestützten Zelltransplantationsmethode um ein Verfahren handelt, bei dem HUVECs nach intrakoronarer Deposition effektiv und homogen über das Gesamtmyokard verteilt vorliegen.

3.1.3 Schicksal intrakoronar applizierter HUVECs

Nach der Etablierung des Zellapplikationsverfahrens und der Quantifizierung seiner Effektivität konnte das Schicksal der kardial deponierten HUVECs sowie ihre Interaktionen mit umliegenden Zellen untersucht werden.

EGFP-exprimierende HUVECs wurden nun unter Einsatz der bereits beschriebenen kathetergestützten Methode in die Koronararterien von mit CsA immunsupprimierten Wistar-Ratten transplantiert. Nach 1 h sowie nach 1, 3, 7 oder 21 Tagen wurden die Rattenherzen entnommen und in 4% (w / v) PFA

fixiert. Um Aussagen über das Schicksal der applizierten HUVECs und deren Interaktionen mit umliegenden Zellen treffen zu können und somit auf die Phänomene der Transdifferenzierung von HUVECs in Kardiomyozyten bzw. der Zellfusion von HUVECs mit Kardiomyozyten untersuchen zu können, folgten Immunfluoreszenzfärbungen mit speziesspezifischen Antikörpern. Die erzielten Ergebnisse sollen im Folgenden beschrieben werden.

3.1.3.1 Intrakoronare EGFP-HUVEC-Lokalisation in den ersten 24 h

Die ersten Immunfluoreszenzfärbungen wurden an 1 h nach Zelltransplantation entnommenen Rattenherzen durchgeführt. Die Abbildungen 3.9 A – D zeigen für den genannten Zeitpunkt repräsentative 7 µm-Schnitte durch das linksventrikuläre Myokard. In Abbildung 3.9 A ist eine morphologisch typische, EGFP-positive HUVEC in intramyokardialer Lage zu sehen. Zwecks Bestätigung der SPECT-gestützt gemessenen 18% konstant intrakardialen Zellen wurden in sechs aufeinanderfolgenden Schnitten alle grünfluoreszierenden Zellen gezählt. Unter Berücksichtigung des Schnittvolumens, des gesamten Herzvolumens und des Prozentsatzes markierter HUVECs von 30% wurde berechnet, dass sich 1 h nach Transplantation 17% der transplantierten Zellen intrakardial befunden hatten.

Um EGFP-positive Zellen und deren umgebende Strukturen zu verschiedenen Zeitpunkten u.a. in Bezug auf Zellart, Lage und Herkunft charakterisieren zu können, wurden speziesspezifische Antikörper verwendet: Ein rattenspezifischer Antikörper gegen den MCT-1 – ein ubiquitär im Organismus vorkommendes zellmembranständiges Transporter-Protein – sowie ein Antikörper gegen humane mitochondriale Proteine (anti-hM), welcher entsprechend eigenen Vorversuchen humane Zellen deutlich färbte (siehe Abbildung 3.10), während weder Ratten-Endothel- noch Ratten-Myokard-Zellen erkannt wurden. Abbildung 3.9 B zeigt, dass sich die EGFP-positiven HUVECs 1 h nach Intervention mittels anti-hM anfärben ließen. Antikörper gegen Ratten-MCT-1 stellten Kardiomyozyten der Nager dar, detektierten jedoch nicht die benachbart liegenden HUVECs (Abb. 3.9 C). Durch Verwendung der

Antikörperfärbung gegen in endothelialen Plasmamembranen lokalisiertes Caveolin-1, welche die Ratten-Endothelzellen stärker färbte als die HUVECs, konnte gezeigt werden, dass die applizierten Zellen nach 60 min intrakardial intrakapillär lagen (Abb. 3.9 D).

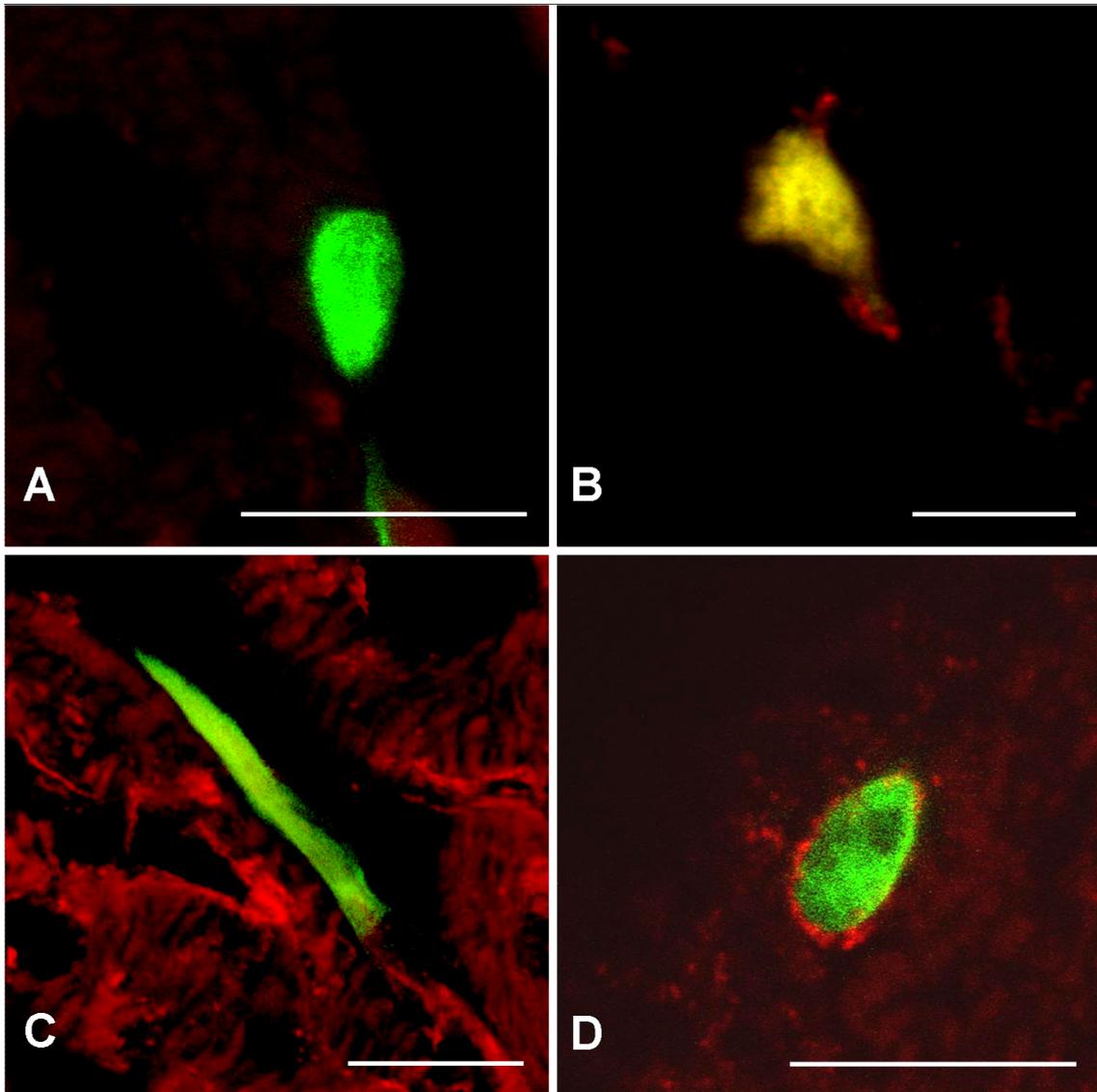


Abb. 3.9: Kryoschnitte (7 μm) von Rattenherzen 1 h nach intrakoronarer HUVEC-Applikation: Es zeigten sich EGFP-exprimierende Zellen (A; grün), positiv für humane mitochondriale Proteine (B; rot), negativ für rattenspezifische MCT-1-Antikörper (C; rot) sowie umschlossen von Caveolin-1-positiven Strukturen (D; rot). (Balken entspricht 10 μm)

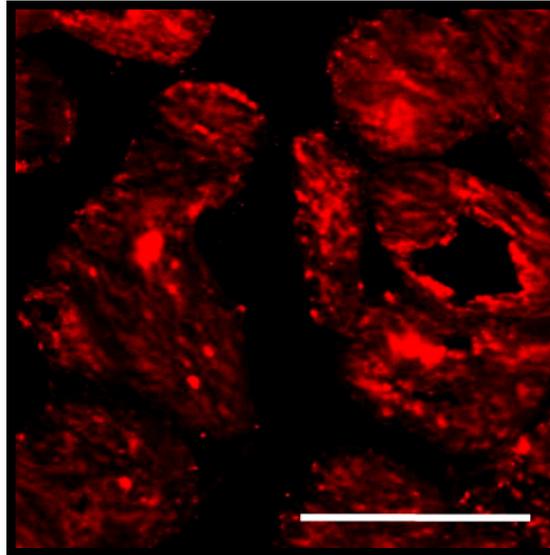


Abb. 3.10: Anti-hM-Kontrollfärbung humanen Herzmuskelgewebes: Der verwendete Antikörper gegen humane mitochondriale Proteine färbt die humanen Kardiomyozyten deutlich. (Balken entspricht 20 μm)

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass EGFP-positive HUVECs 1 h nach ihrer kathetergesteuerten Transplantation im Rattenherzen ausschließlich intrakapillär vorliegen. Weiterhin sind die grünfluoreszierenden Zellen phänotypisch unverändert, da sie nur humane, jedoch keine rattenspezifischen Marker exprimieren.

Weitere Analysen wurden nach 24 h durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurden EGFP-positive Zellen nach wie vor durch anti-hM- sowie anti-CD31-Antikörper erkannt, nicht jedoch durch anti-Ratten-MCT-1-Immunglobuline. Dies bedeutet, dass die applizierten Zellen unverändert humane endotheliale Zellen sind. Weder Transdifferenzierung in Kardiomyozyten noch Zellfusion mit diesen hat bisher stattgefunden.

3.1.3.2 Langzeitbeobachtungen nach Zelltransplantation

Histologische Untersuchungen 3 und 7 Tage nach intrakoronarer Transplantation erbrachten überraschenderweise, dass alle EGFP-positiven Zellen im Rattenherzen einen längs gestreckten, kardiomyozytären Phänotyp aufwiesen (Abb. 3.11 A). Darüber hinaus zeigten Färbungen mit einem

spezifisch gegen sarkomerisches α -Actinin gerichteten Antikörper eine Querstreifung der EGFP-exprimierenden Zellen (Abb. 3.11 D). Diese beiden Befunde sprechen dafür, dass es sich bei den grünfluoreszierenden Zellen um Kardiomyozyten handelt.

Zu weiteren Studien sollte die Frage geklärt werden, ob sich die transplantierten HUVECs in der unmittelbaren Nachbarschaft zu Ratten-Kardiomyozyten in humane Herzmuskelzellen transdifferenziert hatten, ob eine Fusion zwischen HUVECs und Empfänger-Kardiomyozyten stattgefunden hatte oder ob ein bislang unberücksichtigter Mechanismus für die geschilderten Beobachtungen verantwortlich war.

Um Transdifferenzierung als Ursache zu verifizieren bzw. zu falsifizieren, wurden die in Abschnitt 3.1.3.1 eingeführten speziesspezifischen Antikörper verwendet. Im Gegensatz zu den Ergebnissen 1 h nach Transplantation wurden die grünfluoreszierenden Zellen an Tag 7 nach Intervention nicht mehr durch anti-hM-Antikörper erkannt (Abb. 3.11 B). Sie wiesen jedoch eine deutliche Färbung durch rattenspezifische anti-MCT-1-Immunglobuline auf (Abb. 3.11 C). Dass die EGFP-exprimierenden Kardiomyozyten positiv für Rattenmarker sowie negativ für humane mitochondriale Proteine sind, macht eine Transdifferenzierung der HUVECs in Kardiomyozyten unwahrscheinlich.

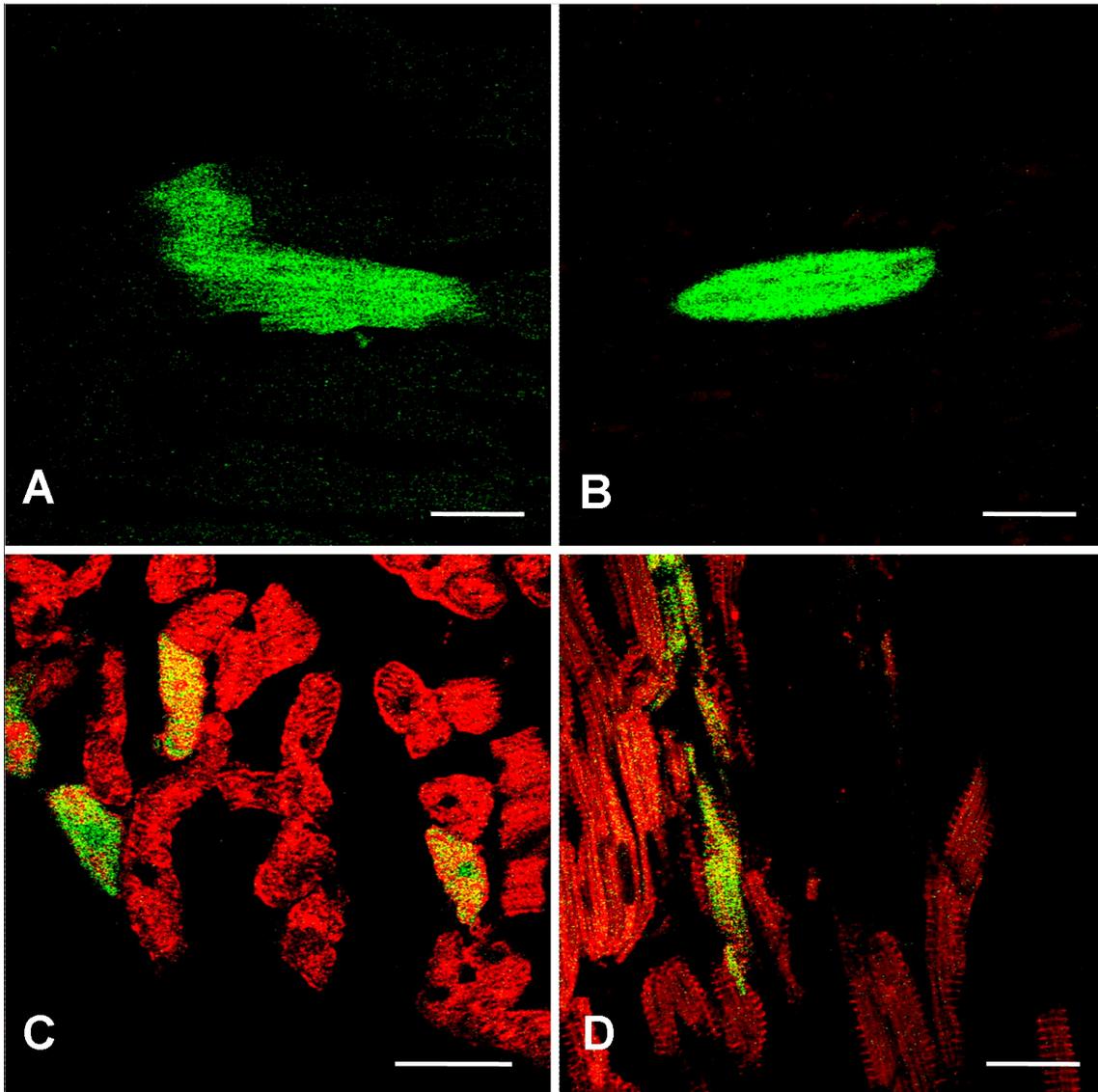


Abb. 3.11: Kryoschnitte (7 μm) von Rattenherzen 7 Tage nach intrakoronärer HUVEC-Applikation: EGFP-exprimierende Zellen entsprachen phänotypisch Kardiomyozyten (A; grün), waren negativ für anti-hM- (B; rot), positiv für rattenspezifischen anti-MCT-1-Antikörper (C; rot) und wiesen nach Färbung gegen sarkomerisches α -Actinin quergestreifte Musterungen auf (D; rot). (Balken entspricht 20 μm)

Nachdem Transdifferenzierung als Mechanismus unwahrscheinlich war, wurde untersucht, ob möglicherweise Zellfusion der EGFP-HUVECs mit Ratten-Kardiomyozyten stattgefunden hatte. Die Abwesenheit von humanen mitochondrialen Proteinen in den EGFP-exprimierenden Kardiomyozyten am 7. Tag nach HUVEC-Applikation spricht gegen eine Zellfusion. Um diesen Mechanismus eindeutig ausschließen zu können, wurden Kern-Färbungen mit der DNA-interkalierenden Substanz DAPI durchgeführt: In allen beobachteten

Zellen stellte sich stets nur ein Kern pro EGFP-exprimierendem Ratten-Kardiomyozyten dar (Abb. 3.12). Dies schließt eine Zellfusion aus.

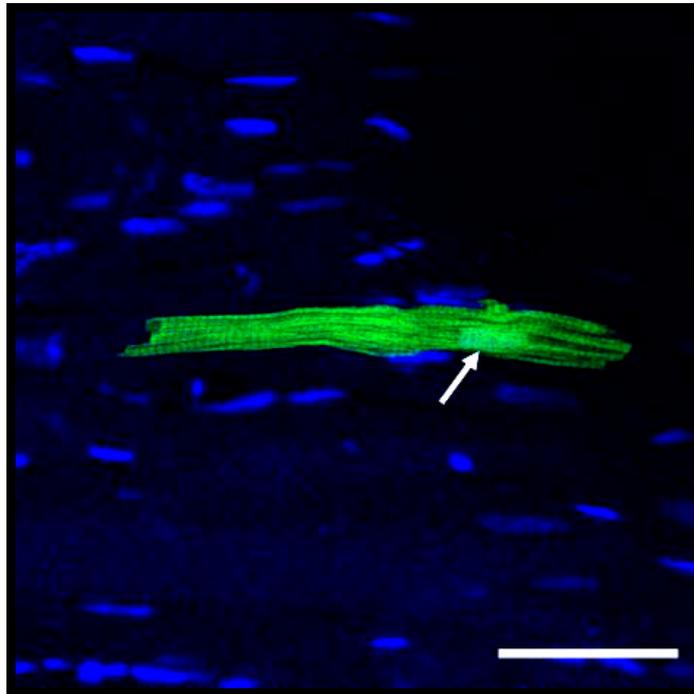


Abb. 3.12: Kern-Färbung am 7. Tag nach Zelltransplantation: Alle EGFP-exprimierenden Kardiomyozyten (grün) wiesen in einer DAPI-Färbung lediglich einen einzigen Kern (weißer Pfeil) auf. (Balken entspricht 50 μm)

Außerdem wurde an Tag 7 – wie in Abschnitt 3.1.3.1 bereits für 1 h beschrieben – die Anzahl intrakardialer EGFP-positiver Zellen extrapoliert. Den Berechnungen zufolge entspricht die Anzahl der EGFP-positiven Zellen 7 Tage nach Transplantation 10% der Zellanzahl der ursprünglich applizierten Zellen bzw. 59% der Zellzahl, die 1 h nach Intervention errechnet worden war.

Ein auffälliger Befund in der anti-hM-Färbung war, dass ubiquitär im Rattenherzen hM-positive Zellfragmente um myokardiale Kapillarendothelzellen und die umliegenden Kardiomyozyten herum verteilt waren (Abb. 3.13). Die Anlagerung humaner mitochondrialer Proteine im Extrazellulärraum an benachbarte Zellen lässt vermuten, dass ein Teil der transplantierten HUVECs apoptotisch geworden war und sich deren Zellbestandteile im Interstitium verteilt hatten.

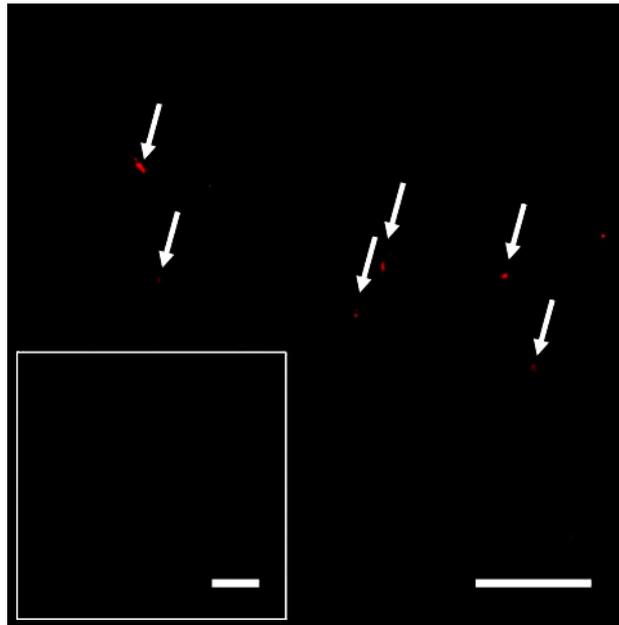


Abb. 3.13: Interstitielle, hM-positive Zellfragmente 7 Tage nach intrakoronarer HUVEC-Transplantation: In 7 μm -Kryoschnitten durch Rattenherzen zeigten sich hM-positive Zellfragmente (rote Punkte bzw. weiße Pfeile), welche unmittelbar an die Kapillarendothelzellen und die benachbarten Kardiomyozyten grenzten. In Kontrollratten, die statt einer HUVEC-Transplantation nur Medium injiziert bekommen hatten, waren keine hM-positiven Zellfragmente nachweisbar (kleiner weißer Kasten). (Balken entspricht 20 μm)

Schließlich wurden auch 21 Tage nach EGFP-HUVEC-Applikation Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Hierbei konnten in sechs konsekutiven Schnitten weder grünfluoreszierende Zellen noch hM-positive Strukturen detektiert werden. Dies deutet sowohl auf einen Zelluntergang der HUVECs als auch auf eine lediglich transiente EGFP-Expression in den Kardiomyozyten hin.

3.1.3.3 Apoptose intrakoronar transplantierte HUVECs

Nachdem Transdifferenzierung und Zellfusion als Erklärungen für die Beobachtung von grünfluoreszierenden Kardiomyozyten ausgeschlossen waren, blieb zu klären, ob der Langzeitmarker EGFP über einen dritten, direkten Weg von den HUVECs in die Ratten-Kardiomyozyten gelangt war. Aufgrund der beschriebenen Hinweise für einen Zelluntergang der HUVECs war es wahrscheinlich, dass entweder der programmierte Zelltod (Apoptose) oder der

unprogrammierte Zelltod (Nekrose) in unmittelbarem Zusammenhang mit dem EGFP-Transfer standen. Daher wurden 1 h, 1, 3, 7 und 21 Tage nach Zelltransplantation 7 µm-Schnitte von den entnommenen Rattenherzen angefertigt und immunhistochemisch auf den Phosphorylierungszustand bzw. die Aktivität des zentralen Apoptose-Enzyms Caspase-3 und der anti-apoptotisch wirkenden Akt1 / PKB α untersucht. Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, war die Caspase-3 nach 1 h (D) und nach 24 h (E) im gesamten Herzen aktiviert, während nach 7 Tagen (F) wieder eine Basalexpression vorlag. Passend dazu zeigte der Apoptose-Gegenspieler Akt1 / PKB α nach 24 h (B) ein Aktivitätsminimum und kehrte nach 7 Tagen (C) wieder zurück in einen Phosphorylierungszustand wie unter Kontrollbedingungen.

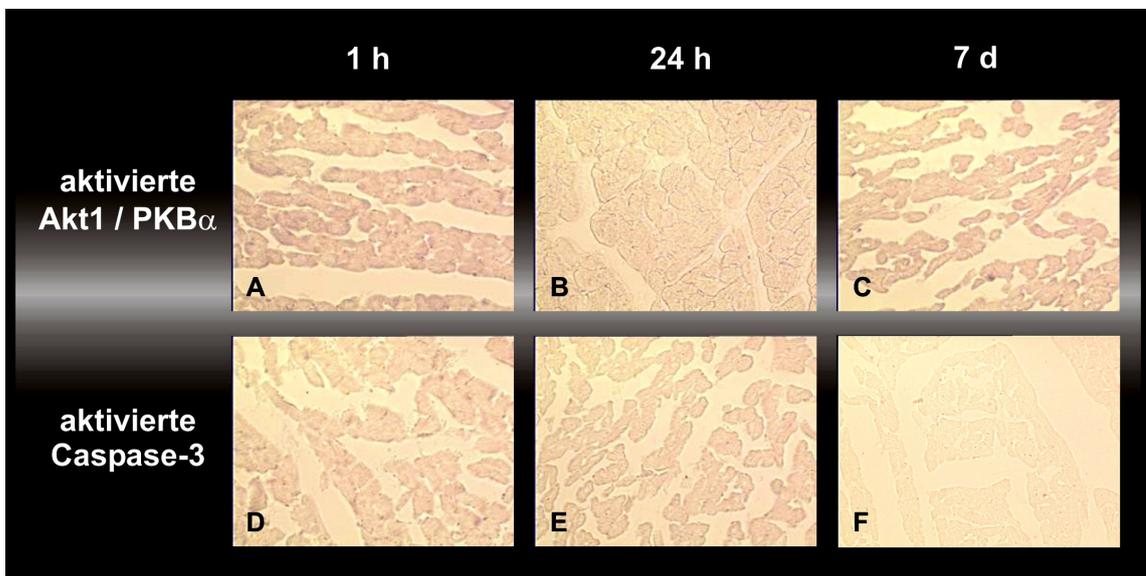


Abb. 3.14: Einfluss intrakoronarer HUVEC-Applikation auf die Apoptoseaktivität im Rattenherzen: Immunhistochemisch in 7 µm-Schnitten durch Rattenherzen dargestellte Aktivitätslevel des anti-apoptotischen Markers Akt1 / PKB α (A – C) sowie des Apoptose-Markers Caspase-3 (D – F) 1 h, 24 h und 7 d nach intrakoronarer HUVEC-Applikation. (Vergrößerung: 20 \times)

Um festzustellen, ob die erhöhte Apoptoseaktivität durch die transplantierten Zellen selbst oder durch die kathetergestützte Applikationstechnik verursacht worden war, wurden Kontrollversuche mit HUVEC-transplantierten Ratten und Tieren, die nur Medium injiziert bekamen, durchgeführt. Es zeigten sich in der Gruppe mit Zellgabe die in Abbildung 3.15 B schwarz imponierenden fokalen Caspase-3-Aktivitätserhöhungen, während in der Kontrollgruppe (Abb. 3.15 A)

keine vermehrten Apoptose-Prozesse nachgewiesen werden konnten. Eine Doppelfärbung gegen aktivierte-Caspase-3 und gegen humane mitochondriale Proteine führte zu den in den Abbildungen 3.15 C und 3.15 D präsentierten Co-Lokalisation beider Antikörper am 2. Tag nach Transplantation.

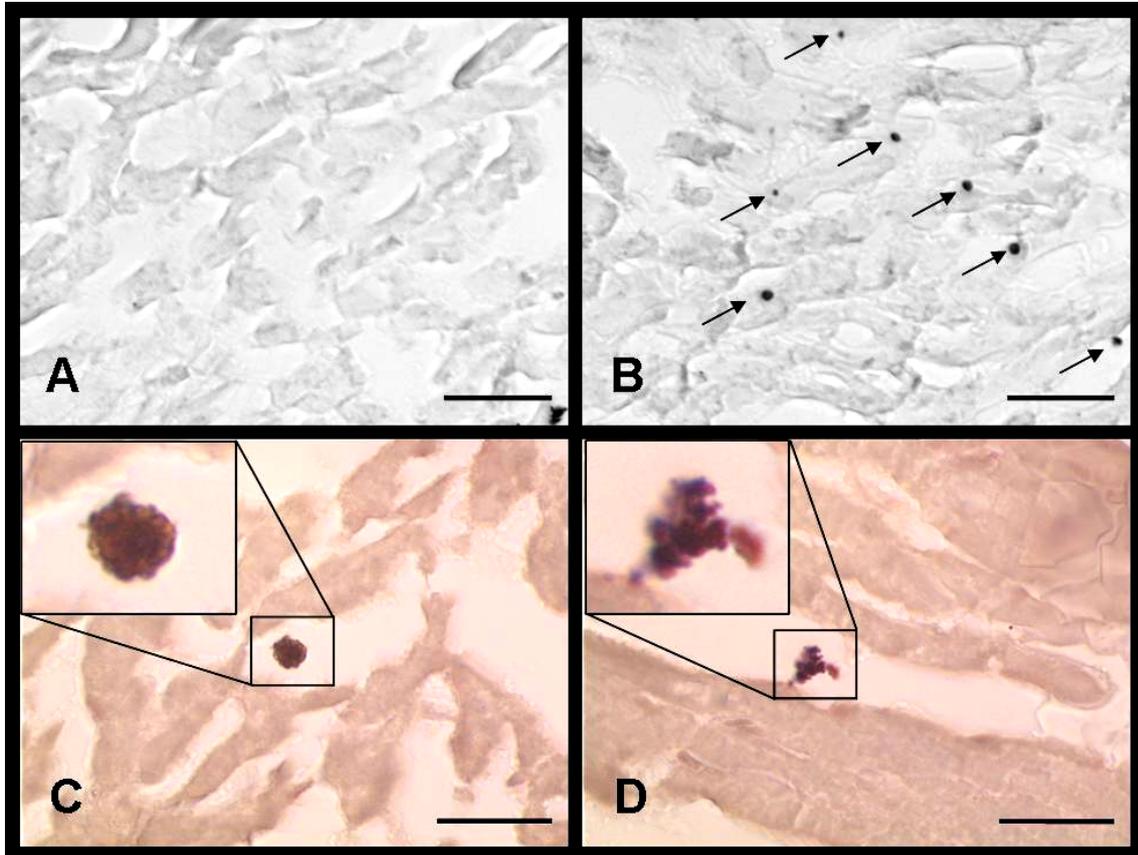


Abb. 3.15: Erhöhte Apoptoseaktivität intrakoronar applizierter HUVECs: Immunhistochemische Antikörper-Färbungen gegen aktivierte-Caspase-3 erbrachten bei zelltransplantierten Ratten 2 Tage nach Intervention fokale Apoptose-Aktivitätsvermehrungen (B; schwarze Pfeile), die in einer Doppelfärbung mit anti-hM-Signalen (C und D; dunkelrot) co-lokalisiert waren. Die Zelle in (D) zeigt bereits ein fortgeschrittenes Apoptose-Stadium. (Balken entspricht in A und B 100 μ m ; in C und D 50 μ m)

Die erhöhte Apoptose-Aktivität befand sich dementsprechend in den transplantierten HUVECs, welche auch morphologisch Hinweise auf ihren programmierten Untergang boten.

In der Absicht, die Aktivität der Caspase-3 zu quantifizieren, wurde diese bei Ratten 1, 3 und 7 Tage nach Zelltransplantation sowie bei einer Kontrollgruppe (jeweils n = 7) kolorimetrisch bestimmt. Hierbei wurden keine signifikanten

Aktivitäts-Unterschiede zwischen den Herzen aus transplantierten Ratten und den Kontrolltieren gemessen. Wahrscheinlich ging der geringe Anteil von apoptotischen HUVECs im Vergleich zu der Zellmasse des Restmyokards unter.

Zusammenfassend zeigen die in den Abschnitten 3.1.3.1 bis 3.1.3.3 geschilderten Ergebnisse, dass sich EGFP-positive HUVECs bis zu 24 h nach ihrer intrakoronaren Applikation in den myokardialen Rattenkapillaren befinden. Nach 3 bis 7 Tagen sind alle im Herzen grünfluoreszierenden Zellen Ratten-Kardiomyozyten, wofür weder Transdifferenzierung noch Zellfusion verantwortlich sein können. Erhöhte Apoptose-Aktivität während der ersten 24 – 72 Stunden nach Transplantation – im Besonderen in den verabreichten HUVECs – und das Verschwinden jeglicher humaner mitochondrialer Proteine bis zum 21. Tag deuten auf einen programmierten Zelltod der HUVECs hin, im Rahmen dessen ein EGFP-Transfer in Ratten-Kardiomyozyten stattfinden könnte. In einem weiteren Teil der Arbeit sollte daher die Möglichkeit eines horizontalen Gen-Transfers näher untersucht werden (vgl. Abschnitt 3.2).

3.1.4 Hämodynamische Auswirkungen der Zelltransplantation

Um die hämodynamischen Auswirkungen der HUVEC-Applikation zu untersuchen, wurden die Ratten sowohl unmittelbar vor und nach der Transplantation (jeweils $n = 8$ in Zell- und Kontrollgruppe) als auch direkt vor ihrer Tötung an den Tagen 1, 3, 7 (jeweils $n = 2$) oder 21 ($n = 1$) echokardiographisch untersucht. Die dabei aufgenommenen M-Mode-Darstellungen wurden – wie in Abschnitt 3.1.1.3 bereits beschrieben – vermessen, so dass für jeden Zeitpunkt EF und FS nach den ebenfalls dort angeführten Formeln berechnet werden konnten. In Abbildung 3.16 ist für beide hämodynamischen Größen der Verlauf ihrer Mittelwerte über den gesamten Beobachtungszeitraum angegeben.

Es ist erkennbar, dass weder die Ejektions- noch die Verkürzungsfraktion über den beobachteten Zeitraum evtl. eingriffsassoziierte, signifikante Veränderungen ergab. Auch konnten keine Unterschiede zwischen den zelltransplantierten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Transplantationen haben also offensichtlich keine hämodynamischen Auswirkungen auf die Rattenherzen.

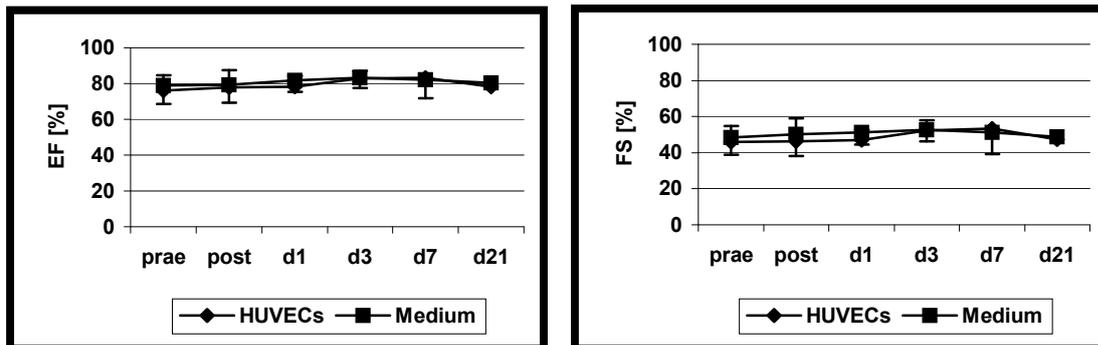


Abb. 3.16: TTE-ermittelte Hämodynamik nach Zelltransplantation: Weder die intrakoronare Applikation von HUVECs im Vergleich zu der von Medium noch der Katheter-Eingriff selbst (vgl. „*prae*“ *interventionem* mit „*post*“ *interventionem*) führten zu signifikanten Veränderungen der Herzfunktion, bestimmt durch linksventrikuläre Ejektions- (EF) und Verkürzungsfraktion (FS).

Auf Basis der M-Mode-Vermessungen wurden weitere kardiale Parameter berechnet. Im Folgenden wird Bezug genommen auf die enddiastolische linksventrikuläre Hinterwanddicke (EDHW; in Abb. 3.3: LVPWd) und die enddiastolische Dicke des interventrikulären Septums (EDS; in Abb. 3.3: IVSd), mittels derer sich die Myokardmasse des linken Ventrikels nun aus folgender Formel ergab: $LV\text{-Masse} = 1,04 \times [(EDD + EDHW + EDS)^3 - EDD^3]$. Abbildung 3.17 zeigt, dass die LV-Masse sowohl in der Zelltransplantationsgruppe als auch bei den Kontrolltieren über die gesamte Beobachtungszeit gesehen abnahm. Auch das enddiastolische Volumen (EDV) des linken Ventrikels, das sich nach der in Abschnitt 3.1.1.3 genannten Formel errechnet, wurde in beiden Versuchstiergruppen geringer (vgl. Abb. 3.17).

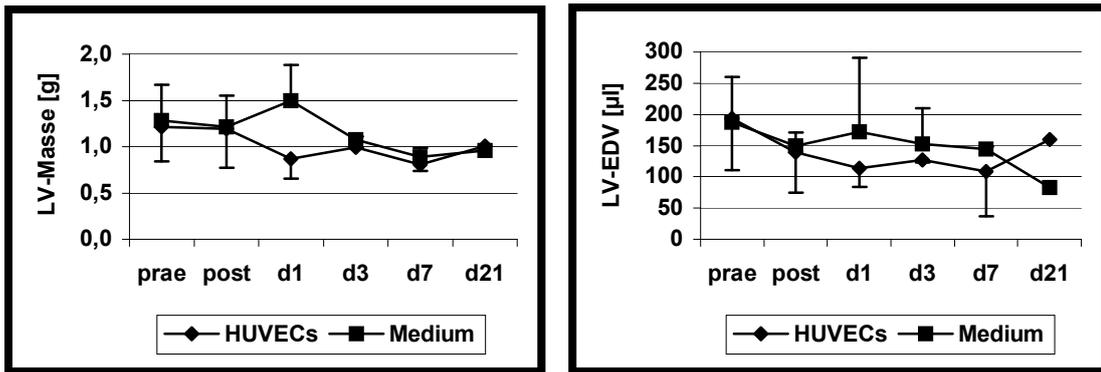


Abb. 3.17: Echokardiographische Bestimmungen der LV-Masse und des LV-EDV resultierten in einer Abnahme beider Parameter sowohl bei zelltransplantierten Ratten als auch in der Kontrollgruppe mit Medium-Applikation über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen hinweg.

Beide Befunde lassen sich mit einer Abnahme des extrazellulären Volumens vereinbaren, wie sie z.B. im Rahmen eines generalisierten Flüssigkeitsmangels auftritt. Darüber hinaus wurden die Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten gewogen und das Herzgewicht direkt nach der Organentnahme bestimmt. Wie in Abbildung 3.18 zu erkennen ist, erlitten alle Tiere einen deutlichen, 10 – 14 Tage lang progredienten Körpergewichtsverlust. Die Massenabnahme war bei den HUVEC-transplantierten Ratten am größten, gefolgt von den Mediumgabe-Tieren und der CsA-Kontrollgruppe. Bildete man den Quotienten aus Herz- und Körpergewicht, ergaben sich im 3-wöchigen Beobachtungszeitraum konstante Werte für alle Gruppen (vgl. Abb. 3.18).

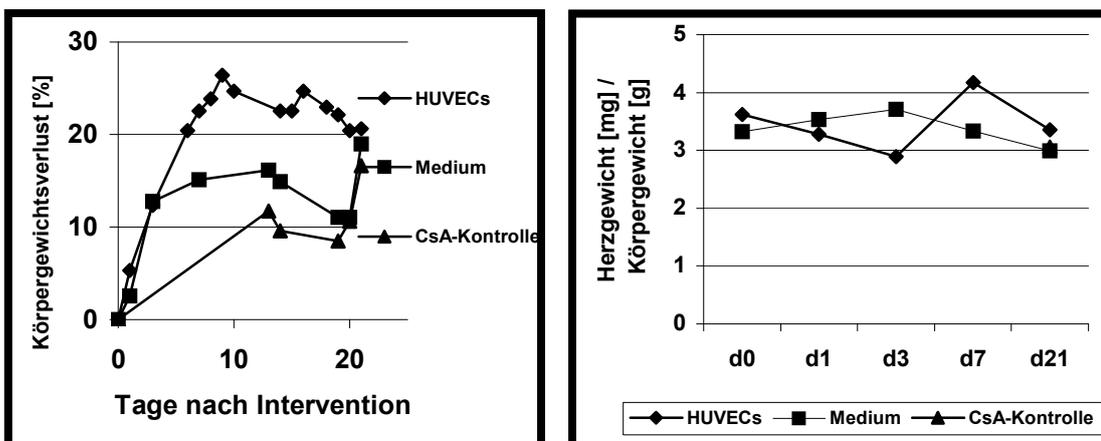


Abb. 3.18: Einfluss der Transplantationen auf Körper- und Herzgewicht: In den ersten 10 – 14 Tagen nach Versuchsbeginn verloren alle Ratten zunehmend an Körpergewicht, angeführt von den HUVEC-transplantierten Tieren vor der Medium- und der CsA-Kontrollgruppe. Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht blieb jedoch in allen Experimentalgruppen tendenziell unverändert.

Körpergewichts-, LV-Massen- und LV-EDV-Verlust können Ausdruck eines extrazellulären Flüssigkeitsdefizits sein, für das die beobachtete geringe tägliche Trinkmenge der Ratten eine Erklärung sein könnte.

3.2 Mechanismus des Apoptose-induzierten EGFP-Transfers von HUVECs in Ratten-Kardiomyozyten

Die bisher geschilderten Versuche legen den Schluss nahe, dass intrakoronar applizierte HUVECs im Rattenmyokard apoptotisch werden und dort ABs bilden. Diese potenziellen DNA-Träger könnten einen EGFP-Gen-Transfer von HUVECs in Ratten-Kardiomyozyten vermitteln.

3.2.1 Nukleinsäuren-tragende ABs aus Apoptotischen HUVECs

Um zu untersuchen, ob von apoptotischen HUVECs produzierte ABs genetisches Material enthalten, wurde in HUVEC-Kulturen, in denen zuvor Nukleinsäuren mit DAPI + EtBr markiert worden waren, mittels Entzug von Serum und Wachstumsfaktoren Apoptose induziert. Mit EtBr kann sowohl DNA als auch RNA visualisiert werden. DAPI fand Verwendung aufgrund hoher Selektivität für DNA im Vergleich zu RNA. Nach 24 h und Anreicherung zellulärer Bestandteile durch Zentrifugation (10 min bei $800 \times g$) zeigten sich unter Betrachtung mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop im Überstand der Kulturen apoptotische Zellen (Abb. 3.19 C), die DAPI- (Abb. 3.19 A) und EtBr-positiv (Abb. 3.19 B) Nukleinsäure-Verdichtungen enthielten. Darüber hinaus fanden sich – wie in Abbildung 3.20 gezeigt – bereits aus HUVECs freigesetzte ABs (C), die ebenfalls für beide Nukleinsäuren-Marker (A bzw. B) positiv waren.

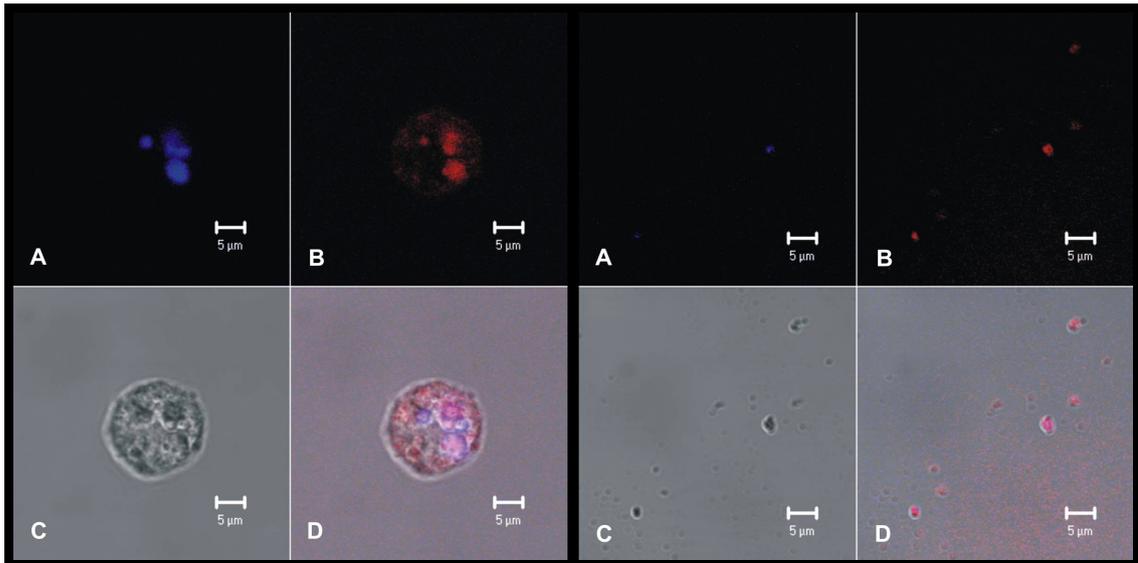


Abb. 3.19: DNA in apoptotischen HUVECs: 24 h nach Apoptose-Induktion enthielt der Überstand einer HUVEC-Kultur apoptotische Zellen (C), in denen sich DAPI- (A) und EtBr-positive (B) Nukleinsäure-Verdichtungen gebildet hatten. (D = Fusion von A bis C)

Abb. 3.20: DNA in ABs: Aus apoptotischen HUVECs in den Kultur-Überstand freigesetzte ABs (C) enthielten DAPI- (A) bzw. EtBr-markierte (B) Nukleinsäuren. (D = Fusion von A bis C)

Diese Versuche zeigen, dass in Apoptose begriffene HUVECs ABs freisetzen, die Nukleinsäuren enthalten. Ob hierbei auch das EGFP-Gen transportiert wird, wurde in den folgenden Versuchen analysiert.

3.2.2 Nachweis von EGFP-DNA in HUVECs und deren ABs mittels PCR

Zum Nachweis der EGFP-DNA in aus EGFP-exprimierenden HUVECs gebildeten ABs wurden PCR-Analysen mit den EGFP-spezifischen Primern 5'-acgtaaacggccacaagttc-3' bzw. 5'-cacatgaagcagcagcactt-3' durchgeführt. Abbildung 3.21 zeigt, dass das Gen des grünfluoreszierenden Markers in EGFP-positiven HUVECs und deren ABs detektiert werden konnte, während es in ABs aus nicht transduzierten HUVECs nicht nachgewiesen werden konnte.

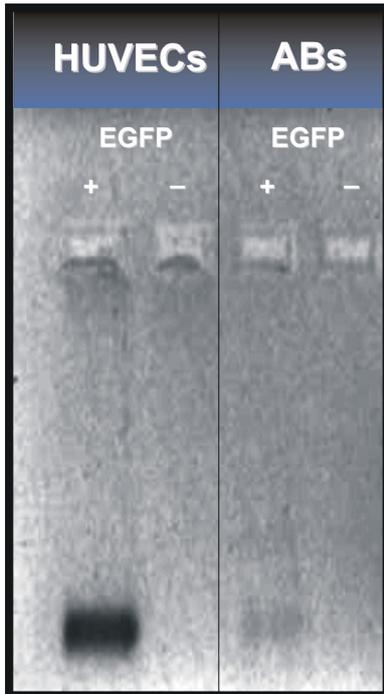


Abb. 3.21: EGFP-Gen-Nachweis in ABs: 1,5%iges (w/v) Agarosegel mit vier Proben nach PCR: EGFP-positive HUVECs, native HUVECs, ABs von EGFP-positiven HUVECs und ABs von nativen HUVECs. Das EGFP-Gen fand sich nur in solchen ABs, welche aus EGFP-exprimierenden HUVECs gewonnen worden waren.

3.2.3 Co-Kultivierung von neoKMs mit EGFP-HUVECs

Nachdem das grundsätzliche Potenzial der HUVECs zur DNA-Weitergabe via ABs gezeigt worden war, sollte nun unter kontrollierten *in vitro*-Bedingungen der direkte EGFP-Transfer von HUVECs in Kardiomyozyten analysiert werden. Es wurde die bereits von *Condorelli et al. (2001)* vorgenommene Co-Kultivierung von neoKMs aus Wistar-Ratten mit EGFP-exprimierenden HUVECs durchgeführt, wobei in diesem Experiment nach 6 Tagen mit den in Abschnitt 3.1.3.1 eingeführten speziesspezifischen Antikörpern anti-Ratten-MCT-1 und anti-hM sowie mit dem muskulären Marker anti-MyHC gefärbt wurde. Wie in der Referenzarbeit beschrieben, präsentierten sich 6 Tage nach Beginn der Co-Kultivierung EGFP-positive Zellen mit einem längs gestreckten kardiomyozytären Phänotyp und waren deutlich größer als HUVECs (vgl. Abb. 3.22). Morphologisch ergaben sich überwiegend Anzeichen für Apoptose. Weiterhin zeigten sich die grünfluoreszierenden Zellen positiv für MyHC, womit ihr myozytärer Charakter bestätigt werden konnte. In den speziesspezifischen Antikörperfärbungen wurden die EGFP-exprimierenden

Kardiomyozyten stets durch rattenspezifischen anti-MCT-1 (Abb. 3.22), nie jedoch durch Antikörper gegen humane mitochondriale Proteine erkannt.

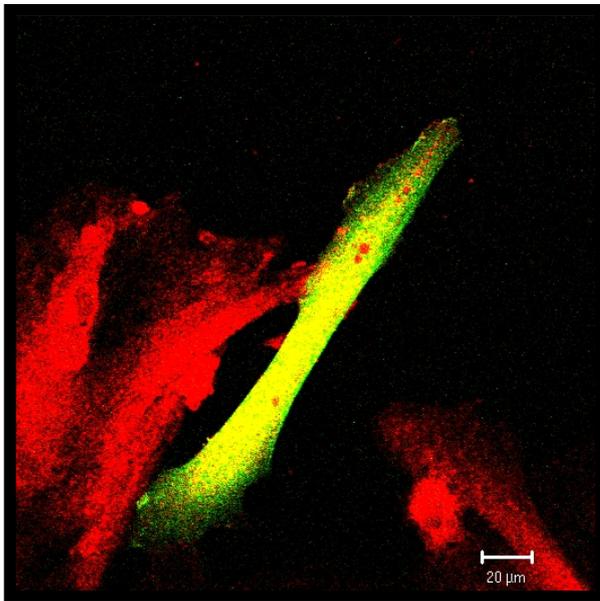


Abb. 3.22: Nach 6-tägiger Co-Kultivierung von neoKMs mit EGFP-positiven HUVECs wurden alle EGFP-exprimierenden Zellen (grün) durch rattenspezifische MCT-1-Antikörper (rot) erkannt.

Zusammenfassend konnte also in diesen Versuchen gezeigt werden, dass nach 6-tägiger Co-Kultivierung von neoKMs mit EGFP-positiven HUVECs grünfluoreszierende Ratten-Kardiomyozyten entstanden sind, während keine Zellen humanen Ursprungs mehr nachgewiesen werden können. Eine wie von *Condorelli et al. (2001)* postulierte Transdifferenzierung kann dementsprechend ausgeschlossen werden.

3.2.4 DNA-Transfer von ABs in neoKMs nach Co-Inkubation

In der Absicht, den durch die vorangegangenen Resultate dieser Arbeit implizierten EGFP-DNA-Transfer von HUVECs in neoKMs mittels ABs unmittelbar zu beweisen, wurden aus EGFP-exprimierenden HUVECs generierte ABs direkt mit neoKM-Kulturen inkubiert. Immunfluoreszenzfärbungen nach 4 Tagen zeigten EGFP-positive Kardiomyozyten, die durch rattenspezifische MCT-1-Antikörper erkannt wurden (Abb. 3.23).

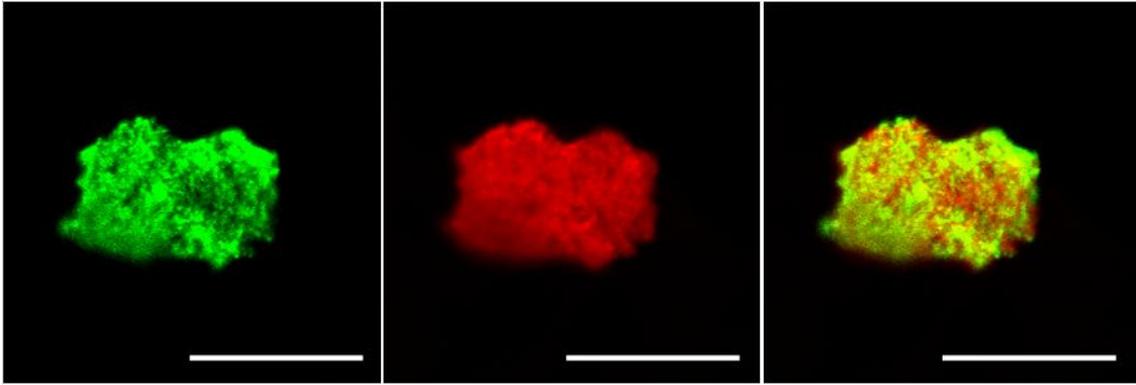


Abb. 3.23: EGFP-Gen-Transfer von ABs in neoKMs: Nach 4 Tagen Co-Inkubation von neoKMs mit EGFP-DNA-tragenden ABs exprimierten einige der Ratten-MCT-1-positiven (rot) neoKMs EGFP (grün). Rechts = Fusion der beiden nebenstehenden Bilder. (Balken entspricht 10 μ m)

Die Zellen waren positiv für MyHC und enthielten keine hM-Antigene. Die Transduktionsfrequenz lag bei ca. 10 EGFP-positiven neoKMs pro Versuchsansatz (Wachstumsfläche: 380 mm²; 25 000 neoKMs). Allerdings zeigten transduzierte Zellen morphologisch ein apoptotisches Erscheinungsbild, so dass in dieser *in vitro*-Situation von einem Zelluntergang und damit einer initial wohl höheren Transduktionsrate ausgegangen werden muss.

3.2.5 Apoptose EGFP-transduzierter Kardiomyozyten

Sollte die Hypothese zutreffend sein, dass die *in vitro* EGFP-transduzierten Kardiomyozyten apoptotisch wurden, so könnte dies entweder durch die Transduktion selbst oder durch die Co-Kulturbedingungen verursacht worden sein. Vor diesem Hintergrund wurden weitere Experimente mit veränderten Kulturbedingungen durchgeführt.

In einer Co-Kultur aus EGFP-HUVECs mit neoKMs zur Untersuchung der Zellüberlebensdauer waren nach 3 Tagen noch alle EGFP-exprimierenden Zellen anti-hM-positiv. Ab dem 5. Tag fanden sich die ersten transduzierten Kardiomyozyten mit bereits schlechter Morphologie und nach 10 Tagen konnten keine EGFP-positiven Zellen mehr detektiert werden. Eine Veränderung des

Verhältnisses neoKMs : HUVECs von 1 : 4 über 1 : 3 auf 1 : 1 erbrachte keine Verbesserung des Zellüberlebens.

Weiterhin wurden neoKMs-Kulturen vor Beginn der Co-Kultivierung mittels eines MACS[®]-Systems (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) von eventuell kontaminierenden Fibroblasten gereinigt. Aus demselben Grund wurden andere neoKMs mit Mitomycin C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Schließlich wurden Plastikplättchen anstelle der Glasplättchen als Zellanheftungsflächen in die 6-Loch-Zellkultur-Platten eingelegt.

In Zusammenfassung aller genannten Variationsversuche ergab sich keine experimentelle Bedingung, in der die EGFP-transduzierten neoKMs langfristig überlebten, so dass die Transduktion selbst als Apoptose-Induktor angenommen werden kann.

3.3 Direkter DNA-Transfer von ABs in Kardiomyozyten *in vivo*

Nachdem ein DNA-Transfer von HUVECs in neoKMs *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollte dieser Mechanismus auch *in vivo* untersucht werden. Von einer intrakoronaren Applikation allerdings wurde wegen der geringen Größe der ABs im Vergleich zum Gefäßlumen und wegen der nicht zu erwartenden transendothelialen Migration der ABs abgesehen. Um dennoch die Situation nach Migration und Apoptose von EGFP-HUVECs zu simulieren, wurden aus drei konfluent mit EGFP-exprimierenden HUVECs bewachsenen Zellkultur-Petrischalen (100 × 20 mm) ABs hergestellt und direkt in das linksventrikuläre Myokard injiziert. Mikroskopische Untersuchungen des Ratten-Myokards nach 1, 3 und 7 Tagen erbrachten jedoch keinen Nachweis grünfluoreszierender Zellen.

Dies bedeutet nicht, dass kein EGFP-DNA-Transfer von ABs in Ratten-Kardiomyozyten stattgefunden hat. Da nur ein Teil der ABs in den

Injektionslakunen in unmittelbaren – wahrscheinlich infolge der Bewegung der Injektionsflüssigkeit nicht dauerhaften – Kontakt mit ihren myokardialen Zielzellen kommen konnte, ist von einer allenfalls sehr geringen Transduktionsrate auszugehen. Die durchgeführte Intervention stellt darüber hinaus sicherlich einen bedeutenden Inflammationsreiz dar. Eine Abräumung der frisch transduzierten Kardiomyozyten oder der ABs selbst durch attrahierte Makrophagen ist dementsprechend denkbar.

4 DISKUSSION

4.1 Intrakoronare HUVEC-Transplantation in der Ratte

4.1.1 Alternative Transplantationsverfahren

Um Zellen in das Myokard von Nagern zu transplantieren, sind in der Literatur Verfahren der systemischen, der intramyokardialen sowie der intrakoronaren Applikation beschrieben worden. Diese werden im Folgenden diskutiert.

Der systemischen Applikationsmethode mangelt es vor allem an Effektivität, d.h. einen hohen Prozentsatz der applizierten Zellen dauerhaft im Myokard zu deponieren. *Aicher et al. (2003)* quantifizierten sowohl die intravenöse als auch die intraventrikuläre EPC-Applikation in der Ratte und erzielten – gemessen an der Gesamtzahl eingesetzter Zellen – nur 1% bzw. 3% intrakardiale Graftdeposition. Eine Rattenversuchsreihe von *Brenner et al. (2004)* zur intraventrikulären Applikation ¹¹¹Indium-Oxin-markierter Hämatopoetischer Progenitorzellen ergab für Tiere mit zuvor induziertem Myokardinfarkt nur 1% der verabreichten Zellen im Herzen, während der Wert für die nicht-infarzierte Kontrollgruppe noch geringer war.

Die intramyokardiale Applikation ist ein äußerst invasives Verfahren, das zumeist einer Thorakotomie bedarf. Darüber hinaus werden die Zellen im Myokard in einen suspensionsgefüllten Injektions-Hohlraum platziert. In diesem Depot herrscht ein großer Diffusionsgradient von Sauerstoff und Substraten und die meisten der Transplantatzellen haben keinen Kontakt zu umliegenden Kardiomyozyten. Der überwiegende Teil der Zellen im Depot stirbt daher wahrscheinlich ab.

In Bezug auf Zelltransplantationstechniken mittels eines transluminalen Katheters liegen für Nager nur wenige Arbeiten vor. *Suzuki et al. (2000)* konnten die verwendeten Skelettmuskelzellen erst nach Entnahme von Rattenherzen intrakoronar in diese transplantieren. Das Studienprotokoll sah weiterhin die heterotope Implantation der Herzen in Empfängerratten vor. Ein

derart invasives Verfahren ist sicherlich nicht geeignet, um den Stellenwert in orthotope Herzen applizierter Zellen für die Regeneration geschädigten Myokards zu beurteilen. Für die Verabreichung von Myoblasten in Rattenherzen beschrieben *Suzuki et al. (2004)* ein retrograd intrakoronares Applikationsverfahren, durch das 10 min nach Intervention 31% der eingesetzten Zellen im Herzen platziert waren.

4.1.2 Etablierung eines intrakoronaren Applikationsverfahrens

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie eine katheter-basierte antegrad intrakoronare Applikationstechnik etabliert, die wesentliche Vorteile aufweist:

- I. Die Verwendung zweier perkutaner transluminaler Ballonkatheter ist ein minimal invasives Verfahren mit einer Letalitätsrate deutlich unter 10%.
- II. Sowohl SPECT-Untersuchungen als auch die Mikroskopie serieller Myokard-Schnitte ergaben, dass 18% der eingesetzten Zellen stabil in das Myokard transplantiert werden konnten.
- III. Die intrakoronare Applikation resultiert in einer homogenen Verteilung der Zellen über das ganze Herz.

Für den im Vergleich zu anderen Studien hohen Prozentsatz kardial deponierter Zellen gibt es neben der Verwendung der speziellen intrakoronaren Applikationstechnik noch zwei andere Erklärungsansätze. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass die HUVECs, deren Durchmesser im trypsinierten Zustand ca. 20 µm beträgt, die mit 4 µm (vgl. *Hauck et al., 2004*) deutlich kleineren myokardialen Kapillaren embolisiert oder zumindest nur sehr langsam passiert haben. Außerdem könnte die Trypsinierung der Zellen zwecks Ablösung aus den Zellkulturschalen gemäß *Mackie et al. (2002)* Protease-aktivierte Rezeptoren (bevorzugt PAR-2) dazu angeregt haben, ihren N-Terminus zu verändern, wodurch zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt

worden sein könnten. Beide Effekte können die transendotheliale HUVEC-Migration erleichtert haben.

In Anbetracht der hohen Zahl der über das Koronarsystem transplantierten Zellen stellt sich die Frage, ob es möglicherweise zu Mikroinfarkten gekommen ist. In der Tat berichteten *Freyman et al. (2006)* nach intrakoronarer MSC-Transplantation in Schweineherzen über einen deutlich reduzierten koronaren Blutfluss. Eine mögliche Erklärung ist die von *Vulliet et al. (2004)* nach intrakoronarer MSC-Verabreichung in Hunde beschriebene Mikroinfarzierung des Myokards durch das Graftmaterial. *Bhakta et al. (2006)* hingegen, die die intrakoronare BMC-Transplantation in Schweine als sicher und effektiv bezeichnen, konnten keine erhöhten Troponin I-Spiegel und keine makroskopischen oder histopathologischen Korrelate für myokardiale Infarzierung feststellen. Auch große klinische Studien von *Assmus et al. (2002)* und *Wollert et al. (2004)* ergaben keine Anzeichen für Mikroinfarkte, signifikante Inflamationsprozesse oder maligne Arrhythmien bei intrakoronar zelltransplantierten Patienten. Hierzu muss bedacht werden, dass die klinisch verwendeten Zellen deutlich kleiner sind als *in vitro*-kultivierte MSCs.

Um der Antwort auf die Frage nach eventuellen Mikroinfarkten näher zu kommen, ist ein Vergleich mit Microsphere-Experimenten hilfreich. *Stanek et al. (1983)* berichteten nach Infusion von etwa 5 Millionen Microspheres (Durchmesser ca. 15 µm) pro kg Ratten-Körpergewicht keine signifikanten hämodynamischen Alterationen. Bei vergleichbarem Graftdurchmesser und deutlich geringerer Applikationsmenge in der vorliegenden Studie lässt sich der Anteil der durch HUVEC-Embolisation verschlossenen Kapillaren auf höchstens 1,3% aller Kapillaren abschätzen. Dies korreliert gut mit der echokardiographisch nach Transplantation unveränderten LV-Funktion sowie der Abwesenheit nekrotisierter Kardiomyozyten im mikroskopischen Bild. Eine relevante transplantationsassoziierte Myokardischämie kann also ausgeschlossen werden.

Die in den Transplantationsversuchen durch die Verabreichung immunogener Zellen notwendige immunsupprimierende Therapie mit CsA hatte keine nennenswerten Auswirkungen auf Zellidentität und -integrität, führte aber zu einem Körpergewichtsverlust der Versuchstiere, der sich in erster Linie durch generalisierten Flüssigkeitsmangel erklären lässt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die intrakoronare HUVEC-Applikation mittels zweier Ballonkatheter im Rattenmodell ein minimal invasives Verfahren darstellt, mit dem Zellen sicher und effektiv in das Herz transplantiert werden können.

4.2 HUVECs transdifferenzieren sich nicht in Kardiomyozyten

4.2.1 Transdifferenzierungsberichte in der Literatur

In Bezug auf myokard-regenerierendes Potenzial transplanteder Zellen wurde in der Literatur Transdifferenzierung als zugrunde liegender Mechanismus diskutiert. Eine Studie von *Orlic et al. (2001)* postulierte, dass sich intramyokardial applizierte BMCs in Kardiomyozyten transdifferenzieren und an der Regeneration infarzierten Myokards mitwirken.

Auch für Endothelzellen liegen einige Transdifferenzierungsberichte vor. Unter diesen befinden sich die Arbeiten von *Badorff et al. (2003)* bzw. *Pesce et al. (2003)*, die die Transdifferenzierung von EPCs *in vitro* in Kardiomyozyten bzw. *in vivo* in Skelettmuskelzellen beschreiben. *Arciniegas et al. (1992)* und *Frid et al. (2002)* beobachteten, wie sich sogar reife aortale Endothelzellen *in vitro* TGF β 1-abhängig (Transforming Growth Factor) in glatte Muskelzellen transdifferenzierten. Von *Ishisaki et al. (2003)* wurde die *in vitro* durch Entzug von FGF-1 induzierte Umwandlung von kultivierten HUVECs in glatte

Muskelzellen beschrieben. Es ist festzustellen, dass die für Transdifferenzierung sprechenden Befunde stets seltene Ereignisse waren.

In einer Arbeit von *Condorelli et al. (2001)* wurden EGFP-exprimierende HUVECs mit neoKMs co-kultiviert. Aus der Beobachtung EGFP-positiver Zellen, die gleichzeitig kardiomyozytäre Marker aufwiesen, schlossen die Experimentatoren auf eine Transdifferenzierung der HUVECs in Kardiomyozyten.

4.2.2 Transdifferenzierungs- und Fusionspotenzial der HUVECs

Eigene Versuche legten zunächst ebenfalls den Schluss nahe, dass sich HUVECs in Kardiomyozyten transdifferenzieren können. Sowohl in Co-Kulturen von EGFP-positiven HUVECs mit neoKMs als auch nach intrakoronarer EGFP-HUVEC-Transplantation konnten EGFP-positive Zellen gefunden werden, deren Morphologie und Expressionsmuster Kardiomyozyten entsprachen. Die immunhistochemische Auswertung der Transplantationsexperimente mit speziesspezifischen Antikörpern zeigte jedoch, dass 3 Tage nach Transplantation alle EGFP-positiven Zellen positiv für Rattenmarker waren, während in diesen Zellen keine humanen Proteine nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus sind Kardiomyozyten erheblich größer als HUVECs, so dass im Falle einer Transdifferenzierung ein enormes Zellwachstum in nur 3 Tagen stattgefunden haben müsste. Weiterhin ist es angesichts des kurzen Zeitintervalls kaum vorstellbar, dass sich die Zellen so gut in das Myokard integriert haben. Bei der unter den Bedingungen der Experimente von *Condorelli et al. (2001)* durchgeführten Co-Kultivierung von HUVECs mit neoKMs bestätigte sich nach 6tägiger Versuchslaufzeit, dass alle EGFP-exprimierenden Zellen zwar phänotypisch Kardiomyozyten waren, jedoch nur Ratten- und keine humanen Marker exprimierten. Im Licht der dargelegten Resultate ist eine Transdifferenzierung von HUVECs in Kardiomyozyten ausgeschlossen. Diese These steht im Einklang mit neueren Ergebnissen von *Murry et al. (2004)*, *Balsam et al. (2004)* und *Gruh et al. (2006)*, die für BMCs bzw. EPCs keine Transdifferenzierung in Kardiomyozyten nachweisen konnten.

Eine naheliegende Möglichkeit, um das Auftreten EGFP-positiver Kardiomyozyten zu erklären, wäre die Fusion mit HUVECs. Diese Interpretation setzt voraus, dass nach der Fusion zunächst Zellen mit zwei Kernen existierten. Da jedoch in keiner Versuchsreihe zwei Nuclei in ein und derselben grün fluoreszierenden Zelle detektiert werden konnten und humane Proteine zwar in unmittelbarer Nähe zu den EGFP-positiven Zellen interstitiell, nie aber intrazellulär zu beobachten waren, ist eine Fusion zwischen HUVECs und Kardiomyozyten ebenfalls auszuschließen. Zusätzlich gestützt wird diese Tatsache durch die Feststellung, dass die EGFP-Expression in den Kardiomyozyten nach Transplantation bzw. Co-Kultur intensiver war als in den wesentlich kleineren HUVECs zuvor. Eine bloße Zellfusion mit Vermischung zytoplasmatischer Proteine hätte zu allenfalls schwach EGFP-positiven Zellen führen müssen.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass sich EGFP-exprimierende HUVECs weder *in vivo* noch *in vitro* in Kardiomyozyten transdifferenzieren und auch nicht mit diesen fusionieren.

4.3 Horizontaler EGFP-Transfer von HUVECs in Kardiomyozyten

Ein weiterer Mechanismus, der nach Transplantation bzw. Co-Kultur zu EGFP-positiven Kardiomyozyten geführt haben könnte, ist der direkte EGFP-Transfer von HUVECs in Ratten-Kardiomyozyten. Prinzipiell ist es vorstellbar, dass entweder eine nur kurzwirksame Protein- oder mRNA-Weitergabe oder ein DNA-Transfer stattfindet, durch den das EGFP-codierende Gen in das Genom der Empfängerzelle integriert wird.

4.3.1 Protein-Transfer

Eine Möglichkeit, die das Vorliegen von EGFP in Kardiomyozyten nach Kontakt mit EGFP-positiven HUVECs erklären könnte, ist der Transfer von EGFP-Proteinen aus den HUVECs in die Kardiomyozyten. Hierfür müsste eine Zellinteraktion stattgefunden haben, die einen Protein-Transfer ermöglicht hätte. *Onfelt et al. (2004)* konnten zeigen, dass aus der Zelloberfläche stammende Nanotubes verschiedene Zelltypen miteinander verbinden und GPI-verankerte (Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol) Proteine sowie MHC-Klasse I-Proteine (Major Histocompatibility Complex) transportieren können. *Rustom et al. (2004)* beschrieben diesen Weg u.a. auch für Actin-EGFP, konnten ihn für freies EGFP allerdings nicht verifizieren. Eine Studie durch *Koyanagi et al. (2005)* zeigte einen statistisch seltenen GFP-Transfer von adenoviral transduzierten neoKMs in EPCs via Nanotubes, nicht jedoch in die umgekehrte Richtung.

Eigene mikroskopische Begutachtungen erbrachten *in vivo* wie *in vitro* keinen Hinweis auf Nanotubes zwischen HUVECs und Ratten-Kardiomyozyten. Der Transfer von EGFP lediglich auf Proteinebene würde auch nicht erklären, weshalb die deutlich größeren Kardiomyozyten eine so intensive Grünfluoreszenz zeigten. Dieser Befund spricht dafür, dass in den Empfängerzellen EGFP-Amplifikation stattgefunden haben muss.

4.3.2 Nukleinsäuren-Transfer via ABs

Eine EGFP-Amplifikation in den Empfängerzellen setzt den Transfer von EGFP-codierenden Nukleinsäuren in die Kardiomyozyten voraus. Es stellt sich nun die Frage, auf welchem Weg die EGFP-Gene zwischen den Zellen ausgetauscht wurden.

Ein Hinweis findet sich in der Tatsache, dass die HUVEC-Transplantation Apoptosevorgänge in den deponierten Zellen auslöste: 24 h nach Zelltransplantation fanden sich in den HUVECs erhöhte Aktivitätslevel des Apoptose-Schlüsselenzyms Caspase-3, während ein Aktivitätsminimum des Apoptose-Gegenspielers Akt1 / PKB α nachweisbar war. Außerdem spricht das

nach 3 Tagen dokumentierte Fehlen von Zellen, die positiv für humane Proteine sind, für einen Untergang der applizierten HUVECs.

Im Zusammenhang mit Apoptose gibt es nun einen beschriebenen Mechanismus, der den DNA-Transfer verursacht haben kann. *Holmgren et al. (1999)* berichteten, dass apoptotische Zellen Apoptotische Körperchen (ABs) abschnüren können, die von anderen Zellen aufgenommen werden. Da in den Empfängerzellen DNA bzw. mRNA aus der apoptotischen Zelle entdeckt wurden, mussten diese durch die ABs transportiert worden sein. *Bergsmedh et al. (2001)* beobachteten sogar den Transport ganzer Chromosomen bzw. derer Fragmente durch ABs. In einer Arbeit von *Hristov et al. (2004)* wurde Apoptose in HUVECs ausgelöst. Die daraufhin gebildeten ABs regten EPCs zu Proliferation und Differenzierung an.

Da also ABs in der vorliegenden Studie grundsätzlich als DNA-Transportvehikel in Frage kamen, musste nun nur noch gezeigt werden, dass speziell aus EGFP-HUVECs generierte ABs in der Lage sind, das EGFP-Gen in Kardiomyozyten zu transferieren. Zuerst wurde daher durch Nukleinsäurefärbungen und PCR gezeigt, dass die im Überstand einer Kultur apoptotischer, EGFP-exprimierender HUVECs enthaltenen ABs das EGFP-Gen enthielten. Wurden neoKMs mit diesen inkubiert, präsentierten sich einige der Zellen intensiv positiv für EGFP.

Für den direkten horizontalen Gen-Transfer von HUVECs in Kardiomyozyten kann somit folgende Sequenz postuliert werden:

- I. Apoptose der EGFP-HUVECs mit
- II. Bildung von EGFP-DNA-tragenden ABs
- III. Aufnahme der ABs durch umliegende Kardiomyozyten
- IV. Proteinbiosynthese des EGFP-Proteins in den Kardiomyozyten

Dass die ABs neben EGFP-DNA auch EGFP-mRNA in die Kardiomyozyten transferiert haben könnten, konnte nicht falsifiziert werden. Da jedoch dieser

Mechanismus alleine kaum die in den Kardiomyozyten im Vergleich zu den kleineren EGFP-HUVECs deutlich intensivere Fluoreszenz erklären könnte, spielt er allenfalls eine untergeordnete Rolle.

Blomer et al. (2005) veröffentlichten, dass in Co-Kulturen mit lentiviral transduzierten Zellen kontaminierende Lentiviren ein Marker-Gen auch in die zweite beteiligte Zelllinie direkt transduzieren können. Dies kann zu falscher Ergebnisinterpretation führen. Für die Versuche der vorliegenden Studie wurden die HUVECs, die mit EGFP-Gen-tragenden Lentiviren transduziert worden waren, nicht unmittelbar verwendet, sondern erstens extensiv gewaschen und zweitens einmalig passagiert, bevor sie Experimenten zugeführt wurden. Außerdem bemerkten *Blomer et al. (2005)* eine Abnahme der lentiviralen Infektiosität nach mehrstündiger Inkubation bei 37°C. Dass die transduzierten HUVECs im Rahmen dieser Dissertationsarbeit zwecks Passagierung sogar mehrere Tage in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden, macht es zusätzlich unwahrscheinlich, dass unbeabsichtigt virale Transduktion die Ergebnisse verfälscht haben könnte.

Die dargelegten *in vitro*-Daten liefern erstmals den starken Hinweis für horizontalen Gen-Transfer von HUVECs in Kardiomyozyten via ABs. Derselbe Mechanismus findet offensichtlich nach intrakoronarer Transplantation EGFP-exprimierender HUVECs in den Rattenorganismus statt und resultiert in grünfluoreszierenden Kardiomyozyten.

4.3.3 Mögliche Apoptose-Auslöser

Intrakoronar transplantierte HUVECs wurden im Anschluss an ihre intramyokardiale Migration apoptotisch. Als Ursache kommt die Immunogenität der applizierten humanen Zellen in der Ratte in Frage, welche trotz CsA-Therapie eine Immunreaktion gegen das Transplantat entwickelt haben könnte.

Darüber hinaus waren die HUVECs im myokardialen Gewebeverband für diese Zellen unphysiologischen Scherkräften ausgesetzt, was ebenfalls zu Apoptose führen kann.

Auffällig ist, dass Kardiomyozyten, die mit EGFP-DNA transduziert wurden, auch apoptotisch wurden: Der *in vitro* beobachtete Zelluntergang von neoKMs, die nach AB-Inkorporation EGFP exprimierten, deckt sich in diesem Zusammenhang mit dem *in vivo*-Ergebnis, dass 21 Tage nach Transplantation keine EGFP-positiven Zellen mehr nachgewiesen wurden.

Eine mögliche Erklärung für den programmierten Zelltod der Kardiomyozyten beruht auf der Überlegung, dass sie via ABs neben dem EGFP-Gen sicherlich auch eine Vielzahl anderer speziesfremder HUVEC-Gene erhalten haben. Angesichts dieser Annahme lässt sich für die *in vivo*-Experimente nicht ausschließen, dass die Ratten-Kardiomyozyten aufgrund des inkorporierten allogenen Genmaterials Oberflächenmoleküle exprimierten, welche das Immunsystem der Ratte dazu veranlassten, diese Zellen zu vernichten. Für die *in vitro*-Versuche kann vermutet werden, dass die in die Ratten-neoKMs aufgenommene humane HUVEC-DNA in den neoKMs – u.U. durch nicht-transduzierte neoKMs aus dem angrenzenden Zellverband getriggert – ein Apoptoseprogramm induzierte.

Zelltoxische Einflüsse von EGFP auf die exprimierenden neoKMs sind als Ursache denkbar aber unwahrscheinlich, da maximal ein EGFP-Gen pro transduzierter HUVEC vorlag und in dieser keine vermehrte Zelltoxizität im Sinne von Zelltod-Induktion beobachtet werden konnte.

Angesichts der Beobachtung, dass *in vivo* 3 Tage nach HUVEC-Transplantation bereits nur noch Ratten-Kardiomyozyten EGFP exprimierten, diese nach 7 Tagen immer noch existierten und erst nach 21 Tagen nicht mehr nachgewiesen werden konnten, stellt sich die Frage, warum die Apoptose erst so spät eingesetzt hat. An dieser Stelle können Ergebnisse von *Bergsmedh et*

al. (2002) in Betracht gezogen werden. Die Arbeitsgruppe berichtete, dass via ABs transferierte DNA in den Empfängerzellen nur nach vorangegangener Ausschaltung des Zellzyklus-Arrest-induzierenden p21-Gens dauerhaft abgelesen wurde. In nicht-defizienten – also p21-kompetenten – Zellen aktivierte p53 das p21-Gen und das transferierte Gen wurde nur temporär transkribiert. Denkbar ist demnach, dass die Ratten-Kardiomyozyten das integrierte EGFP-Gen als DNA-Schädigung interpretierten und durch p21-Aktivierung Zeit für die DNA-Reparatur gewannen. Erst nach längeren, ergebnislosen Reparaturversuchen wäre dann die Apoptose der Zellen eingeleitet worden.

Schwer verständlich ist, weshalb Kardiomyozyten überhaupt ABs aufnehmen und damit eine Form phagozytotischer Aktivität zeigen. Schließlich birgt dieser Mechanismus die Möglichkeit, dass z.B. Onkogene (vgl. *Bergsmedh et al., 2001*) oder virale Nukleinsäuren (vgl. *Spetz et al., 1999*) aus einer befallenen apoptotischen Zelle in noch gesunde Zellen übertragen werden.

4.4 Ausblick

4.4.1 EGFP als potenzieller Distraktor

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch Einsatz des Zellmarkers EGFP Transdifferenzierung von HUVECs in Kardiomyozyten vorgetäuscht werden kann. In weiteren Zelltransplantationsstudien und Co-Kultivierungen sollte daher bedacht werden, dass die Detektion von EGFP alleine keine Aussage über das Schicksal der ursprünglich mit dem EGFP-Gen transduzierten Zelle zulässt. Vielmehr muss gerade bei Untersuchungen zum Transdifferenzierungs- und Fusionierungsverhalten von Zellen die Möglichkeit des horizontalen Gen-Transfers via ABs in Erwägung gezogen werden. Da dies selbstverständlich nicht nur für EGFP gilt, sondern für wahrscheinlich alle im

Genom einer apoptotischen Zelle existenten DNA-Sequenzen, können alle Veränderungen des zellulären Proteinexpressionsmusters infolge von Zelltransplantationen oder Co-Kultivierungen indirekter Natur sein.

4.4.2 Transdifferenzierung und Myokardregeneration

Transdifferenzierung transplanteder Zellen als möglicher Mechanismus zur Myokardregeneration war in den vergangenen Jahren Gegenstand zahlreicher Analysen. Vielversprechenden Transdifferenzierungsbeobachtungen, wie der von *Orlic et al. (2001)*, folgten z.B. Arbeiten von *Balsam et al. (2004)* sowie von *Murry et al. (2004)*, die diese Ergebnisse unter gleichen Bedingungen nicht reproduzieren konnten. Die Resultate der vorliegenden Arbeit weisen ebenfalls darauf hin, dass Zelltransdifferenzierung in Transplantationsstudien zukünftig äußerst kritisch zu betrachten ist.

Selbst wenn Transdifferenzierung applizierter Zellen berichtet wurde, handelte es sich zumeist – gemessen an der Zellzahl des Gesamtmyokards – um seltene Ereignisse. Dass diese vereinzelt Transdifferenzierungen signifikante Einflüsse auf die kardiale Pumpfunktion haben könnten, erscheint eher unwahrscheinlich.

Als Ursache gerade für die in einigen klinischen Studien beobachteten Verbesserungen der Hämodynamik (vgl. u.a. *Strauer et al., 2002; Schachinger et al., 2004; Wollert et al., 2004*) sind vermutlich eher parakrine Effekte zu nennen. Diese konnten in tierexperimentellen Arbeiten von u.a. *Merx et al. (2005), Nishida et al. (2003)* und *Fuchs et al. (2001)* nachgewiesen werden.

Um die Mechanismen möglicher Myokardregeneration nach Zelltransplantation genauer zu analysieren, bedarf es weiterer tierexperimenteller Studien. Als Versuchstiere bieten sich Nager u.a. wegen ihrer kurzen Generationszeit und der einfachen, platzsparenden Haltung an. Das in dieser Arbeit genutzte minimal invasive, intrakoronare Katheter-Applikationsverfahren eignet sich aufgrund homogener, effektiver und stabiler Graftdeposition im Herzen für derartige Studien.

Damit eine sichere Anwendung der gefundenen Zelltherapieoptionen am Menschen ermöglicht werden kann, bedarf es eines tiefen Verständnisses darüber, wie die Entwicklung regenerativer Effekte durch die transplantierten Zellen gesteuert werden kann, bzw. wie schädliche Wirkungen zu verhindern sind. In diesem Zusammenhang muss auch auf die Differenzierung applizierter Zellen in nicht gewünschte Zelllinien mit u.U. malignem Potenzial sowie auf die Induktion maligner Arrhythmien geachtet werden. In der Absicht Arrhythmien zu verhindern, ist es neben der Wahl des richtigen Graftmaterials essentiell, das Applikationsverfahren und eine eventuelle *in vitro*-Vorbehandlung der Zellen so zu wählen, dass ihre Integration in den myokardialen Gewebeverband zu physiologisch funktionierendem Herzmuskelgewebe führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen jedoch den Schluss nahe, dass durch Fehldifferenzierung oder Zellgenomveränderungen verursachte Nebenwirkungen einer Zelltransplantation durch körpereigene Reparatursysteme verhindert werden. Dies zeigte sich z.B. darin, dass die Ratte auf die Veränderung des Kardiomyozyten-Genoms durch Integration des EGFP-Gens aus apoptotischen EGFP-exprimierenden HUVECs selbst mit der Apoptose der betroffenen Kardiomyozyten reagierte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Publikationen der vergangenen Jahre haben nahegelegt, dass sich Endothelzellen in Kardiomyozyten transdifferenzieren können. In der vorliegenden Studie wurde daher am Rattenmodell das Potenzial intrakoronar applizierter humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs) zur *in vivo*-Transdifferenzierung in Kardiomyozyten untersucht.

Zuerst wurde ein minimal-invasives, katheter-basiertes Verfahren zur effektiven intrakoronaren Zellapplikation in Rattenherzen validiert. Durch immunhistochemische Färbungen mit speziesspezifischen Antikörpern konnte nach intrakoronarer Transplantation EGFP-exprimierender HUVECs gezeigt werden, dass HUVECs die myokardiale Endothelbarriere passieren, sich jedoch intramyokardial nicht in Kardiomyozyten transdifferenzieren oder mit diesen fusionieren, sondern programmiertem Zelltod unterliegen. Dass HUVECs auch *in vitro* keine myozytäre Transdifferenzierung eingehen, konnte in Co-Kultur mit neonatalen Kardiomyozyten (neoKMs) verifiziert werden.

Weiterführende Experimente bewiesen erstmals die Fähigkeit apoptotischer, EGFP-positiver HUVECs, Nukleinsäure-tragende Apoptotische Körperchen (ABs) zu bilden, welche sowohl in Co-Kultur von HUVECs mit neoKMs als auch bei Co-Inkubation AB-haltiger Suspension mit neoKMs von Kardiomyozyten inkorporiert wurden. Die in beiden Ansätzen nach 6 bzw. 4 Tagen beobachtete EGFP-Expression durch neoKMs lässt sich nur durch AB-vermittelten horizontalen Gen-Transfer von HUVECs in neoKMs plausibel erklären.

Da EGFP-markierte Zellen häufig eingesetzt werden, muss dieser Mechanismus in Versuchen zum Transdifferenzierungs- bzw. Fusionspotenzial von Zellen stets bedacht werden. Darüber hinaus ist die EGFP-Detektion im mikroskopischen Präparat – ohne weitere absichernde Befunde – nicht ausreichend, um das Schicksal von Zellen zu interpretieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L, Chang MG, Aon M, Xue T, Li RA, O'Rourke B, Marban E. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ. Res.* 2005; 97(2):159-167.
2. Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Leobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagege A, Samuel JL, Menasche P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44(2):458-463.
3. AHA Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2006 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006; 113(6):e85-e151.
4. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003; 107(16):2134-2139.
5. Anversa P, Nadal-Ginard B. Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature* 2002; 415(6868):240-243.
6. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J. Cell Sci.* 1992; 103(2):521-529.
7. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106(24):3009-3017.
8. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107(7):1024-1032.
9. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428(6983):668-673.
10. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(23):1750-1757.
11. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6):763-776.

12. Bergsmeth A, Szeles A, Henriksson M, Bratt A, Folkman MJ, Spetz AL, Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98(11):6407-6411.
13. Bergsmeth A, Szeles A, Spetz AL, Holmgren L. Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA. *Cancer Res.* 2002; 62(2):575-579.
14. Bhakta S, Greco NJ, Finney MR, Scheid PE, Hoffman RD, Joseph ME, Banks JJ, Laughlin MJ, Pompili VJ. The safety of autologous intracoronary stem cell injections in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J. Invasive Cardiol.* 2006; 18(5):212-218.
15. Blomer U, Gruh I, Witschel H, Haverich A, Martin U. Shuttle of lentiviral vectors via transplanted cells in vivo. *Gene Ther.* 2005; 12(1):67-74.
16. Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimaio JM, Srivastava D. Thymosin beta 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 2004; 432(7016):451-453.
17. Boor PJ, Reynolds, ES. A simple planimetric method for determination of left ventricular mass and necrotic myocardial mass in postmortem hearts. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977; 68(3):387-392.
18. Brasselet C, Morichetti MC, Messas E, Carrion C, Bissery A, Bruneval P, Vilquin JT, Lafont A, Hagege AA, Menasche P, Desnos M. Skeletal myoblast transplantation through a catheter-based coronary sinus approach: An effective means of improving function of infarcted myocardium. *Eur. Heart J.* 2005; 26(15):1551-1556.
19. Brenner W, Aicher A, Eckey T, Massoudi S, Zuhayra M, Koehl U, Heeschen C, Kampen WU, Zeiher AM, Dimmeler S, Henze E. 111In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *Cell Transplant.* 2004; 13(6):639-647.
20. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 2003; 8(4):345-352.
21. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 1994; 263(5148):802-805.
22. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Cardiol.* 2004; 94(1):92-95.
23. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M, Galli R, Balconi G, Follenzi A, Frati G, Cusella De Angelis MG, Gioglio L, Amuchastegui S, Adotini L, Naldini L, Vescovi A, Dejana E, Cossu G. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: Implications for myocardium regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98(19):10733-10738.

24. Cooper DK. Clinical xenotransplantation – How close are we? *Lancet* 2003; 362(9383):557-559.
25. Ding Z, Fach C, Sasse A, Goedecke A, Schrader J. A minimally invasive approach for efficient gene delivery to rodent hearts. *Gene Ther.* 2004; 11(3):260-265.
26. Dini L, Lentini A, Diez GD, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal-Vanaclocha F. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J. Cell Sci.* 1995; 108(3):967-973.
27. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 2006; 27(9):1114-1122.
28. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: In vitro analysis. *Circ. Res.* 2002; 90(11):1189-1196.
29. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, Weissman NJ, Leon MB, Epstein SE, Kornowski R. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 37(6):1726-1732.
30. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G, Satler LF, Smits PC, Okubagzi P, Baffour R, Aggarwal A, Weissman NJ, Cerqueira M, Waksman R, Serruys P, Battler A, Moses JW, Leon MB, Epstein SE. Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am. J. Cardiol.* 2006; 97(6):823-829.
31. Gray NA Jr., Selzman CH. Current status of the total artificial heart. *Am. Heart J.* 2006; 152(1):4-10.
32. Gruh I, Beilner J, Blomer U, Schmiedl A, Schmidt-Richter I, Kruse ML, Haverich A, Martin U. No evidence of transdifferentiation of human endothelial progenitor cells into cardiomyocytes after coculture with neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 2006; 113(10):1326-1334.
33. Hauck EF, Apostel S, Hoffmann JF, Heimann A, Kempfski O. Capillary flow and diameter changes during reperfusion after global cerebral ischemia studied by intravital video microscopy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; 24(4):383-391.
34. Hellermann JP, Jacobsen SJ, Redfield MM, Reeder GS, Weston SA, Roger VL. Heart failure after myocardial infarction: Clinical presentation and survival. *Eur. J. Heart Fail.* 2005; 7(1):119-125.
35. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.* 2001; 11(19):R795-R805.
36. Hiasa K, Egashira K, Kitamoto S, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, Zhao Q, Nagata S, Katoh M, Sata M, Takeshita A. Bone marrow mononuclear cell therapy limits myocardial infarct size through vascular endothelial growth factor. *Basic Res. Cardiol.* 2004; 99(3):165-172.

37. Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999; 93(11):3956-3963.
38. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, Yeung AC, Johnstone BH, Yock PG, March KL. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: Implications for current clinical trials. *Circulation* 2005; 112(9 Suppl.):I150-I156.
39. Hristov M, Erl W, Lindner S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004; 104(9):2761-2766.
40. Ishisaki A, Hayashi H, Li AJ, Imamura T. Human umbilical vein endothelium-derived cells retain potential to differentiate into smooth muscle-like cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(2):1303-1309.
41. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973; 52(11):2745-2756.
42. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: Double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367(9505):113-121.
43. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 95(15):8801-8805.
44. Kawaguchi AT, Suma H, Konertz W, Gradinac S, Bergsland J, Dowling RD, Komeda M, Kitamura S, Ohashi H, Chang BC, Linde LM, Batista RJ; International and Regional Registry Task Force, The Society for Cardiac Volume Reduction. Left ventricular volume reduction surgery: The 4th international registry report 2004. *J. Card. Surg.* 2005; 20(6):S5-S11.
45. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107(3):461-468.
46. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ. Res.* 2004; 94(5):678-685.
47. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation* 2000; 101(4):454-458.

48. Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes? *Circ. Res.* 2005; 96(10):1039-1041.
49. Kustikova OS, Wahlers A, Kuhlcke K, Stahle B, Zander AR, Baum C, Fehse B. Dose finding with retroviral vectors: Correlation of retroviral vector copy numbers in single cells with gene transfer efficiency in a cell population. *Blood* 2003; 102(12):3934-3937.
50. Leurs C, Jansen M, Pollok KE, Heinkelein M, Schmidt M, Wissler M, Lindemann D, von Kalle C, Rethwilm A, Williams DA, Hanenberg H. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic / severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum. Gene Ther.* 2003; 14(6):509-519.
51. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 1994; 89(1):345-354.
52. Mackie EJ, Pagel CN, Smith R, de Niese MR, Song SJ, Pike RN. Protease-activated receptors: A means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals. *IUBMB Life* 2002; 53(6):277-281.
53. Malinda KM, Goldstein AL, Kleinman HK. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J.* 1997; 11(6):474-481.
54. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 2003; 9(9):1195-1201.
55. Maniatis T, Jeffrey A, van de Sande H. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 1975; 14(17):3787-3794.
56. Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, Akazawa H, Molkenin JD, Kasanuki H, Komuro I. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J. Cell Biol.* 2004; 167(2):351-363.
57. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357(9252):279-280.
58. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41(7):1078-1083.
59. Merx MW, Zerneck A, Liehn EA, Schuh A, Skobel E, Butzbach B, Hanrath P, Weber C. Transplantation of human umbilical vein endothelial cells improves left ventricular function in a rat model of myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 2005; 100(3):208-216.

60. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: Eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113(10):1287-1294.
61. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 1987; 155:335-350.
62. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428(6983):664-668.
63. Nishida M, Li TS, Hirata K, Yano M, Matsuzaki M, Hamano K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann. Thorac. Surg.* 2003; 75(3):768-773.
64. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003; 100(21):12313-12318.
65. Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K, Davis DM. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J. Immunol.* 2004; 173(3):1511-1513.
66. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829):701-705.
67. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatta R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107(18):2294-2302.
68. Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V, Pompilio G, Bonanno G, Scambia G, Capogrossi MC. Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ. Res.* 2003; 93(5):e51-e62.
69. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 1992; 111(2):229-233.
70. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004; 303(5660):1007-1010.
71. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute

- myocardial infarction: Final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44(8):1690-1699.
72. *Schachinger et al. (2006a)*: Schachinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: Intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin. Res. Cardiol.* 2006; 95(1):13-22.
73. *Schachinger et al. (2006b)*: Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbusch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(12):1210-1221.
74. Schwarz ER, Pollick C, Meehan WP, Kloner RA. Evaluation of cardiac structures and function in small experimental animals: Transthoracic, transesophageal, and intraventricular echocardiography to assess contractile function in rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 1998; 93(6):477-486.
75. Scorsin M, Hagege AA, Marotte F, Mirochnik N, Copin H, Barnoux M, Sabri A, Samuel JL, Rappaport L, Menasche P. Does transplantation of cardiomyocytes improve function of infarcted myocardium ? *Circulation* 1997; 96(9 Suppl.):II188-II193.
76. Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanello DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2003; 21(6):661-669.
77. Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ. Res.* 1982; 50(1):101-116.
78. Spetz AL, Patterson BK, Lore K, Andersson J, Holmgren L. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J. Immunol.* 1999; 163(2):736-742.
79. Stanek KA, Smith TL, Murphy WR, Coleman TG. Hemodynamic disturbances in the rat as a function of the number of microspheres injected. *Am. J. Physiol.* 1983; 245(6):H920-H923.
80. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106(15):1913-1918.
81. Suzuki K, Brand NJ, Smolenski RT, Jayakumar J, Murtuza B, Yacoub MH. Development of a novel method for cell transplantation through the coronary artery. *Circulation* 2000; 102(19 Suppl. 3):III359-III364.
82. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Yacoub MH. Selective cell dissemination into the heart by retrograde intracoronary infusion in the rat. *Transplantation* 2004; 77(5):757-759.

83. Teichholz LE, Kreulen T, Herman MV, Gorlin R. Problems in echocardiographic volume determinations: Echocardiographic-angiographic correlations in the presence of absence of asynergy. *Am. J. Cardiol.* 1976; 37(1):7-11.
84. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(19 Suppl.):II247-II256.
85. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361(9351):47-49.
86. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363(9411):783-784.
87. Welikson RE, Kaestner S, Reinecke H, Hauschka SD. Human umbilical vein endothelial cells fuse with cardiomyocytes but do not activate cardiac gene expression. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2006; 40(4):520-528.
88. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364(9429):141-148.
89. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley SC Jr. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 2002; 106(10):1294-1299.
90. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ. Res.* 2004; 94(2):230-238.

7 PUBLIKATIONEN aus der vorliegenden Arbeit

7.1 Journal-Publikationen

Burghoff S, Ding Z, Gödecke S, Assmann A, Wirrwar A, Buchholz D, Sergeeva O, Leurs C, Hanenberg H, Müller HW, Bloch W, Schrader J. Horizontal gene transfer from human endothelial cells to rat cardiomyocytes after intracoronary transplantation. *Cardiovascular Research* 2008; 77:534–543.

7.2 Vorträge

1. Goettsch S. Human endothelial cells do not transdifferentiate in vivo. *Jahreskongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2005 in Göttingen.*
2. Goettsch S. Humane Endothelzellen transdifferenzieren sich in vivo nicht in Kardiomyozyten. *71. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2005 in Mannheim.*

7.3 Poster-Präsentationen

1. Goettsch S, Gödecke S, Ding Z, Assmann A, Bloch W, Fach C, Wirrwar A, Antke C, Müller HW, Schrader J. Minimally invasive transplantation of HUVECs via the coronary artery system of the heart. *Jahreskongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2004 in Leipzig.*
2. Goettsch S, Ding Z, Gödecke S, Assmann A, Wirrwar A, Antke C, Hanenberg H, Müller HW, Bloch W, Schrader J. Human umbilical vein endothelial cells do not transdifferentiate in vivo. *CardioVision der Nordrhein-Westfälischen Akademie der Wissenschaften 2004 in Düsseldorf.*
3. Goettsch S, Ding Z, Gödecke S, Assmann A, Bloch W, Wirrwar A, Buchholz D, Antke C, Leurs C, Hanenberg H, Müller HW, Schrader J. In vivo horizontal gene transfer from transplanted HUVEC into rat cardiomyocytes. *Jahreskongress der American Heart Association 2005 in Dallas.*
4. Assmann A, Goettsch S, Ding Z, Gödecke S, Wirrwar A, Antke C, Buchholz D, Homberg C, Hanenberg H, Müller HW, Bloch W, Schrader J. Horizontal gene transfer from HUVECs to rat cardiomyocytes via apoptotic bodies. *Internationaler Kongress des Stamzellnetzwerks NRW 2006 in Münster.*

8 DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Jürgen Schrader danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertationsschrift, für die Bereitstellung ideeller wie materieller Experimentalgrundlagen sowie für die Übernahme des Referats.

Herrn Professor Dr. Emmeran Gams danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. Sandra Goettsch danke ich für Anleitung und Betreuung der Experimente, für die Vermittlung wissenschaftlicher Versuchsplanung und für ihre unermüdliche Hilfe bei der Niederschrift dieser Arbeit.

Herrn Dr. Zhaoping Ding danke ich für die Isolierung neonataler Kardiomyozyten sowie für die Durchführung der Katheter-Experimente.

Frau Dr. Stefanie Gödecke danke ich für die Durchführung der HUVEC-Markierung mit EGFP.

Frau Susanne Küsters, Frau Daniela Haubs und im Besonderen Frau Dr. Barbara Emde danke ich für die labortechnische Einarbeitung und für die Unterstützung in den Versuchsdurchführungen.

Herrn Professor Dr. Wilhelm Bloch danke ich für die Zusammenarbeit bei der bzw. für die Durchführung verschiedener Antikörper-Färbungen.

Humane Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Geburtshilflichen Abteilung des Krankenhauses Benrath zur Verfügung gestellt.

Die SPECT-Messungen konnten freundlicherweise in Zusammenarbeit mit der Nuklearmedizinischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgen.

Die CsA-Spiegel konnten freundlicherweise in Zusammenarbeit mit dem Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestimmt werden.

Meiner Familie verdanke ich mehr als diese Seite zu fassen vermag.

9 CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 3. Mai 1981
Geburtsort: Fürstfeldbruck
Eltern: Dr.med. Regina Assmann und Dr.med. Rainer Assmann
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1987 – 1991 St.Nikolaus-Grundschule in Dormagen-Stürzelberg
1991 – 2000 Norbert-Gymnasium Knechtsteden
Abitur im Mai 2000

Zivildienst:

2000 – 2001 Onkologische Ambulanz der Universitätskinderklinik
Düsseldorf

Studium:

04 / 2001 – 06 / 2007 Studium der Medizin an der Universität Düsseldorf

04 / 2002 – 06 / 2007 Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes
04 / 2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02 / 2006 – 01 / 2007 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf
(Chirurgie, Innere Medizin, Anästhesiologie)

04 – 06 / 2007 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Dormagen, den 01. Juli 2007

Alexander Assmann