

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Kardiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg
vorm. Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Positronen-Emissions-Tomographie basiertes
In-vivo-Imaging
der initialen Retention
intramyokardial injizierter Stammzellen im Mausmodell**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Cajetan Immanuel Lang
aus Filderstadt
im Jahre 2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio
Prof. Dr. med. Wolfgang Thasler
Prof. Dr. med. Bernhard Kuch

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. rer. nat. Robert David

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2014

1. Einleitung	3
1.1. Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen.....	3
1.2. Kardiale Stammzelltherapie	5
1.2.1. Ursprung: Myoblasten	5
1.2.2. Knochenmarkstammzellen	5
1.2.3. Pluripotente Stammzellen.....	8
1.3. Schicksal und Überleben kardial transplantiertes Zellen.....	11
1.3.1. Grundlegende Mechanismen und Wirkung	11
1.3.2. Wirkmechanismen	14
1.3.3. Strategien zur Verbesserung der zellulären Retention im Myokard.....	15
1.4. Imaging des Zellschicksals	17
1.4.1. Einführung und Anforderungen	17
1.4.2. Zelluläre <i>In-vivo</i> -Bildgebung.....	18
1.5. Fragestellung der Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1. Material.....	24
2.1.1. Allgemeine Chemikalien	24
2.1.2. Proteine und Enzyme	24
2.1.3. Laborgeräte	25
2.1.4. Tiermodell.....	27
2.1.5. Zellkulturmaterialien.....	28
2.1.6. Zellen	29
2.1.7. Kultivierungsmedien	30
2.1.8. Oligonukleotide.....	30
2.2. Methoden.....	31
2.2.1. Zellkulturmethoden.....	31
2.2.2. Tiermodell.....	32
2.2.3. Radiomarkierung der Zellen mit [¹⁸ F]-Fluorodeoxyglucose (FDG)	34
2.2.4. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	35
2.2.5. RT-PCR.....	37

Inhaltsverzeichnis	2
2.2.6. Durchflusszytometrie.....	39
2.2.7. Versuchsaufbau.....	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Radiotoxizität der Radiomarkierung.....	43
3.2. Stabilität der Radiomarkierung	45
3.3. Quantitative und qualitative PET-Bildgebung.....	47
3.4. <i>Ex-Vivo</i> -Quantifizierung mittels qRT-PCR.....	51
3.5. Validierung der quantitativen PET-Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie	53
4. Diskussion	56
4.1. Das Mausmodell in der kardialen Stammzelltherapie	57
4.2. PET: Bildrekonstruktion	60
4.3. Stabilität der Radiomarkierung	61
4.4. Qualitative RT-PCR.....	62
4.5. Quantitative PET <i>In-vivo</i> -Bildgebung und Validierung mittels Durchflusszytometrie	63
5. Zusammenfassung	65
6. Publikationsliste	67
6.1. Fachzeitschriften	67
6.2. Kongressbeiträge	67
7. Danksagung	69
8. Abkürzungsverzeichnis	69
9. Literaturverzeichnis	73

1. Einleitung

1.1. Zelltherapie ischämischer Herzerkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen in den Industrienationen die häufigste Todesursache dar [78]. Aus den Daten des statistischen Bundesamtes geht hervor, dass allein die chronische ischämische Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz in 2011 fast 20% der Sterbefälle in Deutschland verursacht haben. Während allerdings die Sterblichkeit durch akuten Myokardinfarkt seit 1980 deutlich gesunken ist, steht die chronische ischämische Herzkrankheit als Folgeerkrankung seit 1992 an oberster Stelle der häufigsten Todesursachen.

Dies ist sowohl auf die Vielzahl effektiver Therapien kardiovaskulärer Erkrankungen als auch auf das steigende Alter der Durchschnittsbevölkerung zurückzuführen. Allerdings beginnt bereits kurz nach einem Herzinfarkt das sogenannte "Remodelling" des Herzens, wodurch trotz aller verfügbaren Therapien die Zahl an Herzinsuffizienz erkrankter Menschen steigt [44].

Nach einem Myokardinfarkt wird der nekrotische Herzmuskel innerhalb weniger Wochen durch nicht elastisches Narbengewebe ersetzt, welches progressiv dilatiert. Dies führt zu einer erhöhten Volumenbelastung des Ventrikels. Zusammen mit einer Verminderung der linksventrikulären systolischen Funktion, wird dadurch auch das nicht-infarzierte Myokard dilatiert. Zwar wird auf diese Weise ein suffizientes Schlagvolumen gewährleistet, allerdings auf Kosten einer erhöhten Wandbelastung, welche zu einer Hypertrophie und letztlich einer Herzinsuffizienz führt [5].

Durch interventionelle sowie pharmakologische Therapien ist es möglich, den Progress des Remodellings zu verlangsamen. Die Vernarbung des funktionalen Herzmuskelgewebes ist jedoch irreversibel. Die einzige kausale Therapie, die im Moment zu Verfügung steht, ist die allogene Herztransplantation.

Allerdings liegt die Zahl der über EUROTRANSPLANT verteilten Herzen deutlich unter jener der benötigten (*Abbildung 1*), sodass es zu langen Wartezeiten und im schlimmsten Fall einer verkürzten Lebensdauer kommt. Die kardiale Zellersatztherapie als mögliche weitere kausale Therapie stellt eine attraktive Alternative in Aussicht, welche jedoch für eine weitflächige klinische Anwendung noch optimiert und besser verstanden werden muss. Mit dem Ziel des Ersatzes infarzierten Gewebes steht unter anderem die Erzeugung funktionaler Herzzellen wie Kardiomyozyten, Endothelzellen und Zellen des

Reizleitungssystem aus embryonalen Stammzellen (ES) oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) im Fokus wissenschaftlichen Interesses. Bis zur klinischen Anwendung sind jedoch noch einige Hürden - sowohl medizinischer als auch ethischer Natur - zu überwinden. Eine wichtige Voraussetzung für die sichere Anwendung der kardialen Stammzelltherapie ist das Verständnis des Schicksals der Zellen nach Transplantation im Zielgewebe und deren Interaktion mit letzterem. Eine unabdingbare Voraussetzung diese Vorgänge am Menschen zu erforschen, sind sichere Methoden in der zellulären *In-vivo*-Bildgebung, um die applizierten Zellen nach der Transplantation longitudinal verfolgen zu können.

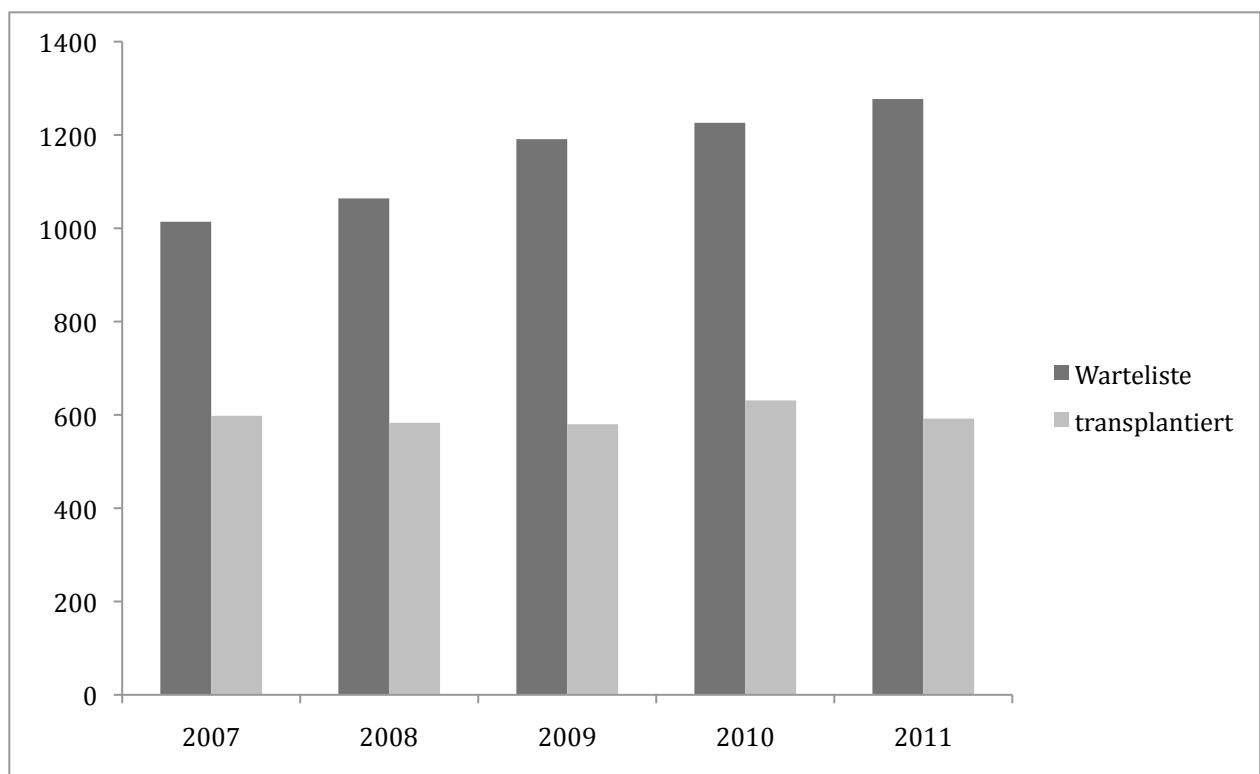


Abbildung 1: Bedarf und Verfügbarkeit von Spenderherzen (Eurotransplant)

1.2. Kardiale Stammzelltherapie

1.2.1. Ursprung: Myoblasten

Von der Vision getragen untergegangenes Myokard durch transplantierte Zellen zu ersetzen wurden 1992 von Marelli et al. erstmals Myoblasten (im Hundemodell) autolog intramyokardial nach Herzinfarkt transplantiert [83]. In den folgenden Jahren wurde diese therapeutische Option vielfach in Tiermodellen untersucht [27, 70, 125].

Grundlage dieses therapeutischen Ansatzes war die Überlegung, dass Skelettmuskelgewebe durch Myoblasten regeneriert werden kann, während ischämisches Myokard irreversibel geschädigt bleibt [18, 27]. Die Wirksamkeit kardialer Zelltherapie mit Myoblasten konnte in mehreren präklinischen Studien [40] gezeigt werden. Myoblasten weisen zudem ideale Eigenschaften, wie autologe Verfügbarkeit, einfache *In-vitro*-Expansion, ausschließliche Differenzierung zu Muskelfasern und Widerstandsfähigkeit gegenüber Ischämie auf. Daraufhin wurden 2001, von Menasché et al. erstmals einem Patienten mit refraktärer Herzinsuffizienz autolog gewonnene Myoblasten im Rahmen einer koronaren Bypassoperation intramyokardial transplantiert [88]. Die ursprüngliche Hoffnung, dass die transplantierten Myoblasten im Myokard milieu-abhängig zu Kardiomyozyten differenzieren und sich ins Empfängergewebe integrieren würden, wurde jedoch bald widerlegt [76, 107, 108].

Trotz dieser Rückschläge wurden Myoblasten zur Therapie der ischämischen Kardiomyopathie unter anderem in der randomisierten, multizentrischen klinischen Studie "MAGIC" ausführlich untersucht [87]. Die Studie zeigte jedoch, dass die Behandlung mit autologen Myoblasten die Herzfunktion nicht verbessert und sogar das Auftreten von Arrhythmien begünstigt.

1.2.2. Knochenmarkstammzellen

Knochenmarkstammzellen (BMSCs) enthalten verschiedene Populationen adulter Stammzellen, darunter die vielfach verwendeten Mesenchymalen Stammzellen (MSCs) und Hämatopoetische Stammzellen (HSCs).

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind eine Stammzellsubpopulation aus dem Knochenmarkstroma. Aufgrund ihrer Eigenschaft in Kulturschalen adhärent zu wachsen können sie von HSCs separiert werden [2].

1.2.2.1. Mesenchymale Stammzellen

Nachdem es Makino et al. 1999 erstmals scheinbar gelungen war *in-vitro* aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark Kardiomyozyten zu generieren [80], kam die Hoffnung auf, diese seien in der Lage milieu-abhängig untergegangene Kardiomyozyten zu ersetzen oder Narbengewebe sogar in solche umzuwandeln [6].

Im Tiermodell führten transplantierte MSCs nach Myokardinfarkt zu einer verbesserten linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und einer Reduktion des Narbengewebes [3, 30].

Auch klinisch konnte eine Verbesserung der LVEF nach MSC-Applikation beobachtet werden [24]. 2005 wurde jedoch klar, dass die milieu-abhängige Differenzierung höchstens marginal zu dem positiven Effekt beiträgt [30, 96].

Ein weiteres Problem stellt das breite Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen dar. So wurde in einigen Studien gezeigt, dass transplantierte MSCs im linken Ventrikel zu Osteoblasten differenziert waren [13, 139]. Dieses nicht unerhebliche Problem sollte bei zukünftigen klinischen Studien unbedingt berücksichtigt werden.

1.2.2.2. Hämatopoetische Stammzellen

Nachdem Ferrari et al. 1998 zeigen konnten, dass Knochenmarkzellen in Bereiche induzierter Muskeldegeneration migrieren und sich dort an der Regeneration geschädigter Myozyten beteiligen [45], begannen viele Gruppen deren regeneratives Potential am Myokard zu untersuchen.

Kurz darauf gab es Hinweise auf eine Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen an der kardialen Reparatur nach Myokardinfarkt [7, 62].

Orlic et. al veröffentlichten 2001 eine Studie, in welcher sie im Mausmodell nach intramyokardialer Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nachweisen konnten.

Im gleichen Jahr wurden von Strauers Gruppe erstmals einem Patienten Knochenmarkstammzellen zur kardialen Regeneration nach akutem Herzinfarkt intrakoronar transplantiert [120].

Es wurde postuliert, dass hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark sowie Progenitorzellen aus dem peripheren Blut die Fähigkeit besitzen *in-vitro* kardial zu differenzieren [63]. Trotz dieser anfänglich vielversprechenden Hinweise, konnte 2004 die

Hypothese widerlegt werden, dass hämatopoetische Stammzellen [4, 93, 97] milieuhängig zu Kardiomyozyten differenzieren.

Obwohl diese Erkenntnisse die Hoffnung des kardialen Gewebersatzes erschütterten, ist die kardiale Stammzelltherapie mit hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark aufgrund deren sicherer Durchführbarkeit [38] sowie belegtem therapeutischen Effekt mittlerweile vielfach in klinischen Studien untersucht worden (*Tabelle 1*). Die Grundlage dafür war die langjährige Erfahrung mit systemischer Stammzelltherapie und der Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark in der Hämatookologie.

Die Mechanismen therapeutischer Wirksamkeit sind bisher unzureichend erforscht, allerdings wird den transplantierten Zellen ein parakriner Effekt zugesprochen, worauf im Folgenden noch näher eingegangen wird. Trotz dieser Defizite konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass die kardiale Stammzelltherapie mit hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen einen positiven Effekt im Sinne einer längerfristigen Erhöhung der LVEF um etwa 3 % hat und somit das Potential dieser Therapie sowie die Notwendigkeit ihrer Optimierung unterstreicht [146].

Studie	Jahr	Zelltyp	Patienten	Applikation	LVEF % Δ
REPAIR-AMI [116]	2006	BMC	204	3-7 Tage nach MI, behandelt mit PCI	2,5 (4 Mo)
ASTAMI [79]	2006	BMC	100	4-8 Tage nach MI, behandelt mit PCI	N.S. (6 Mo)
BOOST [89]	2006	BMC	60	4-6 Tage nach MI, behandelt mit PCI	6 (6 Mo) N.S. (18 Mo)
BONAMI [114]	2011	BMC	101	7-10 Tage nach MI, behandelt mit PCI	N.S. (3 Mo)
HEBE [54]	2011	BMC	82	3-8 Tage nach MI, behandelt mit PCI	N.S. (4 Mo)
REGENT [127]	2009	BMC	120	3-8 Tage nach MI, behandelt mit PCI	3 (6 Mo)

Tabelle 1: Intrakoronare Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt (AMI), ausgewählte Studien

BMC: Bone Marrow Cells

N.S.: Nicht signifikant

PCI: Perkutane Koronarintervention

LVEF: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

1.2.3. Pluripotente Stammzellen

Während Myoblasten und verschiedene Subpopulationen adulter Stammzellen zwar sowohl in präklinischen als auch klinischen Studien ihre, wenn auch moderate, Wirksamkeit bewiesen haben, konnten sie die ursprüngliche Wunschvorstellung des kardialen Gewebersatzes nicht erfüllen. Im Gegensatz dazu stellen pluripotente Stammzellen, wie embryonale Stammzellen (ESCs) oder induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) aufgrund ihrer inhärenten Eigenschaften sich unter Kulturbedingungen fast unbegrenzt vermehren und zu Kardiomyozyten [67, 86, 137] differenzieren zu können eine aussichtsreiche Quelle für die kardiale Zellersatztherapie dar. Der therapeutische Einsatz allogener humaner ESCs kommt aufgrund ethischer Bedenken, sowie deren Tumorigenität und Immunogenität für die klinische Translation nicht in Frage [63].

2006 gelang es Yamanakas Gruppe [124] induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) als neue vielversprechende Quelle autologer Stammzellen aus murinen Fibroblasten zu generieren. 2007 gelang dies auch mit humanen Fibroblasten [123]. Wie ESCs können iPS in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren [98] und zudem aus verschiedensten Ursprungszellen generiert werden [119]. Im Gegensatz zu ESCs liegen für deren Verwendung hinsichtlich Ethik und Immunogenität keine Bedenken vor, da sie aus patienteneigenem Gewebe hergestellt werden und zudem als autologe Zellen nicht immunogen sind [53]. Durch Aufreinigung kardiomyozytär differenzierter Stammzellen, kann das Problem der Tumorigenität sowohl für ESCs [71] als auch für iPS [21] gelöst werden.

Um Zellpopulationen kardiomyozytär differenzierter Stammzellen mit einer hohen Spezifität aufzureinigen, müssen entsprechende Oberflächenproteine bekannt sein, über welche eine solche Aufreinigung möglich ist.

Effiziente Methoden dafür wurden von David et al. und Bondue et al. entwickelt. Unter der Kontrolle des Promotors von *Mesp1*, einem Schlüsselfaktor in der frühen kardiovaskulären Differenzierung von humanen ES-Zellen [9], wurden entweder GFP [10] beziehungsweise eine funktionslose Variante des humanen Oberflächenproteins CD4 exprimiert [33]. Über diese Markerproteine können kardiovaskulär differenzierte Stammzellen mittels FACS oder MACS aufgereinigt werden. Dabei werden Reinheiten von über 90% erreicht [10, 33].

Eine noch elegantere Methode wurde von Dubois et al. vorgeschlagen. Sie identifizierten das Oberflächenprotein "SIRPA", welches spezifisch auf Kardiomyozyten exprimiert wird,

die von humanen ESCs oder humanen iPS abstammen. Über einen Antikörper gegen dieses Protein gelang eine Aufreinigung kardiomyozytärer Zellen, die auf kardiales Toponin T positiv sind, von 98% [41].

Der Einsatz verschiedener aus iPS und ESCs generierter kardialer Zellen konnte deren Wirksamkeit und problemlose Durchführung am Kleintiermodell zeigen (*Tabelle 2*). In keiner der Studien wurde die Bildung von Teratomen beobachtet.

Studie	Zelltyp	Graft	Tier	LVEF	LV Fibrose	in-vivo Tracking
Kollosov [71]	mES	Suspension	Maus	↑ Kath.	no	no
Dai [29]	miPS	Tri-P	Maus	↑ Echo	↓ Histo	BLI ql
Kawamura [66]	hiPS	"Cell-Sheet"	Schwein	↑ Echo,MRT	↓ Histo	no

Tabelle 2: Exemplarische Studien kardialer Zelltherapie mit Kardiomyozyten aus ES und iPS

ql: qualitativ, **Kath:** Millar tip Katheter, **m:** murin, **h:** human

Graft: transplantiertes Gewebe, **Tri-P:** "tricell-patch" aus Kardiomyozyten, endothelialen Zellen, embryonale Fibroblasten

Echo: Echokardiographie, **BLI:** Biolumineszenzbildgebung, **LV:** linksventrikuläre

Damit stellen iPS Zellen zur Zeit die vielversprechendste Quelle für regenerative Therapien des Myokards dar. Vor kurzem wurden von Matsuura et al. erstmals Kardiomyozyten aus humanen iPS generiert [85].

Eine weitere Möglichkeit in-vitro Kardiomyozyten zu generieren, ist die direkte sogenannte "Transdifferenzierung" von Fibroblasten mit einem Cocktail aus kardialen Transkriptionsfaktoren wie Gata4, Mef2C, Tbx5 [60].

Obwohl iPS Zellen pluripotent sind, scheinen sie nicht identisch mit ES-Zellen zu sein. So unterscheiden sich zum einen deren Transkriptome, zum anderen bleiben epigenetische Modifizierungen der Ursprungszellen bestehen [68, 104]. Inwiefern sich diese Eigenschaften auf aus iPS Zellen differenzierten Zellen auswirken, ist bislang unzureichend geklärt.

Bevor also Patienten von Therapien mit aus iPS generierten Zellen profitieren werden, ist ein besseres Verständnis deren biologischer Eigenschaften vor und nach der Transplantation sowie deren Funktion *in-vivo* absolut notwendig [16, 61].

Dafür sind insbesondere molekulare und *In-vivo*-Bildgebungstechniken geeignet, welche sowohl das Überleben der Zellen als auch deren therapeutischen Effekt darstellen können [52].

Tabelle 3: Studien zur Quantifizierung der Zellretention kardial transplantierte Zellen (Seite 11):

PBMNC: peripheral blood mononuclear cells, **FACS:** Durchflusszytometrie,

NAA: Neutronenaktivierungsanalyse, **p.i.:** post injectionem

1.3. Schicksal und Überleben kardial transplantierte Zellen

1.3.1. Grundlegende Mechanismen und Wirkung

Ziel der kardialen Zelltherapie ist untergegangenes Herzgewebe zu ersetzen, wobei unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus der Reparatur eine möglichst effiziente Zellapplikation eine wichtige Voraussetzung ist [111]. Im Rahmen einer Vielzahl präklinischer Studien konnte gezeigt werden, dass die Retentionsraten applizierter Zellen unabhängig vom Zelltyp, dem Applikationsort und dem Tiermodell gering sind (*Tabelle 3*).

Autor	Tiermodell	applizierte Zellen	Retention (%)	Messung p.i.	MI	Methode (Nachweis)
Teng et al. 2006 [128]	Ratte	Mikrosphären 10 µm 3 x 10 ⁶ i.m.	6,19% ±4,05%	10 min	keiner	FACS
Hudson et al. 2007 [59]	Schwein	Mikrosphären 15 µm 2 x 10 ⁶ i.m.	16,4%	30 min	keiner	FACS
Grossmann et al. 2002 [51]	Schwein	Mikrosphären 15 µm 2 x 10 ⁶ i.m.	15% ±21%	sofort	keiner	FACS
Hou et al. 2005 [58]	Schwein	PBMNC 10 ⁷ i.m.	11±3%	1 h	LAD 6 d vor Tx	¹¹¹ Indium Gamma counter
Hofmann et al. 2005 [55]	Mensch	BMC CD34 ⁺ i.c.	1,3% -2,6%	75 min	5-10 d nach MI	FDG-PET
Freyman et al. 2006 [46]	Schwein	MSC 2,5- 500 x 10 ⁴ i.m.	7%	72 h	LAD-Lig.	NAA
			3%	14 d	LAD-Lig.	
Templin et al. 2012 [126]	Schwein	hiPS 10 ⁴ - 1,2 x 10 ⁷	k.A.	3 Mo	trans. LAD- Okkl.	hNIS SPECT

Aus der Zusammenschau der in *Tabelle 3* zusammengestellten Ergebnisse lässt sich der Mechanismus des Engraftments, modifiziert nach Teng et al. [128], in Abhängigkeit von der Zeit in die drei folgenden Phasen einteilen:

- Phase I:** Akuter Verlust
Phase II: Chronischer Verlust
Phase III: Überleben und Anwachsen

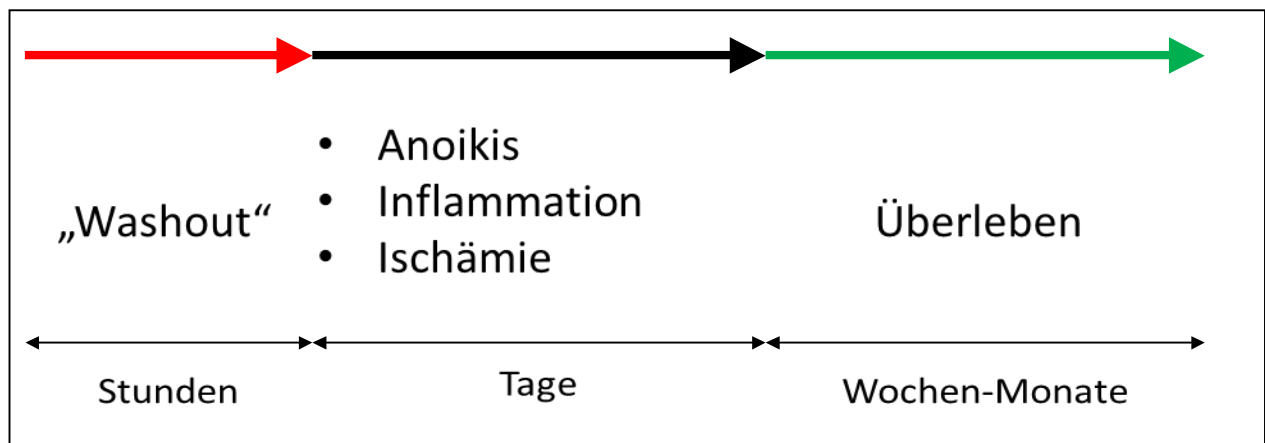


Abbildung 2: Phasen der zellulären Retention

Phase I: akuter Verlust

Den drei Phasen liegt jeweils ein typischer Pathomechanismus zugrunde. In der Phase des akuten Verlustes werden die injizierten Zellen durch die mechanischen Kontraktionen des Herzens über das lymphatisch-venöse System in den Sinus coronarius, den rechten Vorhof und dann ins pulmonalkapilläre System gespült. Dieser Vorgang scheint innerhalb der ersten Stunden post injectionem abzulaufen [11, 129].

Durch den Abfluss der Zellen in den rechten Ventrikel gelangen sie in den systemischen Kreislauf und somit in Organe wie Lunge, Leber, Nieren und Milz [39]. Die Zellen bleiben hierbei aufgrund des Verhältnisses ihres Durchmessers zu jenem der Organkapillaren stecken [11]. Ob durch den Stichkanal eine relevante Zahl injizierter Zellen nach außen gedrückt wird, ist angesichts der aktuellen Studienlage nicht klar zu beurteilen. Während Teng et al. diesem Mechanismus eine untergeordnete Bedeutung beimessen [128], konnten Terrovitis et al. durch Verschluss des Injektionskanals mit Fibrinkleber eine signifikante Erhöhung der retinierten Zellzahl erreichen [129].

Phase II: chronischer Verlust

Die Phase des chronischen Verlusts beginnt am ersten Tag post injectionem und dauert an, bis ein Gleichgewicht zwischen Absterben und Überleben der Zellen erreicht ist. Murrays Gruppe konnte zeigen, dass der Großteil des Zelltodes innerhalb der ersten Woche nach der Transplantation auftritt. So wurde am ersten Tag nach der Injektion die höchste Apoptoserate mit 32% und an Tag 7 eine Apoptoserate von 1% gemessen [142].

Für diesen Zelltod sind vornehmlich drei pathophysiologische Mechanismen verantwortlich:

Durch das Fehlen einer unterstützenden Matrix sind die zu transplantierenden Zellen schon vor der Injektion einer ersten Hürde ausgesetzt. Wenn Zellen, die normalerweise adhärent wachsen in Suspension gehalten werden, kommt es zu Anoikis. Dies ist ein Signalweg, welcher durch den Verlust des Zell-Matrix-Kontaktes adhärenter Zellen zum programmierten Zelltod, ähnlich der Apoptose, führt [106, 147]. Für die Vorbereitung der Zellen zur Transplantation werden diese meist enzymatisch mittels Trypsin aus den Kulturflaschen abgelöst und verbleiben bis zur Injektion in Suspension. Sowohl hierbei, als auch nach der Injektion im Myokard, wo initial ebenfalls noch keine Zell-Matrix-Kontakte zwischen transplantierten Zellen und Basallamina vorliegen, fehlen über viele Stunden hinweg wichtige Überlebenssignale.

Eine weitere Hürde stellt die insuffiziente Versorgung der transplantierten Zellen im Zielgewebe dar, da durch den Gefäßverschluss des Myokardinfarkts einerseits und ein Verklumpen der injizierten Zellen im Suspensionsmedium andererseits deren Versorgung vornehmlich über Diffusion erfolgen muss [111]. So konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass injizierte Kardiomyozyten innerhalb des ersten Tages nach Transplantation einen irreversiblen ischämischen Schaden erlitten hatten [142].

Zuletzt stellt auch das inflammatorische Milieu im infarzierten Myokard einen Faktor dar, welcher zum Absterben transplantierte Zellen führen kann. Der heilende Infarkt wird innerhalb der ersten Tage von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen besiedelt, welche reaktive Sauerstoffspezies und inflammatorische Zytokine produzieren [94].

Phase III: Überleben

Nachdem die Hürden in Phase I und Phase II überwunden sind, integrieren sich die transplantierten Zellen mehr oder weniger gut ins Zielgewebe. Dies ist unter anderem abhängig vom Zielgewebe und vom verwendeten Zelltyp. Aufgrund der geringen Zahl überlebender Zellen und weniger verfügbarer Methoden zum *In-vivo*-Tracking ist jedoch wenig über diese Phase bekannt.

1.3.2. Wirkmechanismen

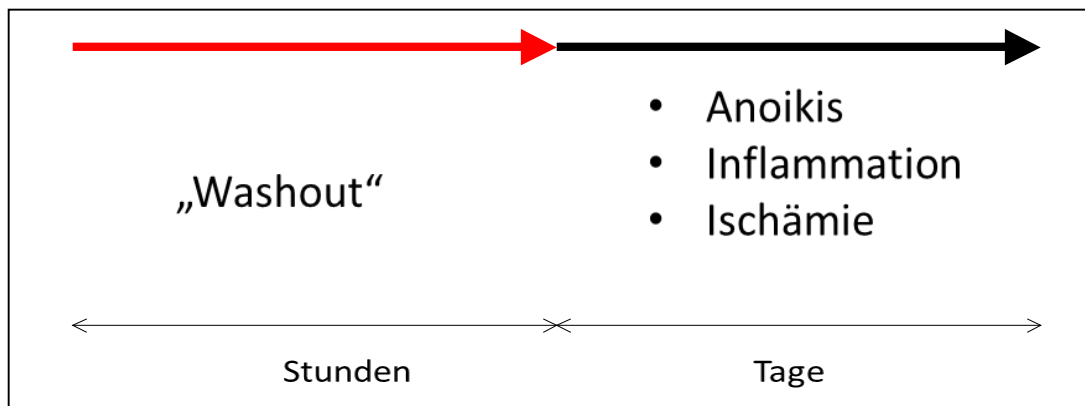
Um nachvollziehen zu können, welche Mechanismen dem positiven Effekt kardialer Zelltherapien zugrunde liegen, ist es sinnvoll sich die Dimensionen des Zellverlustes vor Augen zu führen. Menschliches Herzmuskelgewebe enthält etwa 20 Millionen Kardiomyozyten pro Gramm Myokard [99]. Im Durchschnitt enthält ein 200 Gramm schwerer linker Ventrikel somit 4 Milliarden Kardiomyozyten. Eine Herzinsuffizienz entsteht bei einem Verlust von 25 % des Ventrikels, während ein Verlust von 40 % im Menschen einen akuten kardiogenen Schock verursacht [22]. Die Größenordnung der Zellzahlen, die zu ersetzen wären, sind also im Milliardenbereich anzusiedeln.

Die durchschnittlichen Zellzahlen, welche in klinischen Studien transplantiert werden, liegen jedoch im Größenbereich von nur 10^7 - 10^8 [146]. Geht man zudem von dem oben beschriebenen Zellverlust in Phase I und Phase II aus, welcher die Zellzahl weiter verringert, wird klar, dass die positiven Effekte nicht auf den alleinigen Ersatz von Herzgewebe durch transplantierte Zellen zustande kommen können. Vielmehr scheinen die sogenannten parakrinen Faktoren dabei eine entscheidende Rolle zu spielen [53].

Für adulte Stammzellen ist bekannt, dass sie eine Reihe von Zytokinen und Faktoren sezernieren können, welche sich positiv auf das Überleben umgebender Zellen auswirken [138]. Für diese freigesetzten Faktoren wurde gezeigt, dass sie eine Reihe von positiven Effekten, wie Angiogenese und Neovaskulogenese [69], reduzierte Apoptose [138] und eine immunmodulatorische Wirkung [15] auf das Zielgewebe haben.

1.3.3. Strategien zur Verbesserung der zellulären Retention im Myokard

Die kardiale Stammzelltherapie zeigt eine nachweisbare klinische Wirksamkeit, obwohl die Retentionsraten transplantierte Zellen gering sind. Dies lässt vermuten, dass die Wirksamkeit massiv gesteigert werden kann, indem man die Retentionsraten verbessert. Ansatzpunkte hierfür sind die Mechanismen, welche dem Zellverlust in Phase I und II (Abbildung 3) der zellulären Retention zugrunde liegen.



<ol style="list-style-type: none"> 1. Senkung der Kontraktilität während der Injektion <ul style="list-style-type: none"> • Adenosin, Kardioplegie [129] 2. Fixierung der Zellen im Zielgewebe <ul style="list-style-type: none"> • Fibrinkleber [129] • Magnetisches Targeting [26] • 3D- Gewebepatch [145] 	<p>Hemmung von:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Anois: Matrix [72, 73] 2. Inflammation: Superoxiddismutase [122] 3. Ischämie: VEGF- Vorbehandlung [109] 4. Apoptose: <ul style="list-style-type: none"> • Hitzeschock [74] • Akt-/Bcl-2 -Überexpression [77, 81]
--	---

Abbildung 3: Mögliche Ansatzpunkte und Strategien zur Verbesserung kardialer Retention

Phase I - der akute Verlust - wird vom mechanischen Washout der Zellen durch Kontraktionen des Herzens dominiert. Entsprechend kann durch Gabe von Adenosin oder Injektion unter Kardioplegie [129], durch Minderung der Kontraktilität, die akute Retention erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit, die Zellen am Transplantationsort zu

fixieren, stellt die Verwendung von Fibrinkleber [129] oder die Transplantation von dreidimensionalen "Gewebeflicken" dar [145]. Eine sehr innovative Strategie ist das magnetische "Targeting" von mit Eisenoxid markierten Zellen im Zielgewebe [26]. Dabei werden diese mit einem externen Magneten über das intrazelluläre ferromagnetische Material am Transplantationsort festgehalten.

Um die transplantierten Zellen in Phase II vor dem Zelltod zu schützen, müssen sie gegenüber dem inflammatorischen Milieu, der Ischämie und Anoikis widerstandsfähiger gemacht werden. Durch eine Hitzeschockbehandlung bilden Zellen Hitzeschockproteine (HSP). Apoptose [91] sowie Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress [121] der vorbehandelten Zellen werden dadurch vermindert. Somit wird das Überleben vorbehandelter Zellen signifikant erhöht [74]. Während durch Hitzeschockbehandlung ein zytoprotektives Stadium, vermittelt durch verschiedene Mechanismen, hervorgerufen wird [111], kann auch direkt an spezifischen Signalwegen angesetzt werden.

Ein Ansatzpunkt hierfür sind die Signalwege der Apoptose. Durch die Überexpression anti-apoptotischer Botenstoffe wie Akt, einer Serin-Threonin-Kinase [81, 142], oder Bcl-2 [77, 95] konnte das Überleben intrakardial transplantierte Zellen erhöht werden.

Um den Verlust durch Anoikis zu verringern, wurden verschiedene Methoden verwendet, um den Zellen eine Matrix bereitzustellen, an welche sie binden können, wie zum Beispiel Matrigel [73] oder eine Kollagenmatrix [72]. Dies führte jeweils zu einem signifikant höheren Überleben.

Mit der Absicht, die Menge reaktiver Sauerstoffspezies im inflammatorischen Milieu des Infarkts zu verringern, koinjizierten Suzuki et al. das Enzym Superoxiddismutase zusammen mit Myoblasten nach Induktion eines Myokardinfarktes im Mausmodell. Dadurch konnte sowohl das Überleben erhöht, als auch die inflammatorische Reaktion vermindert werden [122].

Da das ischämische Milieu im Infarkt eine Gefahr für das Überleben transplantierte Zellen darstellt, wurde im Rahmen verschiedener Studien versucht, diese Situation durch Verbesserung der Gefäßversorgung zu optimieren. Durch eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit einem VEGF-tragenden viralen Vektor gelang es Retuerto et al. das Überleben der transplantierten Zellen zu erhöhen [109].

1.4. Imaging des Zellschicksals

1.4.1. Einführung und Anforderungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde das Potenzial kardialer Stammzelltherapien, deren Wirkmechanismus sowie Strategien zu deren Optimierung diskutiert. Es liegt auf der Hand, dass durch eine Verbesserung der zellulären Retention die Wirksamkeit weiter gesteigert werden kann. Deshalb ist es absolut notwendig, die dem hohen Zellverlust zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Mit dem Ziel der klinischen Translation eignen sich für das Tracking des Zellschicksals vor allem *In-vivo*-Bildgebungsmethoden, welche die folgenden Anforderungen erfüllen sollten:

- Die Technik sollte möglichst sensitiv sein, eine absolute Quantifizierung der applizierten Zellen ermöglichen und eine hohe Auflösung bieten.
- Außerdem sollten dynamische Aufnahmen möglich sein, um Vorgänge zeitlich aufgelöst verfolgen zu können.
- Die Anwendung muss sicher für den Patienten sein und der Tracer darf keine toxische Wirkung auf die markierten Zellen haben.

Unter diesen Gesichtspunkten werden die im Folgenden vorgestellten, derzeit verfügbaren, Methoden diskutiert.

1.4.2. Zelluläre *In-vivo*-Bildgebung

Das Feld der zellulären *In-vivo*-Bildgebung lässt sich nach Art der Markierung in "direkt" und "indirekt" unterteilen.

Bei der direkten Markierung werden Zellen mit radioaktiven Tracern oder Eisenpartikeln markiert und mittels nuklearmedizinischer Bildgebung, wie Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT), beziehungsweise Magnetresonanztomographie (MRT) verfolgt.

Bei der indirekten Markierung hingegen werden die Zellen durch die Überexpression eines Reportergens genetisch modifiziert. Wird dem Versuchstier nun das Substrat für das entsprechende Genprodukt verabreicht, können die Zielzellen unter Verwendung von PET, SPECT, MRT oder Biolumineszenzbildgebung (BLI) dargestellt werden.

1.4.2.1. Direktes Labeling

Die am häufigsten eingesetzten Imaging Modalitäten sind die Magnetresonanztomographie (MRT) und die nuklearmedizinische Bildgebung mit PET und SPECT [136].

Jede Bildgebungsmodalität hat für das Verfolgen des Schicksals transplantiertes Stammzellen jeweils bestimmte Vor- und Nachteile (*Tabelle 4*).

	Sensitivität	Auflösung	Quantifikation	Quelle
PET	+++	++	++++	[11, 47, 129, 134]
SPECT	++	+	++	[11, 47, 129, 134]
MRT	+	+++	-	[136]
BLI	+++	-	++	[47, 131]

Tabelle 4: Vor- und Nachteile verschiedener Bildgebungsmodalitäten

Die MRT bietet die höchste Auflösung und kann die transplantierten Zellen am genauesten lokalisieren, während ein großer Nachteil die geringe Sensitivität ist (SPIO: 10⁻⁵ mol/l) [113].

Für die MRT müssen die zu trackenden Zellen mit einem Kontrastmittel markiert werden. Dafür wurde in bisherigen Studien am häufigsten superparamagnetisches Eisenoxid (SPIO) eingesetzt. Die Markierung von Stammzellen mit SPIO hat keinen Einfluss auf deren

Viabilität oder Funktion und kann sicher für das Zell-Tracking mittels MRT eingesetzt werden [110]. Allerdings wurde mehrfach berichtet, dass schon am ersten Tag nach der Transplantation von SPIO-markierten Zellen, der Tracer größtenteils in Makrophagen lokalisiert war und somit keinen sensitiven Verlaufsmarker darstellt [130].

Weitere Hürden sind zum einen, dass die Produktion von Eisenoxid in Europa und den USA trotz klinischer Zulassung mittlerweile eingestellt wurde [105]. Zum anderen stellt bei vielen potentiellen Patienten die MRT aufgrund eines künstlichen Schrittmachers oder ICDs eine Kontraindikation dar. [143]

Eine Quantifizierung der Retention transplantierte Zellen ist nur mittels SPECT und PET möglich [136]. Da dies der Fokus der vorliegenden Arbeit ist, wird im Folgenden näher auf diese Techniken eingegangen.

Die Stärke dieser Techniken liegt in deren Sensitivität (PET: 10^{-11} bis 10^{-12} mol/l und SPECT: 10^{-10} bis 10^{-11} mol/l) [47] und dem Potenzial zur absoluten Quantifizierung der applizierten Aktivität als "Prozent der injizierten Dosis" (%ID). Durch moderne Techniken ist mittlerweile jedoch auch eine gute Auflösung möglich [132]. Dies ermöglicht immerhin eine Darstellung anatomischer Strukturen mittels systemischer FDG Applikation mit einer Auflösung von 1,6 mm im microPET [132]. Für eine genauere anatomische Lokalisation der Zellen müssen PET beziehungsweise SPECT mit CT oder MRT kombiniert werden [47].

Die exakteste Quantifizierung ist mittels PET möglich, während die verwendeten Isotope bei der SPECT eine längere Halbwertszeit haben (*Tabelle 5*).

Um die Zellen sichtbar zu machen, müssen sie mit einem intrazellulär lokalisierten Tracer markiert werden. Für die SPECT wird vor allem Indium-111 (^{111}In) und für die PET hauptsächlich [^{18}F]-Fluordesoxyglucose (FDG) verwendet. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Tracern ist ihre Halbwertszeit und somit das Nebenwirkungsprofil (*Tabelle 5*) sowie das Anwendungsgebiet.

	T_{1/2}	Bildgebungsmodalität	Zelltoxizität	Klinik	Zell-tracking	Quelle
FDG	110min	PET	-	+ Praxis	Studien	[55]
^{111}In	2,8 d	SPECT	++	+ Praxis	Klinik	[117]
SPIO	-	MRT	-	Studien	Studien	[47]

Tabelle 5: Vor- und Nachteile verschiedener Tracer

T_{1/2}: Halbwertszeit

Alle oben genannten Tracer wurden bereits im Rahmen klinischer Studien zum Zell-Tracking untersucht [17, 23, 55, 64, 144]. Allerdings wurden lediglich FDG [55, 64] und ^{111}In [23, 117] in der kardialen Stammzelltherapie eingesetzt. SPIO hingegen wurde bisher nur in Studien zum Tracking verabreichter neuronaler Stammzellen bei Hirntrauma [144] sowie zum Tracken verabreichter dendritischer Zellen bei Melanompatienten verwendet [35].

Zwar emittieren FDG und Indium radioaktive Strahlung, welche jedoch in den normalerweise verwendeten Dosierungen keine gesundheitliche Gefährdung für den Patienten darstellt [23, 55].

^{111}In wird in der klinischen Diagnostik zur Lokalisierung von Entzündungsherden bei Fieber unbekannter Ursache klinisch eingesetzt [112]. Ein Vorteil von Indium ist die längere Halbwertszeit, wodurch transplantierte Zellen über einen längeren Zeitraum getrackt werden können. Allerdings wurde mehrfach eine zytotoxische Wirkung von ^{111}In beschrieben [1, 14]. Dies könnte durch die kurze Reichweite der β -Strahlung bedingt sein, da hierdurch ein Großteil dieser Strahlung intrazellulär absorbiert wird [55]. Außerdem wirkt diese Strahlung durch die lange Halbwertszeit von 67 Stunden im Vergleich zu 110 Minuten bei FDG wesentlich länger ein.

FDG ist in der nuklearmedizinischen Bildgebung routinemäßig im Einsatz und wurde bereits in zwei klinischen Studien komplikationslos zum kardialen Zell-Tracking eingesetzt [55, 64]. Außerdem wurde gezeigt, dass die Markierung von Stammzellen mit FDG deren Viabilität und Fähigkeit zu differenzieren und proliferieren nicht langfristig beeinträchtigt [135]. Für die klinische Anwendung ist dies eine unabdingbare Voraussetzung.

Somit erscheint FDG ein hervorragender Tracer zu sein. Limitationen sind jedoch die kurze Halbwertszeit von 110 min und der Efflux von freiem FDG aus markierten Zellen [12], was beim quantitativen Tracken des Schicksals transplanteder Zellen berücksichtigt werden muss.

Das direkte Labeling eignet sich aufgrund der kurzen Halbwertszeit, dem Efflux und der Verteilung des Radiolabels auf die Tochterzellen nur zum Imaging der ersten Stunden nach Transplantation der Zellen, also in Phase I (*Abbildung 4*).

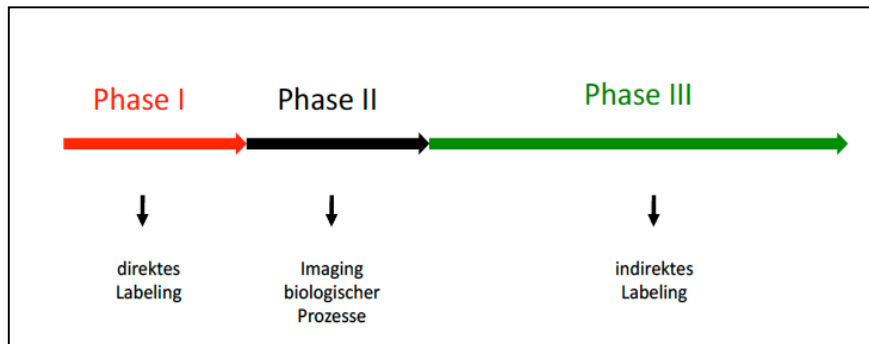


Abbildung 4: Optimale Imaging Technik für die jeweilige Phase

Ein inhärentes Problem der direkten Zellmarkierung ist, dass es nach Transplantation der Zellen nicht mehr möglich ist, anhand des Signals zwischen lebendigen und toten Zellen zu unterscheiden. Desweiteren ist es schwierig zwischen intra- und extrazellulärem Tracer zu unterscheiden [136]. Da die Halbwertszeit eingesetzter Tracer relativ kurz ist und ein nicht unerheblicher Efflux auftritt, ist die direkte Zellmarkierung am besten geeignet, um die erfolgreiche Injektion zu verifizieren und das Zellschicksal in Phase I zu verfolgen (*Abbildung 4*).

Ein großer Vorteil gegenüber der indirekten Markierung, bei der das Radiopharmakon systemisch verabreicht wird, ist, dass kaum störende Hintergrundstrahlung auftritt. Dadurch wird die Quantifizierung noch genauer.

Die aktuell sensitivste Methode zur Quantifizierung der Zellen in der frühen Phase ist die PET. Solange das untersuchte Zeitfenster im Bereich einer Halbwertszeit liegt und der Efflux mit einberechnet wird, überwiegen die Vorteile des Tracers FDG.

Mit den Rekonstruktionsalgorithmen OSEM 3D/MAP kann im microPET eine bisher unerreichte Genauigkeit hinsichtlich Quantifizierung und Auflösung erreicht werden [132]. Damit ist es möglich, das Schicksal transplantierte Zellen im Mausmodell zu verfolgen.

1.4.2.2. Indirektes Labeling

Während das direkte Zell-Labeling bereits in diversen klinischen Studien zur Anwendung kam [105], wird das indirekte Zell-Labeling bisher lediglich in präklinischen Studien eingesetzt, da die transplantierten Zellen dafür genetisch modifiziert werden müssen und somit ein Risiko für den Patienten darstellen.

Die Zellen werden transfiziert und überexprimieren dann ein nicht-natives Enzym, Protein oder einen Rezeptor. Wird dem Empfänger der Zellen nun das entsprechende Substrat appliziert, interagiert dieses mit dem Protein und erzeugt ein messbares Signal. Dieses wird nur von lebenden Zellen mit intaktem Metabolismus und ausreichender Syntheseleistung erzeugt, sodass die transplantierten Zellen und deren Deszendenten mit einer hohen Spezifität identifiziert werden können.

Am häufigsten wird im Kleintiermodell hierfür die optische Biolumineszenz-Bildgebung (BLI) benutzt, wobei Luciferasen als Reportergen dienen. Nach intraperitonealer Applikation von D-Luciferin wird dieses enzymatisch unter Emission von Photonen gespalten, was mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera detektiert werden kann [19]. Diese Methode ist im Kleintiermodell zwar sehr sensitiv, billig und nicht toxisch, allerdings ist die räumliche Auflösung schlecht und die Gewebepenetration der emittierten Photonen so gering, dass eine Anwendung im Großtiermodell nicht attraktiv ist [47, 131].

Desweiteren kommen Konstrukte zum Einsatz, die über radioaktive Substrate mittels PET oder SPECT das Verfolgen transplantiertter Zellen ermöglichen.

Durch Überexpression des humanen Natrium-Iodid-Symporters (hNIS) sind die Zielzellen in der Lage, radioaktives Jod oder ^{99m}Tc aufzunehmen und können somit vom Myokard, welches diesen Transporter nicht besitzt, abgegrenzt werden. Im gesunden Tier wird der NIS normalerweise vor allem in Schilddrüse, Speicheldrüsen, Magen, Plexus choroideus und laktierenden Milchdrüsen exprimiert [36]. Somit können die Zellen sehr sensitiv mittels PET oder SPECT vom umgebenden Myokard abgegrenzt werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Überexpression von HSV-tk, wodurch das applizierte Radionuklid intrazellulär "getrappt" wird und anschließend in der PET bildgeberisch dargestellt werden kann. Die Radiomarkierung mit ^{124}I -Fialuridin unter Verwendung des Reportergens HSV-tk ist jedoch signifikant instabiler als die Radiomarkierung mit ^{124}I unter Verwendung des Reportergens hNIS. Zudem könnte ein longitudinales Verfolgen der transplantierten Zellen *in-vivo* durch eine starke Immunantwort des Empfängers der transgenen Zellen infolge des viralen Proteins HSV-tk behindert werden [90].

1.5. Fragestellung der Arbeit

Für die kardiale Zelltherapie mit adulten Stammzellen wurde in einer Metaanalyse randomisierter Studien eine signifikante Wirksamkeit gezeigt [146]. Die Retentionsraten transplanteder Zellen liegen allerdings schon innerhalb der ersten Tage unter 10 % [111]. Dies lässt hoffen, dass sich die Wirksamkeit noch immens steigern lässt. Dafür ist es allerdings notwendig das biologische Schicksal der injizierten Zellen, deren Biodistribution und Mechanismen, welche der niedrigen Retention zugrunde liegen, besser zu verstehen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, über die ersten zwei Stunden das Schicksal transplanteder Zellen *in-vivo* dynamisch verfolgen zu können. Dafür sollte eine Methode verwendet werden, welche sowohl im Kleintiermodell als auch für die klinische Anwendung optimal geeignet ist. Diese Kriterien erfüllt vor allem die direkte Zellmarkierung mit FDG und einer konsekutiven dynamischen PET-Aufnahme.

Die Methode wurde zwar schon in Mensch und Ratte verwendet, um transplantede Zellen tracken und quantifizieren zu können, jedoch reichte die Auflösung und Spezifität bislang verwendeter Techniken nicht aus, um sie auf das Mausmodell anzuwenden. Langfristig sollen zwar Zellen in klinischen Studien verfolgt werden, allerdings sind die zugrunde liegenden Mechanismen des therapeutischen Effektes und des geringen Überlebens kaum verstanden. Aus diesem Grund ist es unabdingbar, diese Mechanismen an einem Modellorganismus zu untersuchen.

Für biomedizinische und grundlagenorientierte Fragestellungen ist das Mausmodell hervorragend geeignet. Im Gegensatz zu größeren Modelltieren, sind transgene Mäuse eine seit langem etablierte Praxis in der biologischen Grundlagenforschung. Hinzu kommt, dass gegenwärtig nur wenige Ratten ESC-Linien verfügbar sind [56] und es erst seit 2008 möglich ist Ratten-ESCs undifferenziert in Kultur zu halten. Im Gegensatz dazu sind murine ESCs schon seit 1981 verfügbar [84].

Unter diesem Gesichtspunkt war das Ziel der vorliegenden Arbeit, eine Methode zum *In-vivo*-Tracking intramyokardial transplanteder Stammzellen für das Mausmodell zu etablieren. Damit sollte eine exakte Quantifizierung der Retention transplanteder Zellen und deren Biodistribution möglich sein.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Allgemeine Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
[¹⁸ F]-Fluordesoxyglucose	Klinikum Rdl, München
Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO (Dimercaptobernsteinsäure)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Formalin (Formaldehyd 4%)	Roth, Karlsruhe
Isotone Natrium-Chlorid-Lösung	B Braun, Melsungen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tri(hydroxymethyl)-aminomethan	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.2. Proteine und Enzyme

Taq-DNA-Polymerase	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
DNAase I reaction Puffer	Life Technologies, Carlsbad, USA
DNase I	Life Technologies, Carlsbad, USA
Herculase-DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
Kollagenase IV (GIBCO®)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Omniscript RT-Kit	Qiagen, Hilden
Pfu-DNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
RNase-Inhibitor	Promega, Madison, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
T4 DNS-Ligase	New England BioLabs, Ipswich, USA
TRIzol® Reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA

2.1.3. Laborgeräte

2.1.3.1 Zellkultur

Brutschrank, IG 150	Jouan, Unterhaching
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen
Inkubator, HERAhybrid 12	Heraeus, Hanau
Kleinzentrifuge, Mikro 20®	Hettich, Bäch, Schweiz
Kühlschrank/Gefrierschrank Premium®	Liebherr, Biberach
Mikroskop, Axiovert 200	Zeiss, Oberkochen
Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau
Sterilbänke, MSC 12	Jouan, Unterhaching
Wasserbad W12	Medingen, Arnsdorf
Zentrifuge BR 4	Jouan, Unterhaching

2.1.3.2. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL®	Beckman Coulter, Brea, USA
Clenz-Reinigungslösung	Beckman Coulter, Brea, USA
Durchflusszytometrie-Röhrchen	Beckman Coulter, Brea, USA
FACS-Analysesoftware EXPO 32 ADC	Beckman Coulter, Brea, USA
Sheath-Fluid	Beckman Coulter, Brea, USA

2.1.3.3. microPET

Inveon™ Dedicated PET	Siemens, München
Inveon™ Research Workplace	Siemens, München

2.1.3.4. PCR

iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, Hercules, USA
MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermocycler TPersonal Kombi	Biometra, Göttingen
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus	Bandelin electronic, Berlin

2.1.3.5. Infarktmodell

OP- Mikroskop Stemi® 2000	Zeiss, Oberkochen
Aktivimeter	Vestra, Joure, NL
Gamma Counter Cobra Quantum	Perkin Elmer, Waltham, USA
Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500	Opto, Gräfelfing
Microliter Spritze 10 µl	Hamilton, Reno, USA
Mouse-Ventilator Minivent® 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Kleintiernarkosegerät	Dräger, Lübeck
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
VWR™ Rocking Platform	VW international, Radnor, USA
Waage Scout pro 400	Ohaus, Gießen
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	FMI, Seeheim

2.1.4. Tiermodell

Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten weiblichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57/BL6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld).

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Bepanthen® Augensalbe	Bayer, Leverkusen
Braunol®- Lösung	B Braun, Melsungen
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibondexcel®, Prolene®)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI®)	Kettenbach, Eschenburg
Feather disposable Scalpel No.11 saftety razor	Feather Osaka, Japan
Isofluoran (Forene®)	Abott, Wiesbaden
Leukoplast hospital®	BSN medical, Hamburg
Microlance 3®-Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 0,9 mm x 40 mm und 0,3 mm x 13 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Saugtupfer steril (Raucotupf®)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf
Schutzhandschuhe unsteril (sempercare®)	Semperit, Wien, Österreich
Spritzen zu 1 ml (BD plastipak®)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterillium®	Bode Chemie, Hamburg
Tupfer steril (Pagasling®)	Hartmann, Heidelberg
Veet Enthaarungscreme	Reckit Benckiser, Slough, UK
Zellstoff-Ecken (Zelletten®)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf

2.1.5. Zellkulturmaterialien

Bakterienkulturschalen	Greiner
Zellfilter	BD Biosciences, Franklin Lake, USA
Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose	Life Technologies, Carlsbad, USA
FCS	Biochrom, Berlin
Gelatine, porcine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Geneticin (G418)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, USA
LIF (ESGRO)	Life Technologies, Carlsbad, USA
PBS (ohne Calcium, Magnesium, Natriumbicarbonat)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin (U/ml)/Streptomycin ($\mu\text{g/ml}$)	Life Technologies, Carlsbad, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Carlsbad, USA
Zellkulturschalen (24-Loch-Platten, 6- Loch-Platten, 10cm-Kulturschalen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
α -Monothioglycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.6. Zellen

murine Embryonale Stammzellen der
Linie GSES aus Agouti 129/SV-Mäusen
EGFP-überexprimierende GSES
hNIS-überexprimierende GSES

ISREC, Lausanne, Schweiz
von David et al. [31]
siehe unten

Um stabil hNIS überexprimierende ES-Zellen zu erhalten, wurden Zellen der Linie GSES mit dem hNIS-Überexpressionsprodukt (*Abbildung 5*) transfiziert. Mithilfe einer Hygromycinresistenz wurden Zellklone generiert, welche den Vektor stabil überexprimieren.

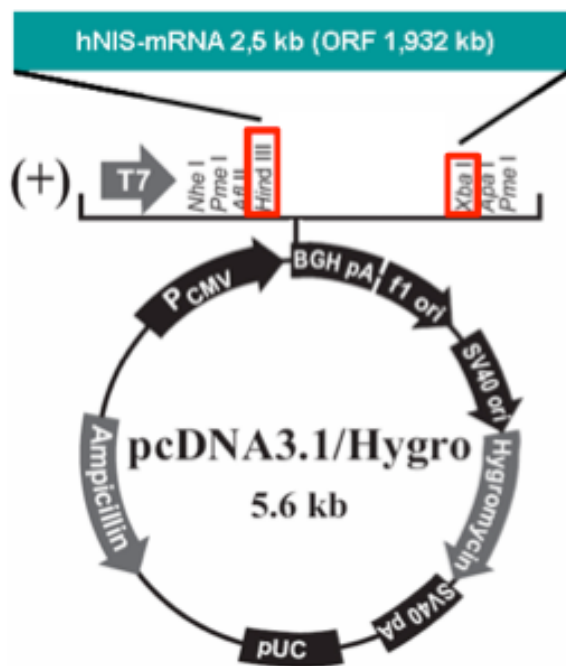


Abbildung 5: hNIS-Überexpressionsprodukt

2.1.7. Kultivierungsmedien

Kultivierungsmedium undifferenzierter Zellen („Kultivierungsmedium“)	500 ml Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit 4,5 g/l Glucose 10 Vol% FCS 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x Nichtessentielle Aminosäuren 1000 U/ml LIF 0,1mM β -Mercaptoethanol zur Selektion: 0,4 mg/ml Geneticin (G418)
Kultivierungsmedium differenzierter Zellen („Differenzierungsmedium“)	500 ml Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium 10 Vol% FCS 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 x Nichtessentielle Aminosäuren 450 µM α - Monothioglycerol

2.1.8. Oligonukleotide

Die gereinigten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für die RT-PCR zur Quantifizierung der Expression von Markergenen eingesetzt:

Primer	Markergene	Sequenz
mGAPDHup812	GAPDH	5' TCTTGGGCTACACTGAGGAC 3'
mGAPDHlo934	GAPDH	5' ACCAGGAAATGAGCTTGACA 3'
hNISup342	hNIS	5' CACCAGCACCTACGAGTACC 3'
hNISlo524	hNIS	5' CAGATAATTCCGGTGGACAG 3'

up = sense , lo = anti-sense

“Zahl” = Position der ersten bzw. letzten Primerbase im ORF des jeweiligen Gens, z. B. beträgt die Länge eines PCR-Produkts mit den eingesetzten Primern up812 und lo934 demnach 123 bp

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturmethoden

Die Medien und Lösungen für die Zellkultur waren autoklaviert oder steril filtriert und wurden vor Gebrauch in der Regel auf 37°C vorgewärmt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.1.1. Kultivierung der Zellen

Sowohl untransfizierte GSES (murine embryonale Stammzellen) als auch stabil EGFP-exprimierende GSES wurden in oben beschriebenem Kulturmedium nach Standardprotokoll [32] bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und unter Zusatz von 1,000 U/ml LIF in undifferenziertem Zustand [102] gehalten; ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte täglich. Es fanden in der Regel 10cm-Schalen (10 ml Medium) Verwendung, welche zuvor mit 0,1%-iger denaturiertes Kollagen enthaltender porciner Gelatine beschichtet worden waren, um die Zelladhärenz zu verbessern (mind. 15 min, 37 °C).

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70%–80% passagiert: Nach zweimaligem Waschen mit PBS ohne Calcium (jeweils 8 ml), wurden sie mit 1 ml 1xTrypsin-EDTA im Brutschrank für 1 bis 2 Minuten inkubiert, sodass sie sich durch leichtes Spülen oder Klopfen ablösen ließen. Die Trypsinierung wurde dann durch Zugabe von 10 ml des FCS-haltigen Kultivierungsmediums gestoppt. Nach Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge, 2500 Upm, 3 min) und Aufnahme des Sediments in das Medium wurden diese in einer Verdünnung von 1:5 bis 1:20 erneut ausgesät.

2.2.1.2. Vorbereitung zur Transplantation

Für die Transplantation wurden in der Kulturschale angewachsene und undifferenzierte GSES Zellen, wie oben beschrieben, mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die auf diese Weise erhaltene Zellsuspension wurde nach Zentrifugation (Eppendorfzentrifuge, 2500 Upm, 3 min) und Abnahme des Überstandes in 1 ml 1xPBS resuspendiert. Unter Verwendung einer Nöhbauer Zählkammer und Trypanblau-Färbung konnten Aliquots je 3 x 10⁶ vitaler Zellen hergestellt werden, welche nach Zentrifugation in 20 µl PBS eiskaltem PBS resuspendiert und zum OP-Platz gebracht wurden.

2.2.1.3. Differenzierung der Zellen

Die *In-vitro*-Differenzierung der GSES wurde in oben beschriebenem Kulturmedium ohne LIF und ohne G418 nach Standardprotokoll durchgeführt [32]:

Nach Ablösen der Zellen mittels 0,25% Trypsin-EDTA und anschließendem Abzentrifugieren wurden sie in Differenzierungsmedium resuspendiert und sodann mit einer Dichte von ungefähr 2×10^5 ES Zellen/ml in 10 ml Bakterienkulturschalen überführt und kultiviert. Im Gegensatz zu gelatinebeschichteten Zellkulturschalen verhindern diese eine Zelladhärenz und ermöglichen auf diese Weise eine Suspensionskultur. Dabei bilden die Zellen Aggregate aus, aus denen sich sog. „Embryoid“-Körperchen (EBs) entwickeln. Diese kugelförmigen EBs wurden nach 2 Tagen in ein neues Medium überführt.

2.2.1.4. Konservierung der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsiniert und zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte unter schrittweiser Zugabe des vorgekühlten Kryomediums bei einem Titer von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml pro Kryo-Tube. Die Zellen wurden langsam ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) in einem Kryobehälter bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in flüssigen Stickstoff für eine dauerhafte Lagerung überführt.

Zum Wiederauftauen der Zellen wurden diese aus dem flüssigen Stickstoff direkt für 50 Sekunden in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und darin angetaut. Anschließend wurde die noch gefrorene Zellsuspension in ein 15ml-Gefäß überführt, mit 10 ml Kultivierungsmedium verdünnt und sofort zentrifugiert, so dass mit anschließender Abnahme des Überstandes das DMSO enthaltende Kryomedium zügig entfernt werden konnte. Die Aussaat der Zellen erfolgte auf zwei 10cm-Zellkulturschalen pro Kryo-Tube.

2.2.2. Tiermodell

Für die vorliegende Arbeit wurden Tierexperimente an der Maus entsprechend den Vorschriften der Tierschutzverordnung durchgeführt. Die durchgeführten Arbeiten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ: 55.2-1-54-2531-31-07) und entsprachen den Richtlinien für die Haltung und Verwendung von Labortieren (NIH-Publikation Nr. 85/23, National Academy Press, Washington DC, revised 1996).

2.2.2.1. Haltung der Tiere

Alle Versuche wurden an 8 bis 12 Wochen alten weiblichen Wildtyp-Mäusen des Stammes C57/BL6 mit einem Körpergewicht von 20 bis 25 g durchgeführt (Charles River, Sulzfeld). Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus in Einzelkäfigen mit Standardfutter und Wasser ad libitum gehalten. Die Raumtemperatur betrug konstant 24°C, die Luftfeuchtigkeit 50%.

2.2.2.2. Infarktinduzierung und Zelltransplantation

Nach Entnahme des Versuchstieres aus dem Käfig wurde die Narkose in einer geschlossenen Kammer mittels Isofluran (5%, 1,5 l/min O₂) eingeleitet und danach mit einer Maske aufrechterhalten. Nun wurde die Maus mit dem Rücken auf eine selbstregulierende Wärmeplatte gelegt. Die Extremitäten der Maus wurden mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte befestigt. Der Oberkiefer wurde mit einem um die Platte gespannten Gummiband fixiert. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde ein Rektalkatheter in den Anus der Maus eingeführt. Mit einem Rückkopplungssystem wurde dafür gesorgt, dass die Körpertemperatur der Maus relativ konstant bei 37,5°C gehalten wurde. Anschließend erfolgte über eine circa 2 cm lange longitudinale mediane Hautinzision an der Halsvorderseite die stumpfe Freipräparation der Trachea. Danach wurde der Unterkiefer angehoben und die Trachea unter Sicht mit einer stumpfen Metallkanüle (19 Gauge) intubiert. Das kraniale Ende der Kanüle wurde über einen Gummischlauch mit einem volumengesteuerten Beatmungsgerät verbunden und die Maus initial mit einem Volumen von ungefähr 200 µl mit einer Frequenz von 200 Zügen pro Minute beatmet. Anschließend wurde über das Beatmungsgerät Isofluran (1,5 %, 0,2 l/min) appliziert, um die Narkose aufrecht zu erhalten. Die Haut über der Trachea wurde sodann mittels U-Naht verschlossen (5-0 Ethibond). Nun wurden die Haare im Operationsfeld mittels Enthaarungscreme entfernt und anschließend mit Braunol desinfiziert. Daraufhin wurde die über dem Thorax liegende Haut im Bereich des sichtbaren Herzschlages parallel zu den Rippen mit einer Hautschere eröffnet und auch die darunter liegende Muskelschicht (Mm. Pectorales major und minor) durchtrennt. Im Anschluss wurde der zweite Interkostalraum links aufgesucht (zwischen zweiter und dritter Rippe) und die Zwischenrippenmuskulatur vorsichtig mit einer Mikroschere durchtrennt. Um einen freien Zugang zu ermöglichen, wurden die zweite und dritte Rippe jeweils mit einer 5-0 Ethibond-Nadel-Faden-Kombination umstoßen und

auseinandergezogen. Die Fadenenden wurden mit Klebestreifen ebenfalls auf der Wärmeplatte fixiert.

Nun wurde unter dem Mikroskop das Perikard entfernt, um am freiliegenden Herzen die LAD (Left Anterior Descending Artery) aufzusuchen. Nach genauer Orientierung wurde die LAD ungefähr 2 mm unterhalb des linken Herzohres mit einer 8-0 Prolene-Nadel-Faden-Kombination umstochen. Nach sorgfältiger Lagekontrolle des Fadens wurde die LAD durch mehrmaliges Verknoten des Fadens ligiert. Die korrekte LAD-Ligation wurde dabei durch eine deutliche Entfärbung des Myokards des linken Ventrikels überprüft. Fünf Minuten nach erfolgreicher Ligation wurden an drei Einzelstellen in der Grenzzone des Infarkts je 3×10^6 Zellen in insgesamt 20 μl PBS injiziert.

Im Anschluss wurden die Aufspreizfäden des Thorax entfernt. Die Thoraxmuskulatur wurde adaptiert und mittels zwei bis drei Stichen in durchgehender Naht mit 5-0 Ethibond-Faden vernäht. Die Haut wurde ebenfalls mittels durchgehender Naht (5-0 Ethibond) verschlossen.

Die Tiere aus Gruppe 1 (*Tabelle 6*) wurden intubiert und unter Narkose ins MicroPET transferiert.

Die Tiere aus den Gruppen 2-4 (*Tabelle 6*) wurden nach 5 Minuten (Gruppe 2), 60 min (Gruppe 3) beziehungsweise 120 Minuten (Gruppe 4) getötet. Anschließend erfolgte die Aufbereitung der Herzen wie unten beschrieben zur quantitativen Bestimmung der retinierten Zellen im Durchflusszytometer.

2.2.3. Radiomarkierung der Zellen mit [^{18}F]-Fluorodeoxyglucose (FDG)

2.2.3.1. [^{18}F]-Fluorodeoxyglucose-Markierung

3×10^6 GSES-Zellen wurden in 500 μl DMEM suspendiert. Nach Zugabe von 20 MBq FDG in 100 μl isotoner NaCl-Lösung erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 37 °C. Danach wurden die Zellen drei Mal mit 1xPBS gewaschen, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 μl eiskaltem 1xPBS resuspendiert and den OP-Platz gebracht.

Ein Aktivimeter wurde verwendet um ein erfolgreiches Markieren der Zellen zu überprüfen. Außerdem wurde die Zellviabilität mittels Trypanblaufärbung getestet.

2.2.3.2. Radiotoxizität von FDG

Um die Radiotoxizität von FDG zu überprüfen, wurden 3×10^6 GSES in DMEM mit 20 MBq FDG wie oben beschrieben inkubiert. Zur Kontrolle wurden 3×10^6 GSES in DMEM mit isotoner NaCl-Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen in-vitro, wie oben beschrieben, in Differenzierungsmedium zur Differenzierung gebracht und deren Fähigkeit zu proliferieren und normale EBs zu bilden lichtmikroskopisch beurteilt.

2.2.3.3. Stabilität der radioaktiven Markierung mit FDG

Um den Efflux von FDG zu messen wurden 3×10^6 GSES-Zellen wie oben beschrieben markiert. Nach der 45-minütigen Inkubation wurden die Zellen drei Mal in 1 x PBS gewaschen. Daraufhin wurde DMEM, welches 5 mM Glucose enthielt, dazugegeben. Somit sollte ein Milieu erzeugt werden, welches hinsichtlich der Glucosekonzentration den in-vivo Bedingungen entspricht.

Es folgten wiederholte Messungen der FDG-Retention 0, 20, 40, 60 und 120 Minuten nach der Radiomarkierung. Ebenso wurde jeweils die Radioaktivität des FDGs im Überstand bestimmt. Dazu wurde zum jeweiligen Zeitpunkt der Überstand abpipettiert und 50 μ l davon im Gammacounter gemessen. Die verbliebenen Zellen wurden mit 1M NaOH lysiert, wobei wiederum 50 μ l des Lysats im Gammacounter gemessen wurden.

Retentionsraten wurde nun als Prozentsatz der initial aufgenommenen FDG-Aktivität direkt nach der Markierung (t=0 min) angegeben. Die zeitabhängigen Retentionsraten wurden in ein Diagramm übertragen und eine Regressionsgerade wurde berechnet. Somit konnte die Retentionsrate für einen beliebigen Zeitpunkt extrapoliert werden.

2.2.4. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

2.2.4.1. PET-Aufnahme

Die *In-vivo*-Bildgebung wurde auf einem Kleintier-PET-Scanner durchgeführt (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthcare Molecular Imaging, Knoxville, TN).

Nach Ligation der LAD und Injektion der FDG-markierten Zellen in die Randzone des Infarktes wurden die Tiere unter fortbestehender Narkose in den PET Scanner transferiert. 25 Minuten nach Zellapplikation wurde eine dreidimensionale (3D) dynamische "List-

Mode" Aufnahme über 120 Minuten gestartet. Unter Verwendung einer externen [^{57}Co]-Quelle wurde direkt im Anschluss ein Transmissionsscan zur Streuungs- und Schwächungskorrektur gemacht.

Danach wurden 20 MBq FDG über die laterale Schwanzvene injiziert, um mittels einer 30-minütigen "List-Mode" PET-Aufnahme ein anatomisches Landmarking zu erhalten. Dies war die Voraussetzung, um das Infarktareal deutlich vom Areal des lebenden Myokards abgrenzen zu können. Nach einer zweiten Schwächungsaufnahme wurden die Tiere in tiefer Narkose durch Genickbruch getötet.

Alle aquirierten Daten wurden mit der Software "Inveon Acquisition Workplace" (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN) verarbeitet.

Der dynamische Datensatz wurden aus zeitlich aufeinanderfolgenden Einzelbildern rekonstruiert (6 x 300s, 3 x 600s, 3 x 1200s), wobei 4 Iterationen des "3D ordered subset expectation maximization" (OSEM 3D) und 32 Iterationen des "3D ordinary Poisson maximum a-priori" (MAP) Algorithmus verwendet wurden. Der Vergrößerungsfaktor betrug von 1,42 und ein β von 0,15 verwendet. Jedes 3D Frame bestand aus 128 x 128 x 159 Voxeln (0,51 mm x 0,51 mm x 0,80 mm). Das so rekonstruierte transaxiale "field-of-view" (FOV) hatte einen Durchmesser von 64 mm und eine Länge von 127 mm.

Die statische Aufnahme für das anatomische Landmarking wurde als statisches Summenbild rekonstruiert, wobei ebenfalls die Algorithmen OSEM 3D (4 Iterationen) und fastMAP (32 Iterationen) verwendet wurden.

Alle Daten wurden normalisiert und um folgende Effekte korrigiert: zufällige Koinzidenzen, Totzeit, Zerfall und Schwächung.

Um eine absolute Quantifizierung der eingesetzten Radioaktivität garantieren zu können, wird der verwendete Scanner monatlich entsprechend der Empfehlung des Herstellers kalibriert. Dazu wird ein Zylinderphantom, welches $6,76 \text{ MBq} \pm 1,98 \text{ MBq}$ [^{18}F]-FDG (Durchschnitt und Standardabweichung in den letzten 12 Monaten) gelöst in 20 ml Wasser enthält, verwendet. Die Kalibrationsfaktoren ergeben sich aus den detektierten "Counts" und der eingesetzten Radioaktivität. Transmissionsdaten werden aus Leeraufnahmen bestimmt. Diese Methode wurde kürzlich in ähnlicher Weise von Mannheim et al. beschrieben [82].

2.2.4.2. Auswertung der PET-Aufnahmen

Alle PET-Daten wurden mit der Software "Inveon Research Workplace" (Siemens Medical Solutions, Knoxville, TN) ausgewertet.

Die dynamischen Aufnahmen der injizierten Zellen und die statischen Aufnahmen des anatomischen Landmarkings wurden fusioniert, wobei ein automatisierter volumetrischer Fusionsalgorithmus verwendet wurde. Ein optimales "Alignment" wurde anschließend visuell von einem Bildgebungsexperten bestätigt.

Anschließend wurde eine VOI ("Volume of Interest"), im Areal der Zellapplikation platziert und die Lage visuell in axialer, coronarer und sagittaler Projektion überprüft.

Um die absolute Aktivität im Herzen zu bestimmen, das heißt jene, welche die am Injektionsort verbliebenen Zellen repräsentiert, wurde die gesamte Radioaktivität innerhalb der VOI berechnet.

Die gesamte injizierte Aktivität kann mittels einer Ganzkörper-VOI ermittelt werden. Der prozentuale Anteil der injizierten Dosis (%ID) in der Randzone des Infarktgebietes konnte dann aus dem Quotienten von Ganzkörper-VOI und %ID errechnet werden. Alle Werte wurden mathematisch um den oben beschriebenen (2.2.3.3.) Efflux korrigiert.

Um auf qualitativer Ebene weitere Informationen über die Verteilung der applizierten Zellen zu erhalten, wurden in repräsentativen VOIs auf den dynamischen Aufnahmen in den Lungen, im Gehirn und in der Harnblase die Aktivitätskonzentrationen bestimmt. Im Anschluss wurden daraus Zeit-Aktivitäts-Kurven (TAC) erstellt.

2.2.5. RT-PCR

Es wurden murine transgene GSES eines Zellklons verwendet, welche den humanen Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) überexprimieren. Da alle Zellen vom selben Zellklon abstammen, ist davon auszugehen, dass die hNIS-Expression jeweils etwa gleich ist. Da das murine Zielgewebe dieses humane Protein nicht exprimiert, kann theoretisch über das Verhältnis der hNIS-RNA und eines konstitutiv aktiven Gens die Menge an transgenen Zellen in einer Gewebeprobe ermittelt werden.

Zur Quantifizierung der Zellretention im Herzen wurde eine Real-Time RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) durchgeführt. Die Methode wurde durch Pfaffl et al. ausführlich beschrieben [103]. In einem ersten Schritt wurde die Gesamt-RNA (siehe 2.2.5.2.1.) aus jeweils 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 transgenen

Spenderzellen isoliert und anschließend in cDNA transkribiert (siehe 2.2.5.2.2.). Im zweiten Schritt wurden für die jeweiligen Mengen an cDNA, mittels RT-PCR, CT-Werte ermittelt. Die verwendeten Primer waren hNISup342 und hNISlo524.

Das Ergebnis wurde jeweils auf die Menge des konstitutiv exprimierten Genproduktes GAPDH normalisiert. Hierfür wurden die Primer mGAPDHup812 und mGAPDHlo934 verwendet.

Die Amplifizierung ergab ein Fluoreszenzsignal - Δ CT-Werte - das proportional zur Menge des PCR-Produktes war. Aus den jeweiligen, auf GAPDH-Transkription normierten, $2^{(-\Delta CT)}$ -Werten und den dazugehörigen Zellzahlen sollte nun eine Eichkurve erstellt werden. Somit ließe sich aufgrund der $2^{(-\Delta CT)}$ -Wertes einer Probe die zugehörige Zellzahl bestimmen. Um den Einfluss von RNA aus myokardialem Gewebe auf die RT-PCR zu analysieren, wurden Kontrollherzen entsprechend des verwendeten Protokolls für Zellen aufbereitet (siehe 2.2.5.2.1.). Da in diesen das hNIS-Gen nicht vorliegt, sollte keine entsprechende cDNA in der qRT-PCR detektierbar sein.

2.2.5.1. Isolierung von RNA

2.2.5.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus GSES-Zellen zur Erstellung einer Eichkurve

Mithilfe des RNeasy-Mini-Kits wurde aus jeweils 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 nach Abzentrifugieren (Eppendorffzentrifuge, 2500 Upm, 3 min, Raumtemperatur) die Gesamt-RNA isoliert. Dies erfolgte nach den Angaben des Herstellers entsprechend dem Protokoll für tierische Zellen. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde in 30 μ l RNase-freiem Wasser gelöst. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.2.5.1.2. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription zur Herstellung der Gesamt-cDNA wurden je 2 μ l der isolierten Gesamt-RNA (siehe 2.2.5.2.1.) eingesetzt. Die Reaktion mit 30 U AMV-reverser Transkriptase erfolgte in einem Volumen von 20 μ l für 60 min bei 37°C entsprechend der Anleitung, es wurden allerdings zusätzlich 24 U RNase-Inhibitor eingesetzt. Anschließend wurde das Volumen durch Zugabe von 20 μ l H₂O bidest verdoppelt, die Lösung auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Für die PCR konnten von dieser Verdünnung direkt je 1 μ g des cDNA-Templates eingesetzt werden.

2.2.6. Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Zellen auf ihre spezifischen Eigenschaften wie Größe, Granularität und Fluoreszenz. Durch Markierung bestimmter Oberflächenproteine sowie intrazellulärer Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff oder Verwendung von Zellen, welche fluoreszierende Proteine überexprimieren, können spezifische Zellsubpopulationen quantitativ und qualitativ identifiziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wurden Zellsuspensionen der lysierten Herzen auf das Vorhandensein EGFP-exprimierender Zellen untersucht. Diese waren wie oben beschrieben injiziert worden und repräsentieren die transplantierten Zellen.

In den Messungen wurden jeweils 100.000 Zellen, als repräsentative Auswahl, analysiert. Die Laser-Exzitation lag für beide verwendeten Farbstoffe bei 488 nm, der Emissionsspektralbereich für EGFP bei 515-545 nm und für PI bei > 650 nm. Die Messung der in dieser Arbeit gezeigten Daten erfolgte mit dem Durchflusszytometer „Epics XL“, die Auswertung mit dem Programm „EXPO32 ADC“.

Die Zellen wurden zunächst im Vorwärts- (FS) und im Seitwärtsstreulicht (SS) entsprechend ihrer Größe und Granularität beziehungsweise PI-Fluoreszenz (bei EGFP-Detektion) erfasst und so selektioniert („gated“), dass tote Zellen und Zelldetritus nicht in die Analyse mit eingingen.

Die jeweiligen Achsen der Abbildungen (Abbildung 12 A-C) geben die Intensität der Emission der Wellenlängen des Spektralbereiches der jeweiligen Fluoreszenz wieder.

2.2.6.1. Verarbeitung der Proben zur Durchflusszytometrie

Die entnommenen Herzen wurden mit einem Skalpell in circa 1 mm kleine Stücke zerkleinert und anschließend für 45 Minuten mit 0,1%-iger Collagenase IV bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die auf diese Weise gewonnene Suspension mit einem 70 mm Zellfilter von Rückständen befreit, dreimal zentrifugiert (Eppendorfzentrifuge, 2500 UpM, 3 min) und jeweils mit 1000 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die auf diese Weise isolierten Zellen in 1000 µl PBS resuspendiert und einer quantitativen Analyse auf EGFP zugeführt.

Für die Negativkontrolle wurden Herzen auf die gleiche Weise verarbeitet und anschließend im Durchflusszytometer untersucht, wobei keine Zellen transplantiert wurden.

Für die Positivkontrolle wurden Herzen 5 Minuten nach LAD-Ligation entnommen und direkt im Anschluss 3×10^6 EGFP-exprimierende Zellen in die Grenzzone des Infarktes injiziert. Danach wurden die Herzen wie oben beschrieben für die durchflusszytometrische Untersuchung verarbeitet. Da dabei alle injizierten Zellen in der Probe bleiben, wurden die gemessenen "Counts" 3×10^6 Zellen gleichgesetzt. Die Anzahl der im Herzen verbliebenen EGFP-Zellen wurden in den Gruppen 2-4 jeweils als Prozent dieser "Counts" angegeben.

Analytische Messungen wurden in PBS ohne Calcium (250 – 1000 µl pro Probe) nach Zugabe von Propidiumjodid (PI; 0,05 mg/ml) durchgeführt, so dass ausschließlich lebende Zellen bei der Auswertung erfasst werden konnten. Propidiumjodid diffundiert in nicht-vitale Zellen und färbt diese an, indem es an doppelsträngige DNA bindet. PI kann jedoch die Zellmembran lebender Zellen nicht überwinden und wird daher als spezifischer Marker für avitale Zellen in der Durchflusszytometrie genutzt [28, 115].

2.2.7. Versuchsaufbau

In allen Gruppen wurden, 5 Minuten nach operativer Induktion eines Myokardinfarktes, 3×10^6 murine Stammzellen in das Grenzgebiet des Infarktes injiziert.

Die Tiere der Gruppe 1 (*Tabelle 6*) erhielten mit FDG radiomarkierte GSES-Zellen und wurden anschließend einer dynamischen PET-Untersuchung zur Quantifizierung der am Injektionsort verbliebenen Zellen bis 120 Minuten p.i. unterzogen. Direkt im Anschluss erfolgte nach intravenöser Applikation von FDG eine statische PET-Untersuchung zum anatomischen Landmarking. Danach wurden die Tiere im narkotisierten Zustand per Genickbruch getötet.

Für die Gruppen 2-4 (*Tabelle 6*) wurden den Tieren 5 Minuten, 60 Minuten beziehungsweise 120 Minuten nach der Injektion von EGFP-exprimierenden Zellen die Herzen entnommen. Die Organe wurden wie oben beschrieben aufbereitet und die darin enthaltenen EGFP-Zellen konsekutiv durchflusszytometrisch quantifiziert.

Die beiden folgenden Abbildungen veranschaulichen das experimentelle Design der Studie, sowie die Einteilung der Gruppen.

Gruppe	Zellen	Zeitpunkt der Untersuchung p.i. in min	Methode	Anzahl der Tiere
1	GSES	25 - 125	PET	6
2	EGFP	5	FACS 5 min	6
3	EGFP	60	FACS 60 min	6
4	EGFP	120	FACS 120 min	6

Tabelle 6: Beschreibung der Gruppen

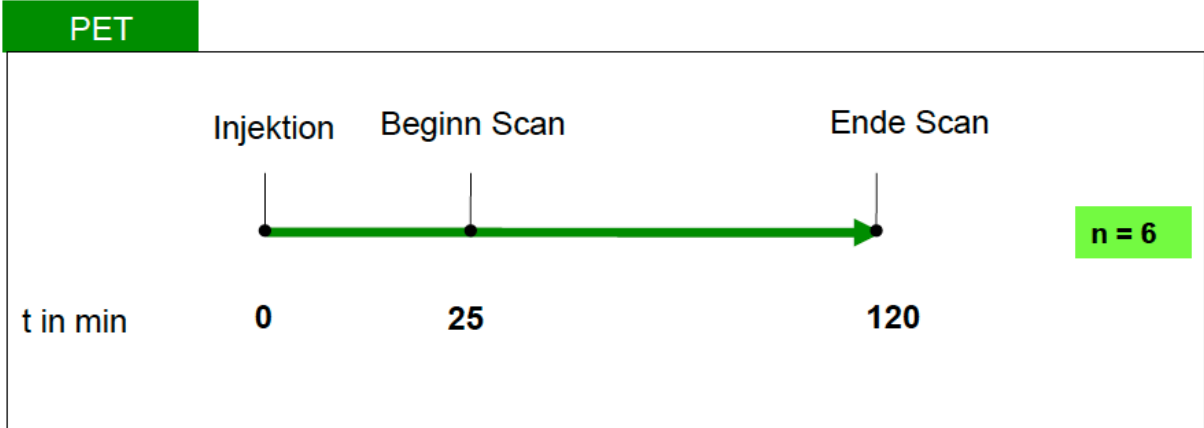
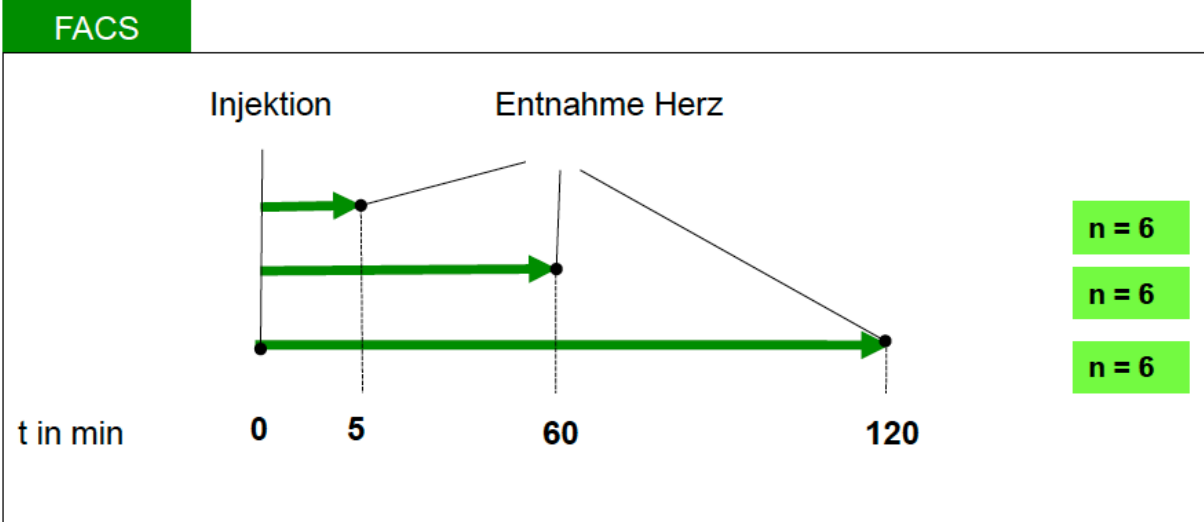


Abbildung 6: Experimenteller Aufbau der Arbeit

3. Ergebnisse

3.1. Radiotoxizität der Radiomarkierung

Im Hinblick auf die standardmäßige klinische Anwendung der kardialen PET-Bildgebung für das Tracking des Schicksals transplantierte Zellen ist es unabdingbar, sicherzustellen, dass das Radiopharmakon FDG von den damit markierten Zellen problemlos toleriert wird. Im klinischen Alltag ist FDG mittlerweile für diverse Fragestellungen in der nuklearmedizinischen Bildgebung fest etabliert und wird von Patienten gut vertragen. Desweiteren ist es wichtig, sicherzustellen, dass die transplantierten Zellen durch die Radiomarkierung nicht in ihrer Viabilität und Fähigkeit zu differenzieren beeinträchtigt werden.

Wie aus den Abbildungen 7 A - D ersichtlich ist, war direkt nach der Applikation von 40 MBq/ml (A) des Radiopharmakons (entsprechend 6-50 mBq/Zelle) und 45 Minuten nach der Applikation (B) keine Veränderung der Viabilität der ES-Zellkulturen zu beobachten. Kontrollen (C,D), welche im gleichen Medium, jedoch ohne [¹⁸F]-FDG, inkubiert wurden, zeigen zu den Analysezeitpunkten keine erkennbaren Unterschiede.

Auch beim weiteren Kultivieren und mehrfachen Splitten der Zellen über zwei Tage waren keine Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrolle feststellbar (Figure 1 E, F). Im Differenzierungsmedium bildeten sowohl behandelte Zellen als auch die Kontrollen normal wachsende EBs (Abbildung 7 G-J).

Somit war gezeigt, dass weder Viabilität noch Differenzierungsfähigkeit durch die Prozedur der Radiomarkierung verändert werden. Die transplantierten Zellen in Gruppe 1 wurden daraufhin mit jeweils 40 MBq/ml für 45 Minuten in DMEM inkubiert.

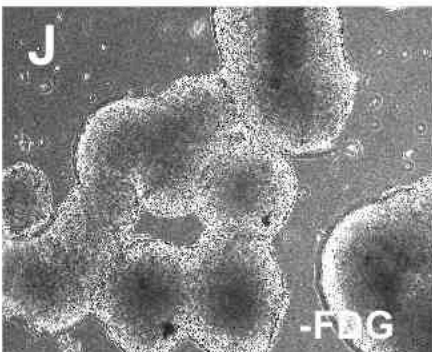
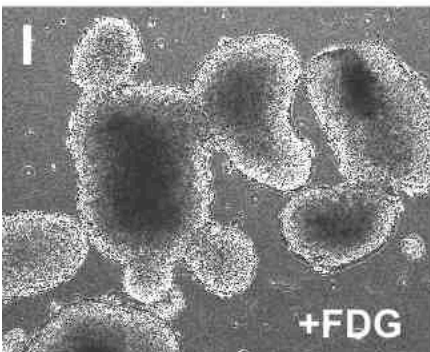
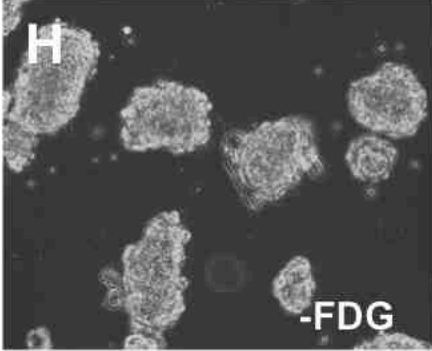
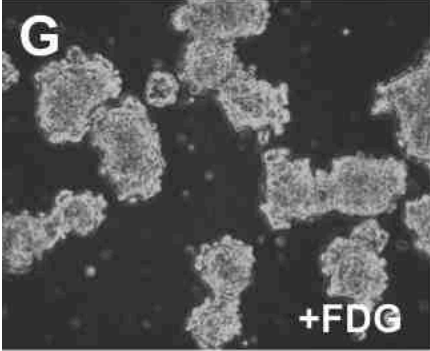
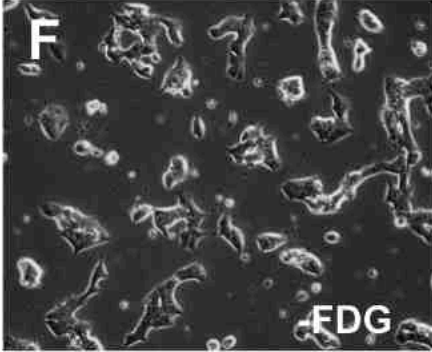
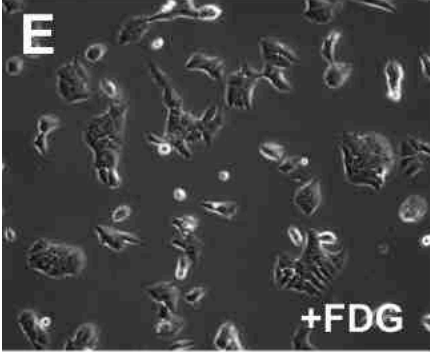
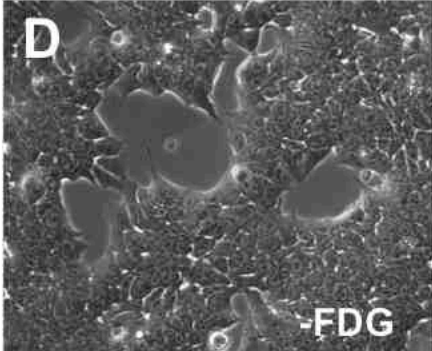
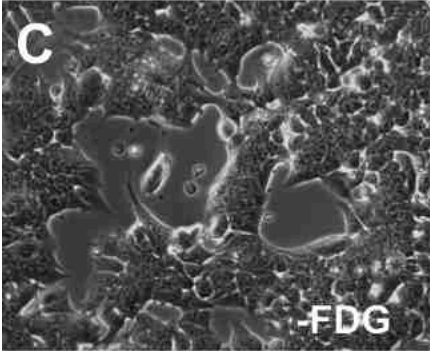
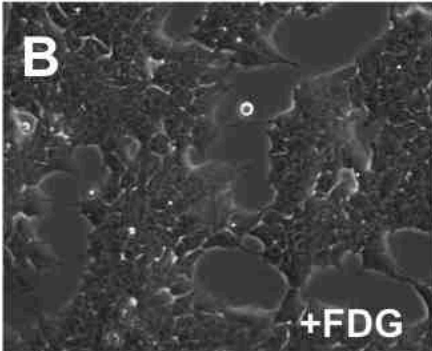
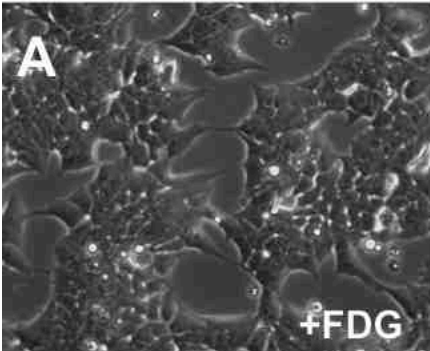


Abbildung 7:**Undifferenzierte mESC Kolonien:**

(A) vor der Zugabe von 40 MBq/ml [^{18}F]-FDG und (B) nach 45 Minuten Inkubationszeit.

(C) Kontrolle direkt nach Zugabe von Medium ohne [^{18}F]-FDG und (D) 45 Minuten später.

(E) [^{18}F]-FDG -behandelte und (F) Kontroll-Zellen nach zweitägigem Kultivieren und Splitten.

Differenzierende mESC Kolonien:

mit [^{18}F]-FDG behandelte Zellen 2 (G) und 5 (I) Tage nach Beginn der Differenzierung.

Kontrollen an Tag 2 (H) und Tag 5 (J) nach Beginn der Differenzierung.

3.2. Stabilität der Radiomarkierung

Zur Radiomarkierung von Zellen ist FDG hervorragend geeignet, da es über transmembranäre Glucosetransporter (GLUT) in die Zellen aufgenommen und dort wie Glucose phosphoryliert wird. Somit wird FDG pharmakologisch intrazellulär retiniert [49]. Allerdings wurde für verschiedene Zellpopulationen, wie humane Leukozyten oder murine MSCs, nach Radiomarkierung mit FDG ein kontinuierlicher Efflux von Aktivität aus den Zellen beobachtet [12, 135]. Dieser Effekt sollte für die in der vorliegenden Studie verwendeten Zellen erfasst und berücksichtigt werden. Im Analyszeitraum von zwei Stunden war nach der Markierung mit FDG ein kontinuierlicher Abfall der zellgebundenen Radioaktivität zu beobachten, welche im Folgenden als Prozent der initialen FDG-Aufnahme angegeben wird: 91,8% nach 20 Minuten, 81,1% nach 40 Minuten, 74,5% nach 60 Minuten und 49,7% nach 130 Minuten. Aus diesen Daten wurde eine Regressionsgerade berechnet, um möglichst genau den FDG-Efflux beschreiben und in das Modell einbeziehen zu können (Abbildung 8). Mithilfe dieser Funktion konnte für jeden im PET gemessenen Zeitpunkt ein entsprechender Korrekturfaktor errechnet werden. Damit war es möglich den *in-vitro* gemessenen Efflux in das *In-vivo*-Modell mit einzubeziehen.

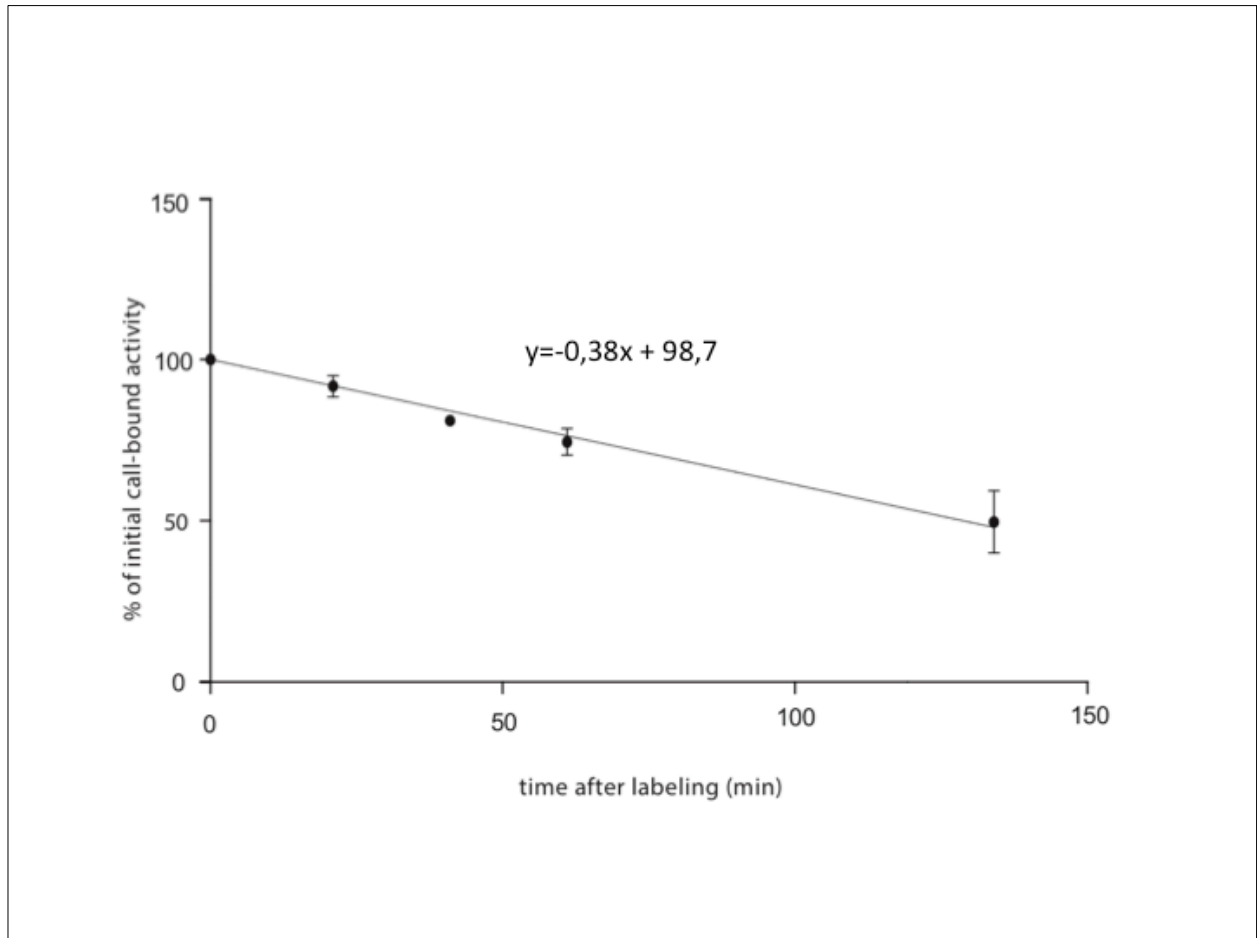


Abbildung 8:

Intrazelluläre FDG-Retention: Im Gammacounter wurde 20 min ($n=6$), 41 min ($n=6$), 62 min ($n=6$) und 132 min ($n=6$) nach Radiomarkierung mit FDG die Aktivität sowohl intrazellulär als auch im Überstand bestimmt. Die prozentuale Retention initial zellgebundener Aktivität wurde wie folgt berechnet: $(\text{Counts Zellen}) / (\text{Counts Zellen} + \text{Counts Überstand})$. Angegeben sind Mittelwerte der Messungen \pm SD.

3.3. Quantitative und qualitative PET-Bildgebung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die FDG-markierten Zellen nach intramyokardialer Injektion zu verfolgen und deren Retention im Myokard zu quantifizieren. Hierfür wurde zunächst eine dynamische Aufnahme zur Quantifizierung und Biodistribution der Zellen gemacht. Im Anschluss erfolgte nach systemischer intravenöser Applikation von FDG eine zweite, statische Aufnahme. Diese diente als "anatomisches Landmarking" (*Abbildung 9*) zur Lokalisation der transplantierten Zellen.

Durch dreidimensionale Fusion der dynamischen und statischen Aufnahmen war es möglich, das Infarktareal vom gesunden Myokard abzugrenzen und die radiomarkierten Zellen im Grenzgebiet des infarzierten Gewebes zu lokalisieren (*Abbildung 9, Abbildung 10*). Retentionsraten der injizierten Zellen wurden in n=6 Tieren kontinuierlich im Zeitraum von 25 Minuten bis 120 Minuten "post injectionem" (p.i.) bestimmt. Diese werden jeweils als Prozent der initial injizierten Zell- beziehungsweise Aktivitätsmenge (%ID) angegeben. Die gemessene Aktivitätsmenge im jeweiligen "Volume of Interest" (VOI) wurde anhand des oben beschriebenen Korrekturfaktors um den FDG-Efflux bereinigt.

Die Retention der Zellen betrug $5,3 \pm 1,1$ %ID nach 25 min., $5,0 \pm 0,9$ %ID nach 60 min. und $5,7 \pm 1,2$ %ID nach 120 min. Diese Ergebnisse deuten auf einen rapiden Verlust der Zellen am Transplantationsort innerhalb der ersten Minuten nach der Injektion hin. Im Verlauf weisen die gemessenen und normalisierten Aktivitäten jedoch keinen signifikanten Unterschied mehr auf (Minute 25 vs. Minute 60 $P=1.00$, Minute 60 vs. Minute 120 $P=0.27$). Die Menge retinierter Zellen bleibt nach dem initialen Verlust innerhalb der gemessenen Zeit konstant. Dies deutet an, dass die Phase des akuten "Washouts" innerhalb des gemessenen Zeitraumes von 120 Minuten nach der Injektion liegt.



Abbildung 9:

Dreidimensionale Bild-Fusion der transplantierten, in-vitro mit FDG markierten Zellen und der FDG- Landmarkingaufnahme

Zu sehen ist eine Ganzkörper-"Maximumintensitätsprojektion" (MIP), die aus der [¹⁸F]-FDG Landmarkingaufnahme rekonstruiert wurde (weiß).

Der gelbe Fleck, welcher im linken Ventrikel lokalisiert ist, stellt das FDG-Signal transplantierten Zellen dar. (Nicht-vitales Myokard kann in dieser Darstellung nicht abgegrenzt werden, da in der MIP-Aufnahme Regionen verschiedener Ebenen übereinanderliegen). Außer im Myokard wurde zellgebundene Aktivität in den Lungen detektiert (weiße Pfeile).

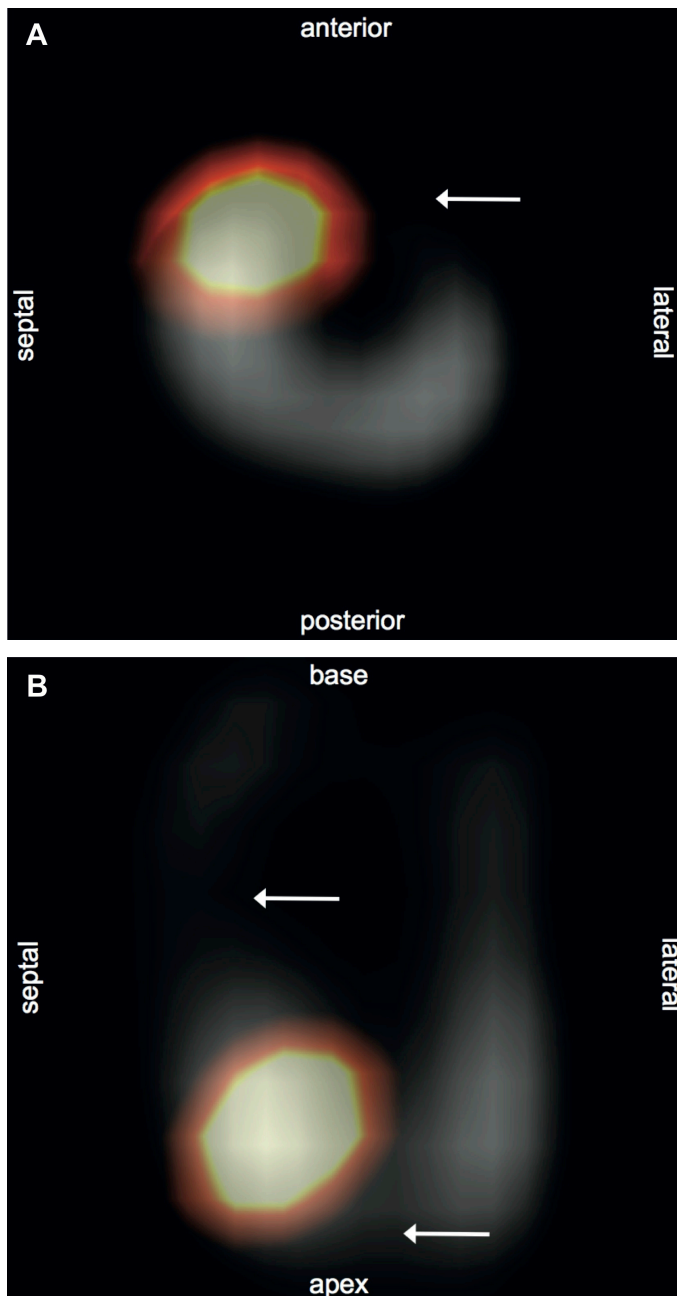


Abbildung 10: Lokalisierung der transplantierten Zellen innerhalb des Myokards

Repräsentative transaxiale (A) und koronare (B) Schnitte von Fusionsbildern aus transplantierten ES-Zellen (heller Fleck) und der Landmarkingaufnahme. Letzere wurde etwa 120 min p.i. erstellt. Im Landmarking kann eine FDG-Aufnahme ins vitale Myokard beobachtet werden, während im Infarktareal (weißer Pfeil) keine FDG-Aufnahme sichtbar ist. Die transplantierten Zellen (heller Fleck) sind im Grenzbereich des Infarktes lokalisiert.

Um qualitative Informationen über die Biodistribution des freien FDGs im Körper zu erhalten, wurden in den dynamischen PET Aufnahmen repräsentative VOIs über verschiedene Organe gelegt. Während in der Lunge die Aktivitätskonzentration abfiel war in der Blase ein Anstieg der Aktivitätskonzentration zu beobachten (Abbildung 11). Das Signal im Gehirn repräsentiert freies FDG im Körper und blieb während der gesamten Aufnahme niedrig. Dies deutet daraufhin, dass das ein Großteil der gemessenen Aktivität zellgebunden ist, während die systemische Aktivitätskonzentration keinen relevanten Einfluss auf die Messungen hat.

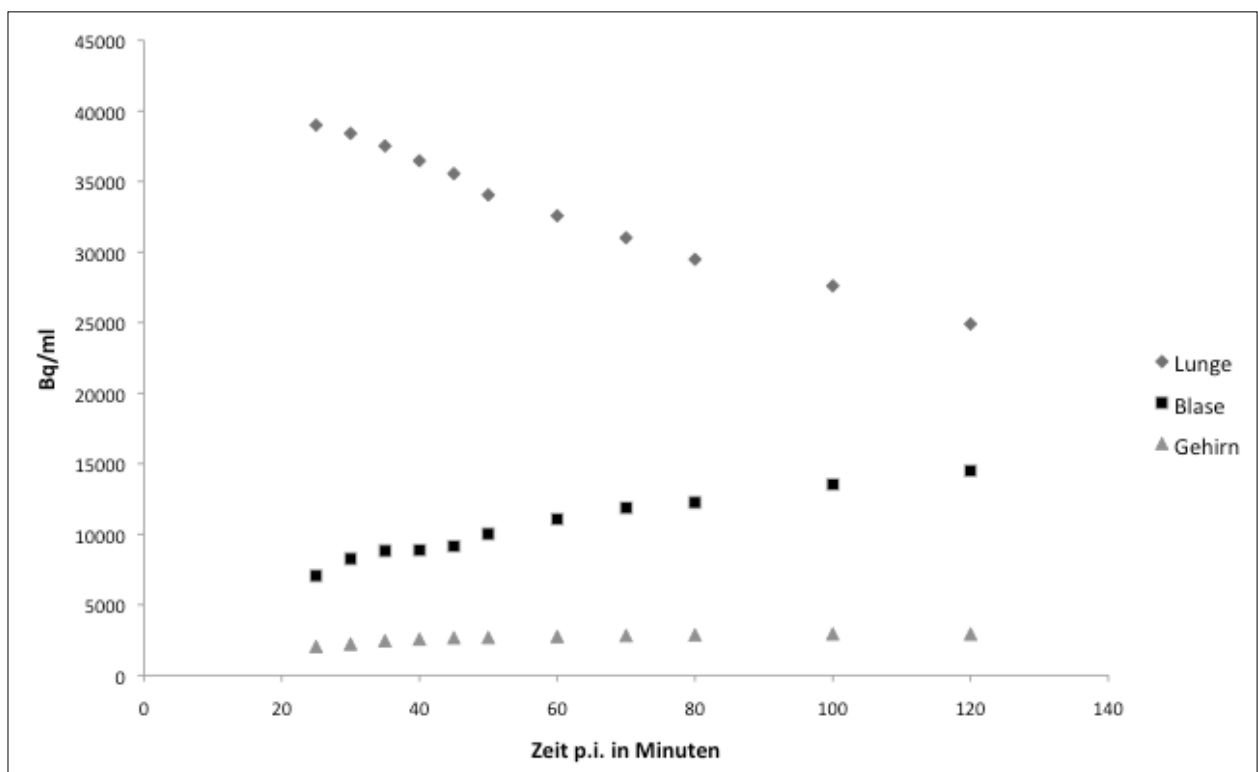


Abbildung 11: Zeit-Aktivitäts-Kurve (TAC) von Gehirn, Lunge und Harnblase

Repräsentative Daten aus den dynamischen Aufnahmen von Gehirn, Lunge und Harnblase deuten auf einen Efflux von $[^{18}\text{F}]$ -FDG aus den transplantierten Zellen hin. Das Signal im Gehirn repräsentiert die Aufnahme freien FDGs.

3.4. Ex-Vivo-Quantifizierung mittels qRT-PCR

Mit der hochsensitiven Methode des microPET deutete sich an, dass nur ein geringer Anteil der transplantierten Zellen am Injektionsort verbleibt. In der Annahme, dass die Retentionsrate etwa 5 % der 3×10^6 Zellen beträgt, war eine Methode nötig, mit der Zellzahlen im Bereich von 150 000 zuverlässig verifiziert werden können.

Da die verwendeten murinen Zellen im Hinblick auf zukünftiges longitudinales *In-vivo*-Imaging stabil mit dem humanen NIS transfiziert waren, bot sich die entsprechende konstitutiv exprimierte mRNA als idealer Marker zur qRT-PCR-basierten Zellquantifizierung an.

Nachdem aus den Experimenten im microPET die zu erwartende Retention im Bereich von 5 % lag, wurde bei der Erstellung der Eichkurve ein besonderes Augenmerk auf den Bereich der unteren 10^5 Zellen gelegt.

Zellzahl x 10^4	$2^{(-\Delta CT)}$	Faktor _(-ΔCT)
1	0,000113472	1
5	0,000171394	1,510455024
10	0,000367974	3,242868963
50	0,000948817	8,361706326
100	0,001694678	14,93481037
500	0,003166721	27,90758402
1000	0,005954209	52,47308699
5000	0,032698183	288,1616152
Kontrollherz	0,000097327	0,857723425

Abbildung 12: Messwerte der qRT-PCR für die Erstellung einer Eichgerade von Zellzahl und CT-Wert: Im Zielbereich der Messung (rot markiert) weichen Zellzahlen und Faktor_(- ΔCT) deutlich voneinander ab. Der $2^{(-\Delta CT)}$ -Wert des Kontrollherzens (grau markiert) liegt im unteren Bereich der Zellzahlen von besonderem Interesse.

Für eine zuverlässige Eichgerade müssen die $2^{(-\Delta CT)}$ -Werte - die der Menge der hNIS-mRNA entspricht - proportional zur Zahl der eingesetzten Zellen sein. Zur Erstellung dieser Eichgerade wurden cDNA aus Zellproben synthetisiert, die sich jeweils um den Faktor 2 oder 5 unterschieden (*Abbildung 11*).

In der Gegenüberstellung der Zellzahlen und der entsprechenden $2^{(-\Delta CT)}$ -Werte sollten also "Zellzahl x 10^4 " und Faktor_($-\Delta CT$) übereinstimmen. Dies ist insbesondere im kritischen Bereich um 10^5 Zellen nicht der Fall und die Erstellung einer Eichkurve der erforderlichen Genauigkeit somit nicht möglich.

Zudem liegt der gemessene $2^{(-\Delta CT)}$ -Wert für hNIS-cDNA im Bereich des Wertes von 10^4 Zellen. Das heißt, dass im Zielbereich das Messergebnis durch das Vorhandensein von cDNA aus dem myokardialen Gewebe stark beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund wurde für die *Ex-vivo*-Quantifizierung der Zellen alternativ die Durchflusszytometrie gewählt, welche eine Messung auf Einzelzellebene gewährleistet [50].

3.5. Validierung der quantitativen PET-Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie

Das Ziel der Arbeit war, die am Ort der Transplantation retinierten Zellen in der frühen Phase von zwei Stunden p.i. möglichst exakt quantifizieren zu können. Um die dafür eingesetzte Methode der Positronenemissionstomographie zu verifizieren, wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Dazu wurden murine EGFP-überexprimierende ES-Zellen transplantiert. Die Herzen wurden je nach Gruppe 5 Minuten, 60 Minuten oder 120 Minuten p.i. entnommen, zur Analyse aufbereitet und im Durchflusszytometer auf die Anzahl retinierter Zellen untersucht. Als Referenzwert diente die Messung der "Counts" aus der Positivkontrolle. Dazu waren 3×10^6 EGFP-exprimierende Zellen in ein explantiertes Herz injiziert worden. Die Herzen wurden wie in den folgenden Versuchen zur durchflusszytometrischen Untersuchung aufbereitet und gemessen. Die Anzahl der "Counts" wurde gleich 100% der injizierten Zellen gleichgesetzt. Im Durchflusszytometer wurden kardiale Retentionsraten transplantiertter Zellen von jeweils $5,4 \pm 2,3$ % 5 min (n=6), $6,4 \pm 1,3$ % 60 min (n=6) und $4,8 \pm 1,7$ % nach 120 min nach der Injektion in die Grenzzone des Infarktes gemessen (*Abbildung 13*). Diese Daten unterschieden sich nicht signifikant von den in den PET-Untersuchungen gemessenen Retentionsraten und bestätigen damit die Anwendbarkeit der auf OSEM 3D / MAP-Rekonstruktion beruhenden Methode zur Quantifizierung der transplantierten Zellen (*Abbildung 14*).

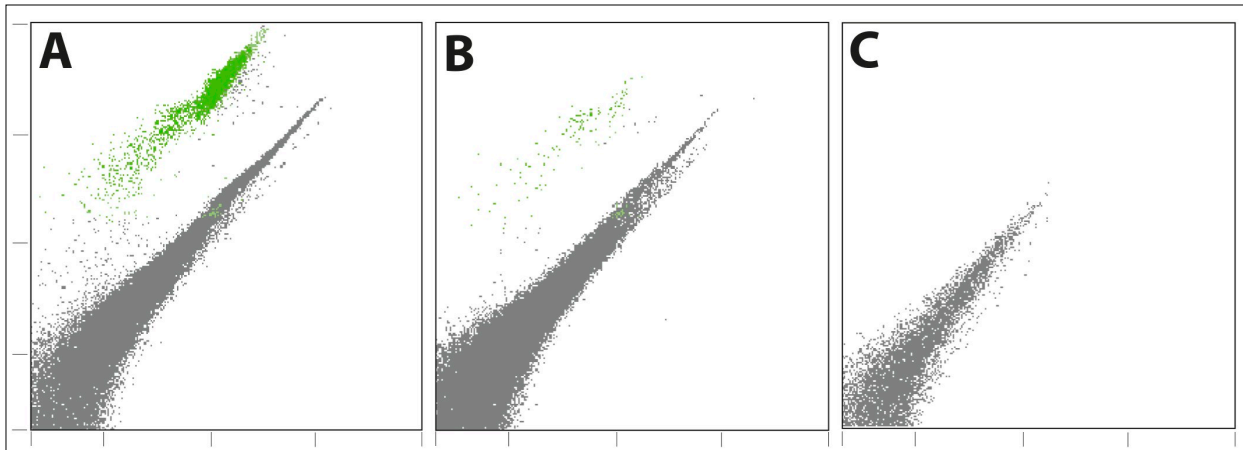


Abbildung 13: Ex-vivo-Verifizierung der Zellretentionsraten nach intramyokardialer Injektion mittels Durchflusszytometer

Bilder repräsentativer durchflusszytometrischer Messungen, bei denen dissoziierte Herzen auf transplantierte EGFP-exprimierende Zellen untersucht wurden. Die graue Wolke stellt die Zellpopulation des Empfängergewebes dar, während die grüne Wolke die transplantierten Zellen darstellt.

(A) Positivkontrolle: Ex-vivo-Injektion von 3×10^6 Zellen, unmittelbar nach Entnahme des Herzens. Grün markierte Zellen stellen 100 % der injizierten Zellfraktion dar.

(B) Herzentnahme 5 Minuten nach In-vivo-Zellinjektion von 3×10^6 EGFP-exprimierender Zellen. 5 % der injizierten Zellen sind zu diesem Zeitpunkt noch im Herzen nachweisbar.

(C) Negativkontrolle: Entnommenes Herz ohne injizierte Zellen.

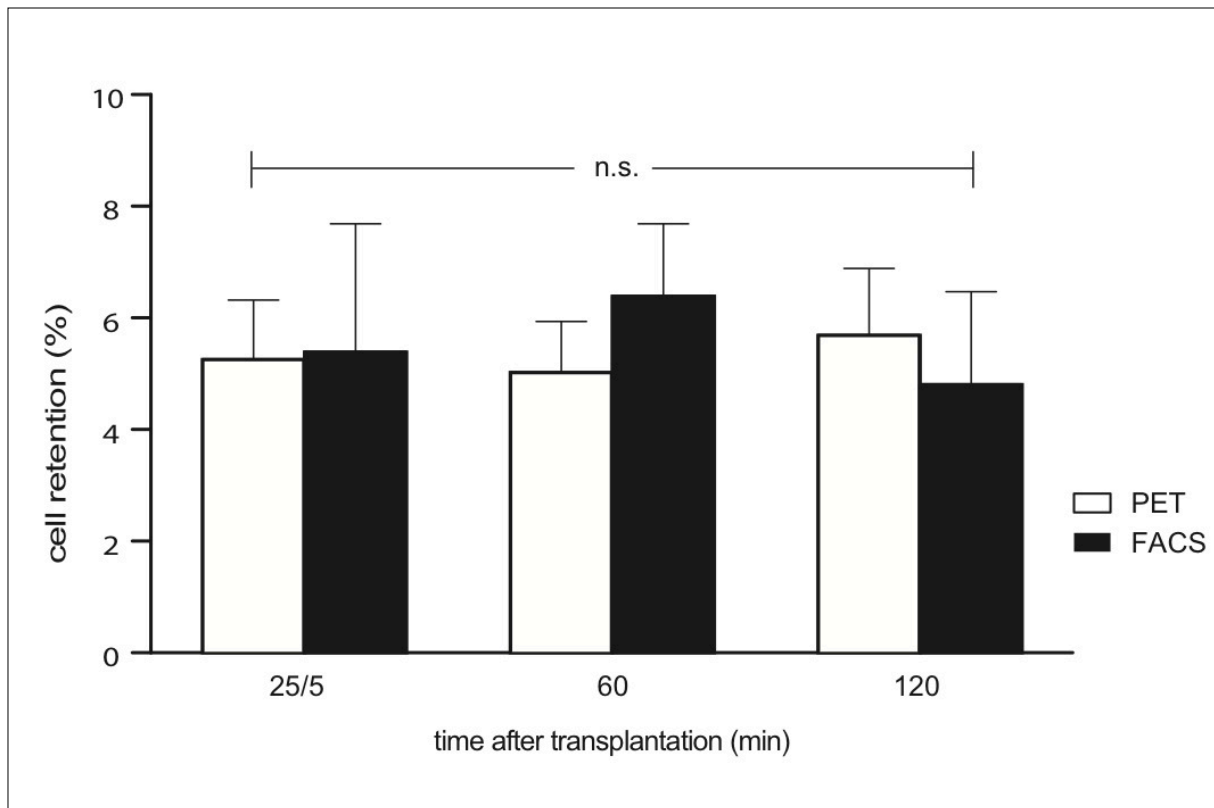


Abbildung 14: Gemessene Zellretention nach intramyokardialer Zellinjektion in der PET und im Durchflusszytometer

Die durchflusszytometrisch gemessenen Retentionsraten nach 5 min ($n=6$), 60 min ($n=6$) und 120 min ($n=6$) unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($p>0,05$). In gleicher Weise war bei den aus PET-Aufnahmen bestimmten Retentionsraten nach 25 min, 60 min und 120 min ($n=6$) kein signifikanter Unterschied feststellbar. Außerdem unterschieden sich die mit den jeweils verwendeten Techniken ermittelten Retentionsraten nicht signifikant voneinander ($p=0,9, 0,06, 0,3$). Angegeben sind Durchschnittswerte \pm SD. Damit bestätigt sich, dass die Quantifizierungsmethode von FDG-markierten Zellen im PET valide ist.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode zum Positronen-Emissions-Tomographie basierten *In-vivo*-Imaging der initialen Retention intramyokardial injizierter Stammzellen im Mausmodell etabliert werden. Die wesentlichen Ergebnisse waren:

1. Etablierung einer quantitativen *In-vivo*-Zellverfolgungstechnik im Mausmodell.
2. Optimierung der quantitativen zellulären Bildgebung durch Verwendung der Rekonstruktionsalgorithmen OSEM 3D und MAP, sowie der Einführung einer Efflux-Korrektur.
3. Verifizierung der PET-Ergebnisse zur Quantifizierung von transplantierten Zellen mittels Durchflusszytometrie *ex-vivo* auf zellulärer Ebene.
4. Nach intramyokardialer Zellapplikation findet ein akuter Zellverlust statt, sodass bereits nach 5 Minuten nur noch 5 % der transplantierten Zellen am Injektionsort sind. Diese Retentionsrate bleibt über 120 Minuten p.i. konstant.
5. Der Grund für den akuten Zellverlust ist eine mechanische Auswaschung, die dazu führt, dass die Zellen in der pulmonalkapillären Strombahn stecken bleiben.

4.1. Das Mausmodell in der kardialen Stammzelltherapie

Um die Relevanz der Etablierung des Mausmodells für das *In-vivo*-Tracking von Stammzellen zu verstehen, ist es wichtig, sich vor Augen zu führen, wie und warum Modellorganismen für bestimmte Fragestellungen eingesetzt werden. Dies soll im Folgenden für die kardiale Stammzelltherapie veranschaulicht werden.

Im Jahre 1992 wurde von Marelli et al. erstmals das Konzept der kardialen Zelltherapie vorgeschlagen [83]. Zwei Dekaden später liegen bereits Ergebnisse aus randomisierten klinischen Studien vor, welche die therapeutische Wirksamkeit von adulten Stammzellen, wie BMSCs, zur Therapie nach Myokardinfarkt belegen [146].

Obwohl die Translation in die Klinik also bereits erfolgt ist, bleiben auf dem Weg "from bench to bedside" die zentralen Fragen nach dem Optimum hinsichtlich Zelltyp und Zahl, sowie Zeitpunkt und Route der Applikation noch immer weitgehend ungeklärt [141].

Derartige Fragestellungen können in einem geeigneten Modellorganismus präklinisch untersucht werden. Vereinfacht lässt sich die Entwicklung einer neuen Therapie auf zellulärer oder molekularer Ebene in drei Stufen einteilen:

1. "Proof of the principle": Identifizierung eines Zielproteins/Signalweges
2. Überprüfen der Wirksamkeit einer bestimmten Therapie
3. klinische Translation

Für jedes dieser Stadien sind jeweils bestimmte Modellorganismen besonders geeignet.

Das Mausmodell ist kostengünstig und hat zudem eine kurze Generationszeit. Somit können leicht größere Fallzahlen für Studien und folglich eine höhere statistische Teststärke erreicht werden. Der größte Vorteil ist jedoch die Verfügbarkeit zahlreicher relevanter transgener und Knockout-Stämme [140]. Damit stellt die Maus das Tiermodell der Wahl dar, wenn es darum geht, Zielgene und -proteine für die Entwicklung neuer molekularer und pharmakologischer Therapien zu identifizieren [101].

Kleintiermodelle waren zwar maßgeblich am Verständnis der kardialen Pathophysiologie des Menschen beteiligt, jedoch unterscheiden sich Nager- und Menschenherz hinsichtlich Architektur, Frequenz und Proteinexpression voneinander [140]. Für den Schritt der klinischen Translation ist es daher wichtig, Großtiermodelle einzusetzen, da in letzteren die gleichen technischen Mittel und Zugangswege, z.B. NOGA Mapping und CT-Koronarangiographie [126], wie am Patienten verwendet werden können. Aufgrund der

ähnlichen Größe und kollateralen Koronarversorgung von humanen und porcinen Herzen ist das Schweinemodell hierfür am besten geeignet [101]. Die kardiale Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt mit dem Ziel der Geweberegeneration hat zwar alle oben aufgeführten Stufen der Therapieentwicklung durchlaufen, jedoch fehlt immer noch die Antwort auf die grundlegende Frage nach Zielproteinen und -signalwegen, die der therapeutischen Wirksamkeit zugrunde liegen. Solange also die molekularen Wirkmechanismen und die Interaktion intramyokardial transplanteder Zellen mit dem Zielwebe nicht besser verstanden sind, ist es kaum möglich, das Potenzial der kardialen Stammzelltherapie voll auszuschöpfen. Für diese grundlegenden Fragestellungen sind genetisch modifizierbare Tiere unabdingbar, um Zielgene und -proteine zu identifizieren [101, 140].

Zur Überprüfung der Wirksamkeit molekularer und pharmakologischer Therapien kardiovaskulärer Krankheiten werden meistens Ratten verwendet [101]. Diese sind ähnlich wie Mäuse günstig zu halten und bieten zudem Vorteile hinsichtlich verfügbarer technischer Geräte und der einfachen Durchführbarkeit von operativen Eingriffen. So wurden in mehreren präklinischen Studien FDG-markierte Zellen intramyokardial transplantiert und deren Retention konsekutiv mittels PET-Bildgebung quantifiziert [11, 129].

Das Mausmodell ist jedoch für grundlegende biomedizinische Fragestellungen aufgrund der weiten Verfügbarkeit embryonaler Stammzellen und genetisch modifizierbarer Tiere dem Rattenmodell klar überlegen [101, 140].

Hinzu kommt, dass die murine Stammzellbiologie - im Vergleich zu allen anderen kardiovaskulären Tiermodellen - viel weiter entwickelt ist. Seit 1981 sind murine ESCs verfügbar [84], murine iPS-Zellen wurden erstmals 2006 generiert [124] und 2008 wurde zum ersten Mal die Erzeugung von Kardiomyozyten aus murinen IPS-Zellen publiziert [86]. 2009 gelang es David et al. durch Vorwärtsprogrammierung aus murinen ESCs kardiovaskuläre Vorläuferzellen zu erzeugen [34]. Vor Kurzem gelang es zwei Gruppen sogar durch direktes Reprogrammieren aus murinen Fibroblasten Kardiomyozyten zu gewinnen [42, 60].

Im Gegensatz dazu sind gegenwärtig nur wenige Ratten ESC Linien verfügbar [56]. Erst seit 2008 ist es möglich Ratten ESCs undifferenziert in Kultur zu halten. Die erste transgene Ratte wurde im Gegensatz zur Maus (1982 [100]) sogar erst im Jahre 2010 erzeugt [65]. Letztlich wurde das kardiovaskuläre Differenzierungspotential von Ratten iPS Zellen- im Gesetz zu jenem von Maus IPS Zellen - bisher noch nicht beschrieben.

Die Generation von iPS-Zellen aus Großtiermodellen wie Schwein und Hund ist seit 2009 (Schwein [43]) und 2010 (Hund [118]) zwar möglich, allerdings können für beide Tiermodelle ES-Zellen unter Kulturbedingungen nicht in undifferenziertem Zustand gehalten werden [133].

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass das Rattenmodell im Gegensatz zum Mausmodell zum aktuellen Stand der Forschung nicht das Kleintiermodell der Wahl für genetische Modifikationen ist. Außerdem fehlen Techniken, um größere Mengen transplantierbarer, aus Stammzellen hergestellter Kardiomyozyten zu gewinnen.

Aus diesem Grund ist es von großer Relevanz, dass nun eine zuverlässige und klinisch anwendbare Methode für das quantitative *In-vivo*-Tracking des Schicksals intramyokardial transplantierter Stammzellen im Mausmodell verfügbar ist.

4.2. PET: Bildrekonstruktion

Das größte Hindernis um PET-basierte Bildgebung kardialer Stammzelltherapien im Mausmodell zu etablieren, liegt in der höheren Auflösung, welche im Vergleich zu größeren Tiermodellen notwendig ist.

Deshalb stand bei Studien zum kardialen Zell-Tracking bisher das Rattenmodell im Vordergrund, für welches die Verwendung OSEM-2D-basierter Rekonstruktionsalgorithmen ausreichend ist [11, 129].

Um PET-basierte Bildgebung für das Mausmodell zu etablieren, wurde eine Kombination aus dem dreidimensionalen iterativen Rekonstruktionsalgorithmus OSEM 3D und dem iterativen Rekonstruktionsalgorithmus MAP verwendet. Gründe dafür waren die folgenden:

Mit OSEM 3D / MAP lässt sich eine durchschnittliche räumliche Auflösung von $1,65 \pm 0,06$ mm über das gesamte Sichtfeld erreichen, wodurch die hohe räumliche Auflösung und Sensitivität des Inveon microPETs ausgenutzt werden kann. Dadurch ist diese Technik den 2D Rekonstruktionsalgorithmen deutlich überlegen [132].

Zudem wurde kürzlich eine Studie publiziert, in welcher gezeigt werden konnte, dass sich Aktivitätskonzentrationen unter der Verwendung des MAP-Algorithmus wesentlich exakter bestimmen lassen, als mit einer 2D-basierten Rekonstruktion. Diese Überlegenheit beruht vor allem auf einer besseren räumlichen Auflösung und einem geringeren Partialvolumeneffekt [25].

Die verwendeten OSEM 3D und fastMAP Rekonstruktionsalgorithmen sind in der Rekonstruktionssoftware des Herstellers enthalten. Deren Verwendung wurde von Disselhorst et al. ausführlich beschrieben [37]. Die einzelnen Parameter - Anzahl der Frames und Iterationen, Vergrößerungsfaktor, β , Größe der Matrix - wurden vom Autor der Studie so gewählt, dass ein optimales Bild rekonstruiert werden konnte.

4.3. Stabilität der Radiomarkierung

Das Prinzip der zellulären Radiomarkierung mit FDG beruht auf der Eigenschaft tierischer Zellen, FDG als Glukoseanalogon, über Glukosetransporter (GLUT) ins Zellinnere zu transportieren und dort durch das Enzym Hexokinase zu phosphorylieren. Da das phosphorylierte FDG jedoch nicht der Glykolyse zugeführt wird, wird es als Tracer intrazellulär "getrappt" [49].

Allerdings wird nicht das gesamte aufgenommene FDG sofort phosphoryliert, sondern steht vielmehr in einem Gleichgewicht aus Phosphorylierung, Dephosphorylierung, Transport in die Zelle und einem Efflux aus der Zelle hinaus [20, 135].

Dabei spielt für das Zell-Tracking vor allem der Efflux von FDG nach der Radiomarkierung eine bedeutende Rolle. So konnten Botti et al. 2 Stunden nach der Radiomarkierung von Lymphozyten mit FDG einen Efflux von fast 50% des initial in die Zellen aufgenommenen FDGs messen [12].

Das freigesetzte FDG trägt jedoch nicht zu einem signifikanten Hintergrundsignal bei, da es vom Gewebe, welches die transplantierten Zellen umgibt, nur zu einem kleinen Teil aufgenommen wird [135]. Der Großteil des freigesetzten Radiopharmakons wird über den systemischen Blutkreislauf im ganzen Körper verteilt.

Aus diesem Grund wurde von Blackwood et al. erstmals vorgeschlagen, bei der Etablierung von Methoden zur Quantifizierung radiomarkierter intramyokardial transplantierte Zellen, das aus letzteren freigesetzte Radiolabel im Zielorganismus mit einzuberechnen [8].

Um dieses Konzept zu integrieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der zelluläre Efflux von FDG *in-vitro* im zeitlichen Verlauf bestimmt. Mit der daraus errechneten Regressionsgeraden konnte der zelluläre Efflux in die Quantifizierung der Aktivität in den analysierten VOIs miteinbezogen werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Menge retinierter Zellen mit einer hohen Genauigkeit zu bestimmen.

Durch die Kombination dieser Korrektur mit der hochsensitiven PET-Bildgebung konnte in der vorliegenden Arbeit eine genaue Methode etabliert werden, radiomarkierte Zellen nach intramyokardialer Injektion zu verfolgen und im Zeitverlauf Aktivitätskonzentrationen am Transplantationsort zu messen.

4.4. Qualitative RT-PCR

Um die oben beschriebene PET-basierte Methode für die *in-vivo* Quantifizierung intramyokardial transplantierte Zellen zu überprüfen, sollten die damit festgestellten Retentionsraten im Zeitverlauf mit einem etablierten Messverfahren *ex-vivo* verifiziert werden. Dafür war in einigen publizierten Studien die quantitative PCR (qPCR) eingesetzt worden. Entweder auf der Ebene genomischer DNA mittels qPCR [48, 92, 129] oder der Genexpression mittels qRT-PCR [57, 75]. Für die Quantifizierung über genomische DNA dient meist das SRY-Gen männlicher Spenderzellen in einem weiblichen Empfängertier als Zielgen. Über die relative Menge an Kopien des SRY-Gens im Verhältnis zu einem autosomalen Gen, wie z.B. Osteopontin, wurde in diesen Studien versucht, die absolute Zahl transplantierte männlicher Zellen in weiblichen Herzen der Empfängertiere zu ermitteln [92].

Ein Nachteil dieser Methode ist, dass weder autologe Transplantationen noch Zellapplikationen des gleichen Geschlechts quantifiziert werden können. Für anschließende Studien ist geplant, autologe, aus iPSCs gewonnene kardiomyozytär differenzierte Zellen zu transplantieren. Aus diesem Grund erschien die Etablierung einer Methode zur Quantifizierung auf Genexpressionsebene für die vorliegende Arbeit sinnvoller.

Le Visage et al. applizierten in einer Studie zum Tracking von MSCs transgene Zellen, welche das Markerprotein GFP überexprimieren [75]. Über das Verhältnis der Expression von GFP zu für native Proteine kodierende mRNAs wie GAPDH, konnten die transplantierte Zellen über eine qRT-PCR quantifiziert werden.

Analog dazu wurden in der vorliegenden Arbeit murine Zellen transplantiert, welche den humanen Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) überexprimieren. Da nur ein einziger Zellklon eingesetzt wurde, wurde angenommen, dass die Menge der ins Genom integrierter DNA jeweils die gleiche ist. Da die Zellen im Zielgewebe des Empfängertiers kein hNIS exprimieren, sollte nach Normierung auf die Expression von GAPDH eine Quantifizierung der transplantierte Zellen mittels qRT-PCR möglich sein.

Allerdings stellte sich bereits beim Erstellen der Eichkurve heraus, dass die Quantifizierung definierter Zellzahlen im Zielbereich von circa 10^5 Zellen ziemlich ungenau ist und die gemessenen Werte durch in den Proben enthaltene kardiale DNA deutlich beeinflusst wird. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit statt der qRT-PCR die Durchflusszytometrie zur Bestimmung der zellulären Retentionsraten *ex-vivo* verwendet (siehe 4.5.).

4.5. Quantitative PET *In-vivo*-Bildgebung und Validierung mittels

Durchflusszytometrie

Sowohl in der PET als auch durchflusszytometrisch wurden zum jeweils frühest möglichen Zeitpunkt Retentionsraten von etwa 5% gemessen. Dieser Zeitpunkt war aus technischen Gründen in der Durchflusszytometrie 5 Minuten und in der PET 25 Minuten nach der Injektion der Zellen in die Randzone des Infarktes.

Es tritt also ein massiver Zellverlust innerhalb der ersten Minuten nach Transplantation auf.

In der dynamischen Messung bis 120 Minuten nach der Injektion waren keine signifikanten Änderungen der Retentionsraten messbar. Diese Beobachtung bestätigt die Hypothese, dass der initiale massive Zellverlust die größte Hürde für ein erfolgreiches Anwachsen der Zellen im Zielgewebe ist [128].

Auch andere Gruppen haben Studien publiziert, in welchen ebenfalls ein massiver Zellverlust - wenn auch weniger ausgeprägt - nach intramyokardialer Injektion von Zellen im Rattenmodell gezeigt werden konnte [11, 129]. Vergleichbare *In-vivo*-Studien für das Mausmodell existieren bisher allerdings nicht.

Der dieser Beobachtung zugrunde liegende Mechanismus wurde bereits von Bonios et al. im Rattenmodell beschrieben [11]. Es ist anzunehmen, dass die injizierten Zellen über das lymphatisch-venöse System und den Sinus coronarius in den rechten Vorhof gespült werden und von dort aus über den rechten Ventrikel in den Lungenkreislauf gelangen. Hier bleiben sie aufgrund ihrer Größe in den pulmonalen Kapillaren stecken [11]. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie auch im Mausmodell gemacht werden, da die transplantierten Zellen vor allem in den Lungen detektiert wurden (*Abbildung 4*).

Die Ursache für diesen Zellverlust ist wahrscheinlich mechanischer Natur und wird maßgeblich durch die Kontraktilität des Herzens bestimmt. Diese These untermauern Versuche von Terrovitis et al. (2009), in welchen sie Zellen in kardioplegierte Herzen von Ratten injizierten, beziehungsweise nach Zellapplikation den Stichkanal mit Fibrinkleber verschlossen. Durch beide Maßnahmen konnte die zelluläre Retention - durch die Minimierung der mechanischen Extrusion des schlagenden Herzens - signifikant erhöht werden [129].

Dieser Zusammenhang erklärt auch, warum die initialen Retentionsraten im Mausmodell noch geringer sind als jene, die von Terrovitis et al. und Bonios et al. im Rattenmodell

beobachtet wurden, denn Ratten haben mit circa 300 s^{-1} eine deutlich niedrige Herzfrequenz als Mäuse mit circa 600 s^{-1} .

Nach diesem massiven Zellverlust direkt nach der Transplantation bleibt die Retentionsrate am Injektionsort mit 5% jedoch bis 120 min p.i. stabil.

Die mittels PET-Bildgebung gewonnenen Daten wurden mit einer unabhängigen Technik *ex-vivo* verifiziert. Dazu wurden murine EGFP-überexprimierende ES-Zellen entsprechend dem gleichen Protokoll wie für die PET-Messungen nach LAD-Okklusion transplantiert. Die Quantifizierung der retinierten Zellen erfolgte dann nach Entnahme des Herzens durchflusszytometrisch. In vergleichbaren Studien im Rattenmodell wurde bislang die qualitative RT-PCR verwendet [11, 129], welche jedoch lediglich indirekte Informationen über die transplantierten Zellen im Sinne eines CT-Wertes liefert. Zudem konnten wir zeigen (*siehe 4.4.*), dass die Zellquantifizierung mittels qRT-PCR über das Reportergen hNIS im Zielbereich um 10^5 Zellen keine ausreichend genaue Methode für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist.

Aus diesem Grund wurde die Durchflusszytometrie verwendet, welche den Vorteil bietet, transplantierte ESCs auf zellulärer Ebene zu quantifizieren [50]. Die Retentionsraten von 5% konnten sogar schon 5 Minuten p.i. durchflusszytometrisch verifiziert werden.

Wie oben beschrieben, konnte mittels PET ein Großteil der transplantierten Zellen in den Lungen detektiert werden (*Abbildung 9*). Dort verblieben sie relativ lang nach der Injektion, was die intrazelluläre Lokalisierung des FDG bestätigt. Der *In-vivo*-Efflux konnte indirekt beobachtet werden, da freies FDG vor allem über die Harnwege ausgeschieden wurde, was sich in einer ansteigenden Aktivitätskonzentration in der Blase äußerte.

Trotz der hohen Expression von Hexokinase im Gehirn [49] war die zerebrale FDG-Aufnahme gering. Dieser Effekt lässt sich durch die Narkose mit Isofluran erklären. Ähnliche Beobachtungen wurden vor kurzem von Wolfs et al. publiziert [135].

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die PET-basierte Methode sehr gut funktioniert. Da nur vitale Zellen in der durchflusszytometrischen Messung berücksichtigt wurden, ist zudem davon auszugehen, dass hauptsächlich lebendige Zellen in der VOI zur Quantifizierung erfasst wurden.

5. Zusammenfassung

In den letzten zwanzig Jahren wurde die kardiale Stammzelltherapie unter verschiedensten Aspekten untersucht. Für die Applikation von Knochenmarkstammzellen nach akutem Myokardinfarkt konnte in klinischen Studien bereits eine therapeutische Wirksamkeit nachgewiesen werden. Die diesem positiven Effekt zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher lediglich marginal verstanden. Zudem wurde das ultimative Ziel des Ersatzes untergegangenen Myokards bisher nicht erreicht.

Seit kurzem besteht die Möglichkeit, aus iPS-Zellen durch Vorwärtsprogrammierung Kardiomyozyten in brauchbaren Mengen zu generieren und durch geeignete Verfahren hochspezifisch aufzureinigen. Damit können die Hürden der embryonalen Stammzelltherapie wie ethische Bedenken, Immunogenität und Teratogenität überwunden werden.

Für einen Myokardersatz durch *in-vitro* erzeugte Herzzellen ist es jedoch unabdingbar, das Schicksal der transplantierten Zellen und deren Interaktion mit dem Zielgewebe zu verstehen.

Dafür ist das Verständnis grundlegender Mechanismen, wie Signalwegen und beteiligten Proteinen, eine unabdingbare Voraussetzung. Genau für diese Fragestellungen ist das Mausmodell mit seiner hervorragenden genetischen Modifizierbarkeit, am besten geeignet. Für das Mausmodell gab es bislang jedoch keine, für die klinische Translation geeignete Methode, das initiale Schicksal intramyokardial transplantierte Stammzellen *in-vivo* zu verfolgen.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode für das Mausmodell etabliert, mit welcher das Schicksal FDG-markierter Stammzellen während der initialen Phase nach Injektion quantitativ und hochsensitiv mittels Positronen-Emissions-Tomographie dargestellt werden kann.

Es zeigte sich, dass die initiale Auswaschung für den Großteil des frühen Zellverlustes verantwortlich ist. So waren bereits nach wenigen Minuten nur noch 5 % der transplantierten Zellen am Injektionsort lokalisiert. Über die Zeitspanne der Messung blieb die Retentionsrate von 5% jedoch konstant. Ein Großteil der ausgewaschenen Zellen konnte über den Zeitraum der Messung von 120 Minuten p.i. in den Lungen detektiert werden. Alle Messergebnisse, welche unter Verwendung der PET-basierten Methode generiert wurden, konnten mit einer unabhängigen *Ex-vivo*-Messtechnik verifiziert werden. Hierfür wurde die Durchflusszytometrie verwendet, welche eine Zellquantifizierung auf Einzelzellebene ermöglicht.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung einer verbesserten initialen Retention transplantiertes Stammzellen. Gleichzeitig stellt sie eine nuklearmedizinische Methode zu Verfügung, mit welcher die initiale Retention *in-vivo* hochsensitiv und auf quantitativer Ebene dargestellt werden kann. Für die Optimierung der kardialen Zelltherapie, steht damit ein geeignetes Bildgebungsverfahren zur Verfügung.

6. Publikationsliste

6.1. Fachzeitschriften

Lang C., Lehner S., Todica A., Boening G., Franz W.-M., Bartenstein P., Hacker M., David R.
Positron Emission Tomography Based In-vivo Imaging of Early Phase Stem Cell Retention after Intramyocardial Delivery in the Mouse Model
European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (2013) 40:1730-1738

6.2. Kongressbeiträge

Lehner S., **Lang C.**, Todica A., Bartenstein P., David R., Franz W., Hacker M.
Homing und Tracking intramyokardial transplantierte Stammzellen am Infarktmodell der Maus
Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, Leipzig, 2010

Lehner S., **Lang C.**, Bartenstein P., Franz W., Hacker M.
Homing and Tracking of Stem Cells with microPET after Intramyocardial Transplantation in the Infarcted Murine Heart
Molekulare Bildgebung, Seon, 2010

Lang C., Lehner S., Todica A., Franz W.-M., Bartenstein P., Hacker M., David R.
Stammzelltracking am Infarktmodell der Maus mittels Positronen-Emissionstomographie
Doktamed, LMU München, 2011 (**Posterpreis**)

Lang C., Lehner S., Todica A., Boening G., Franz W.-M., Bartenstein P., Hacker M., David R.
In-Vivo Cardiac Stem Cell Tracking in the Mouse Model based on Positron Emission Tomography
„Cardiac Regeneration and Biology“ Konferenz, San Servolo, Venedig, Italien 2012

Lang C., Lehner S., Todica A., Boening G., Franz W.-M., Bartenstein P., Hacker M., David R.
*Positron Emission Tomography Based In-vivo Imaging of Early Phase Stem Cell Retention
after Intramyocardial Delivery in the Mouse Model*

„Cardiac Regeneration and Biology“ Konferenz, San Servolo, Venedig, Italien 2013

7. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. W.-M. Franz danke ich für die profunde wissenschaftliche Ausbildung, die ich in seiner Arbeitsgruppe erhalten habe und die Möglichkeit meine forschende Kreativität frei und voll unterstützt ausleben zu dürfen. Diese Erfahrung hat mich motiviert und den Wunsch gefestigt, meine berufliche Zukunft der medizinischen Forschung zu widmen.

Herrn Prof. Dr. med. P. Bartenstein, Herrn Prof. Dr. med. M. Hacker und Herrn Dr. med. Sebastian Lehner danke ich für die exzellente Kooperationen bei der Durchführung von Experimenten in der Nuklearmedizinischen Klinik. Dank des mir entgegengebrachten vollkommenen Vertrauens konnte ich auch in der nuklearmedizinischen Bildgebung wertvolle Erfahrungen sammeln und eigene Ideen maximal unterstützt umsetzen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. David danke ich für die intensive Betreuung und Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe. Von der Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten bis hin zu einem exzellenten Mentoring beim Schreiben von Publikationen und Erstellen von Vorträgen fühlte ich mich jederzeit bestens unterstützt. Zu guter Letzt verdanke ich ihm auch die Fortschritte im Sportklettern, die ich während der Arbeit in der AG Franz machen konnte.

Frau Dr. vet. med. Rebekka Fischer, Frau Julia Jung, meinen Ko-Doktoranden A. Todica, H. Ilhan, T. Weinberger, A. Segeth und M. Zacherl danke ich für die angenehme Zeit im Labor und die kamerdschaftliche Hilfe beim Durchführen von Experimenten sowie beim Erlernen und Etablieren von neuen Techniken.

Frau J. Arcifa, C. Gross und B. Markieton danke ich für die technische Unterstützung bei der Durchführung und Vorbereitung von Experimenten.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden, sowie Frau Gabriela Wiedemann für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums.

8. Abkürzungsverzeichnis

% ID	Prozent der injizierten Dosis
^{99m}Tch	metastabiles Technetium
BLI	Biolumineszenz-Bildgebung
BMSC	Knochenmarkstammzelle
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CT	Computertomographie
d	Tag
DMSO	Dimercaptobernsteinsäure
EB	Embryoid bodies
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ES	Embryonale Stammzelle
FCS	Fötales Kälberserum
FDG	[¹⁸ F]-Fluorodeoxyglucose
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
hiPS	humane induzierte pluripotente Stammzelle
hNIS	humaner Natrium-Jodid-Symporter
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSP	Hitzeschockprotein
HSV-tk	Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase
i.c.	intrakoronar
i.d.R.	in der Regel
i.m.	intramyokardial
ICD	Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator

iPS	induzierte pluripotente Stammzelle
k.A.	keine Angabe
LAD	left anterior descending artery
LIF	Leukemia inhibitory factor
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MACS	Magnetic Associated Cell Sorting
MAP	ordinary-Poisson maximum a-priori
MBq	Megabecquerel
mES	murine embryonale Stammzelle
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MIP	Maximumintensitätsprojektion
miPS	murine induzierte pluripotente Stammzelle
Mo	Monat
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stammzelle
NaOH	Natriumhydroxid
OSEM 3 D	ordered subset expectation maximization
p.i.	post injectionem
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	Propidiumjodid
PTCA	perkutane transluminale Koronarangioplastie
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
SPIO	Superparamagnetisches Eisenoxid
TAC	Zeit-Aktivitäts-Kurve
T_{1/2}	Halbwertszeit
Tx	Transplantation
UpM	Umdrehungen pro Minute

VEGF	Vascular Endothelial Groth Factor
VOI	Volume of Interest

9. Literaturverzeichnis

1. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, Badorff C, Massoudi S, Assmus B, Eckey T, Henze E, Zeiher AM, Dimmeler S (2003) Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 107:2134-2139
2. Alhadlaq A, Mao JJ (2004) Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem cells and development* 13:436-448
3. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM (2005) Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:11474-11479
4. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC (2004) Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668-673
5. Bassand JP, Anguenot T (1991) [Physiopathology of left ventricular remodeling after myocardial infarction]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 84 Spec No 4:43-49
6. Bittira B, Kuang JQ, Al-Khaldi A, Shum-Tim D, Chiu RC (2002) In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *The Annals of thoracic surgery* 74:1154-1159; discussion 1159-1160
7. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, Ivanova S, Streubel B, Hauser E, Freilinger M, Hoger H, Elbe-Burger A, Wachtler F (1999) Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and embryology* 199:391-396
8. Blackwood KJ, Lewden B, Wells RG, Sykes J, Stodilka RZ, Wisenberg G, Prato FS (2009) In vivo SPECT quantification of transplanted cell survival after engraftment using (111)In-tropolone in infarcted canine myocardium. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 50:927-935
9. Bondue A, Blanpain C (2010) Mesp1: a key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circulation research* 107:1414-1427
10. Bondue A, Tannler S, Chiapparò G, Chabab S, Ramialison M, Paulissen C, Beck B, Harvey R, Blanpain C (2011) Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *The Journal of cell biology* 192:751-765
11. Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, Engles JM, Higuchi T, Lautamaki R, Yu J, Fox J, Pomper M, Wahl RL, Tsui BM, O'Rourke B, Bengel FM, Marban E, Abraham MR (2011) Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere-derived cells. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 18:443-450
12. Botti C, Negri DR, Seregini E, Ramakrishna V, Arienti F, Maffioli L, Lombardo C, Bogno A, Pascali C, Crippa F, Massaron S, Remonti F, Nerini-Molteni S, Canevari S, Bombardieri E (1997) Comparison of three different methods for radiolabelling human activated T lymphocytes. *European journal of nuclear medicine* 24:497-504

13. Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK (2007) Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 110:1362-1369
14. Brenner W, Aicher A, Eckey T, Massoudi S, Zuhayra M, Koehl U, Heeschen C, Kampen WU, Zeiher AM, Dimmeler S, Henze E (2004) ¹¹¹In-labeled CD34+ hematopoietic progenitor cells in a rat myocardial infarction model. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 45:512-518
15. Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, Urbich C, Rosenthal N, Zeiher AM, Dimmeler S (2008) Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. *Circulation research* 103:203-211
16. Cai W, Zhang Y, Kamp TJ (2011) Imaging of Induced Pluripotent Stem Cells: From Cellular Reprogramming to Transplantation. *American journal of nuclear medicine and molecular imaging* 1:18-28
17. Callera F, de Melo CM (2007) Magnetic resonance tracking of magnetically labeled autologous bone marrow CD34+ cells transplanted into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with chronic spinal cord injury: CD34+ cells' migration into the injured site. *Stem cells and development* 16:461-466
18. Campion DR (1984) The muscle satellite cell: a review. *International review of cytology* 87:225-251
19. Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, Drukker M, Dylla SJ, Connolly AJ, Chen X, Weissman IL, Gambhir SS, Wu JC (2006) In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 113:1005-1014
20. Caraco C, Aloj L, Chen LY, Chou JY, Eckelman WC (2000) Cellular release of [¹⁸F]2-fluoro-2-deoxyglucose as a function of the glucose-6-phosphatase enzyme system. *The Journal of biological chemistry* 275:18489-18494
21. Carpenter L, Carr C, Yang CT, Stuckey DJ, Clarke K, Watt SM (2012) Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that provide protection following myocardial infarction in the rat. *Stem cells and development* 21:977-986
22. Caulfield JB, Leinbach R, Gold H (1976) The relationship of myocardial infarct size and prognosis. *Circulation* 53:141-144
23. Caveliers V, De Keulenaer G, Everaert H, Van Riet I, Van Camp G, Verheye S, Roland J, Schoors D, Franken PR, Schots R (2007) In vivo visualization of ¹¹¹In labeled CD133+ peripheral blood stem cells after intracoronary administration in patients with chronic ischemic heart disease. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 51:61-66
24. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP (2004) Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 94:92-95
25. Cheng JC, Shoghi K, Laforest R (2012) Quantitative accuracy of MAP reconstruction for dynamic PET imaging in small animals. *Medical physics* 39:1029-1041
26. Cheng K, Li TS, Malliaras K, Davis DR, Zhang Y, Marban E (2010) Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circulation research* 106:1570-1581
27. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL (1995) Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *The Annals of thoracic surgery* 60:12-18

28. Crissman HA, Steinkamp JA (1982) Rapid, one step staining procedures for analysis of cellular DNA and protein by single and dual laser flow cytometry. *Cytometry* 3:84-90
29. Dai B, Huang W, Xu M, Millard RW, Gao MH, Hammond HK, Menick DR, Ashraf M, Wang Y (2011) Reduced collagen deposition in infarcted myocardium facilitates induced pluripotent stem cell engraftment and angiomyogenesis for improvement of left ventricular function. *Journal of the American College of Cardiology* 58:2118-2127
30. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA (2005) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 112:214-223
31. David R, Brenner C, Stieber J, Schwarz F, Brunner S, Vollmer M, Mentele E, Muller-Hocker J, Kitajima S, Lickert H, Rupp R, Franz WM (2008) MesP1 drives vertebrate cardiovascular differentiation through Dkk-1-mediated blockade of Wnt-signalling. *Nature cell biology* 10:338-345
32. David R, Groebner M, Franz WM (2005) Magnetic cell sorting purification of differentiated embryonic stem cells stably expressing truncated human CD4 as surface marker. *Stem Cells* 23:477-482
33. David R, Schwarz F, Rimmbach C, Nathan P, Jung J, Brenner C, Jarsch V, Stieber J, Franz WM (2013) Selection of a common multipotent cardiovascular stem cell using the 3.4-kb MesP1 promoter fragment. *Basic research in cardiology* 108:312
34. David R, Stieber J, Fischer E, Brunner S, Brenner C, Pfeiler S, Schwarz F, Franz WM (2009) Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types. *Cardiovascular research* 84:263-272
35. de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, van Krieken JH, Boerman OC, Oyen WJ, Bonenkamp JJ, Boezeman JB, Adema GJ, Bulte JW, Scheenen TW, Punt CJ, Heerschap A, Figdor CG (2005) Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nature biotechnology* 23:1407-1413
36. Dingli D, Russell SJ, Morris JC, 3rd (2003) In vivo imaging and tumor therapy with the sodium iodide symporter. *Journal of cellular biochemistry* 90:1079-1086
37. Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Slump CH, Boerman OC, Oyen WJ, Gotthardt M, Visser EP (2010) Image-quality assessment for several positron emitters using the NEMA NU 4-2008 standards in the Siemens Inveon small-animal PET scanner. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 51:610-617
38. Donndorf P, Strauer BE, Haverich A, Steinhoff G (2013) Stem cell therapy for the treatment of acute myocardial infarction and chronic ischemic heart disease. *Current pharmaceutical biotechnology* 14:12-19
39. Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA (2005) Washout of transplanted cells from the heart: a potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovascular research* 67:301-307
40. Dowell JD, Rubart M, Pasumarthi KB, Soonpaa MH, Field LJ (2003) Myocyte and myogenic stem cell transplantation in the heart. *Cardiovascular research* 58:336-350
41. Dubois NC, Craft AM, Sharma P, Elliott DA, Stanley EG, Elefanty AG, Gramolini A, Keller G (2011) SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 29:1011-1018

42. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, Chen J, Ding S (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature cell biology* 13:215-222
43. Esteban MA, Xu J, Yang J, Peng M, Qin D, Li W, Jiang Z, Chen J, Deng K, Zhong M, Cai J, Lai L, Pei D (2009) Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. *The Journal of biological chemistry* 284:17634-17640
44. Fang J, Mensah GA, Croft JB, Keenan NL (2008) Heart failure-related hospitalization in the U.S., 1979 to 2004. *Journal of the American College of Cardiology* 52:428-434
45. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530
46. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL (2006) A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *European heart journal* 27:1114-1122
47. Fu Y, Azene N, Xu Y, Kraitchman DL (2011) Tracking stem cells for cardiovascular applications in vivo: focus on imaging techniques. *Imaging in medicine* 3:473-486
48. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppens SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, Barton PJ, Terracciano CM, Yacoub MH, Suzuki K (2007) Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation* 115:2254-2261
49. Gallagher BM, Fowler JS, Gutterson NI, MacGregor RR, Wan CN, Wolf AP (1978) Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [¹⁸F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 19:1154-1161
50. Goddard G, Martin JC, Naivar M, Goodwin PM, Graves SW, Habbersett R, Nolan JP, Jett JH (2006) Single particle high resolution spectral analysis flow cytometry. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 69:842-851
51. Grossman PM, Han Z, Palasis M, Barry JJ, Lederman RJ (2002) Incomplete retention after direct myocardial injection. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 55:392-397
52. Gupta R, Losordo DW (2010) Challenges in the translation of cardiovascular cell therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 51 Suppl 1:122S-127S
53. Hansson EM, Lendahl U (2013) Regenerative medicine for the treatment of heart disease. *Journal of internal medicine* 273:235-245
54. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tijssen JG, van der Giessen WJ, Tio RA, Waltenberger J, ten Berg JM, Doevendans PA, Aengevaeren WR, Zwaginga JJ, Biemond BJ, van Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F (2011) Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *European heart journal* 32:1736-1747
55. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 111:2198-2202
56. Hong J, He H, Weiss ML (2011) Derivation and Characterization of Embryonic Stem Cells Lines Derived from Transgenic Fischer 344 and Dark Agouti Rats. *Stem cells and development*

57. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, Murakami T, Kobayashi E (2009) Intra-articular Injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 27:878-887
58. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, Yeung AC, Johnstone BH, Yock PG, March KL (2005) Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation* 112:1150-156
59. Hudson W, Collins MC, deFreitas D, Sun YS, Muller-Borer B, Kypson AP (2007) Beating and arrested intramyocardial injections are associated with significant mechanical loss: implications for cardiac cell transplantation. *The Journal of surgical research* 142:263-267
60. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142:375-386
61. Iglesias-Garcia O, Pelacho B, Prosper F (2013) Induced pluripotent stem cells as a new strategy for cardiac regeneration and disease modeling. *Journal of molecular and cellular cardiology*
62. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of clinical investigation* 107:1395-1402
63. Joggerst SJ, Hatzopoulos AK (2009) Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert reviews in molecular medicine* 11:e20
64. Kang WJ, Kang HJ, Kim HS, Chung JK, Lee MC, Lee DS (2006) Tissue distribution of ¹⁸F-FDG-labeled peripheral hematopoietic stem cells after intracoronary administration in patients with myocardial infarction. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 47:1295-1301
65. Kawamata M, Ochiya T (2011) Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68:1911-1915
66. Kawamura M, Miyagawa S, Miki K, Saito A, Fukushima S, Higuchi T, Kawamura T, Kuratani T, Daimon T, Shimizu T, Okano T, Sawa Y (2012) Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 126:S29-37
67. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation* 108:407-414
68. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467:285-290
69. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine* 7:430-436
70. Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ (1993) Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *The Journal of clinical investigation* 92:1548-1554

71. Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbart M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK (2006) Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *The Journal of experimental medicine* 203:2315-2327
72. Kutschka I, Chen IY, Kofidis T, Arai T, von Degenfeld G, Sheikh AY, Hendry SL, Pearl J, Hoyt G, Sista R, Yang PC, Blau HM, Gambhir SS, Robbins RC (2006) Collagen matrices enhance survival of transplanted cardiomyoblasts and contribute to functional improvement of ischemic rat hearts. *Circulation* 114:1167-173
73. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, Reinecke H, Xu C, Hassanipour M, Police S, O'Sullivan C, Collins L, Chen Y, Minami E, Gill EA, Ueno S, Yuan C, Gold J, Murry CE (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology* 25:1015-1024
74. Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, Muskheli V, Murry CE (2005) Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *The American journal of pathology* 167:663-671
75. Le Visage C, Gournay O, Benguirat N, Hamidi S, Chaussumier L, Mougnot N, Flanders JA, Isnard R, Michel JB, Hatem S, Letourneur D, Norol F (2012) Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue engineering. Part A* 18:35-44
76. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S (2003) Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7808-7811
77. Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lutzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK, Steinhoff G (2007) Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 25:2118-2127
78. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367:1747-1757
79. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K (2006) Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 355:1199-1209
80. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of clinical investigation* 103:697-705
81. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, Dzau VJ (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nature medicine* 9:1195-1201
82. Mannheim JG, Judenhofer MS, Schmid A, Tillmanns J, Stiller D, Sossi V, Pichler BJ (2012) Quantification accuracy and partial volume effect in dependence of the attenuation correction of a state-of-the-art small animal PET scanner. *Physics in medicine and biology* 57:3981-3993

83. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC (1992) Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell transplantation* 1:383-390
84. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:7634-7638
85. Matsuura K, Wada M, Shimizu T, Haraguchi Y, Sato F, Sugiyama K, Konishi K, Shiba Y, Ichikawa H, Tachibana A, Ikeda U, Yamato M, Hagiwara N, Okano T (2012) Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 425:321-327
86. Mauritz C, Schwanke K, Reppel M, Neef S, Katsirntaki K, Maier LS, Nguemo F, Menke S, Hausteiner M, Hescheler J, Hasenfuss G, Martin U (2008) Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118:507-517
87. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagege AA (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117:1189-1200
88. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-280
89. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2006) 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* 113:1287-1294
90. Miyagawa M, Anton M, Wagner B, Haubner R, Souvatzoglou M, Gansbacher B, Schwaiger M, Bengel FM (2005) Non-invasive imaging of cardiac transgene expression with PET: comparison of the human sodium/iodide symporter gene and HSV1-tk as the reporter gene. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 32:1108-1114
91. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B (1997) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology* 17:5317-5327
92. Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW, Kedes L (2002) Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34:107-116
93. 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 (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664-668
94. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ (2007) The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* 204:3037-3047
95. Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD, Li RK (2006) Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and ventricular function. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 291:H939-947

96. Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14:840-850
97. Nygren JM, Jovinge S, Breitbart M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004) Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine* 10:494-501
98. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-317
99. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P (1990) Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circulation research* 67:23-34
100. Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615
101. Patten RD, Hall-Porter MR (2009) Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circulation. Heart failure* 2:138-144
102. Pease S, Williams RL (1990) Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Experimental cell research* 190:209-211
103. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29:e45
104. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T, Hochedlinger K (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 28:848-855
105. Psaltis PJ, Simari RD, Rodriguez-Porcel M (2012) Emerging roles for integrated imaging modalities in cardiovascular cell-based therapeutics: a clinical perspective. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 39:165-181
106. Reddig PJ, Juliano RL (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer metastasis reviews* 24:425-439
107. Reinecke H, Minami E, Poppa V, Murry CE (2004) Evidence for fusion between cardiac and skeletal muscle cells. *Circulation research* 94:e56-60
108. Reinecke H, Poppa V, Murry CE (2002) Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *Journal of molecular and cellular cardiology* 34:241-249
109. Retuerto MA, Schalch P, Patejunas G, Carbray J, Liu N, Esser K, Crystal RG, Rosengart TK (2004) Angiogenic pretreatment improves the efficacy of cellular cardiomyoplasty performed with fetal cardiomyocyte implantation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 127:1041-1049; discussion 1049-1051
110. Richards JM, Shaw CA, Lang NN, Williams MC, Semple SI, MacGillivray TJ, Gray C, Crawford JH, Alam SR, Atkinson AP, Forrest EK, Bienek C, Mills NL, Burdess A, Dhaliwal K, Simpson AJ, Wallace WA, Hill AT, Roddie PH, McKillop G, Connolly TA, Feuerstein GZ, Barclay GR, Turner ML, Newby DE (2012) In vivo mononuclear cell tracking using superparamagnetic particles of iron oxide: feasibility and safety in humans. *Circulation. Cardiovascular imaging* 5:509-517

111. Robey TE, Saiget MK, Reinecke H, Murry CE (2008) Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *Journal of molecular and cellular cardiology* 45:567-581
112. Roca M, de Vries EF, Jamar F, Israel O, Signore A (2010) Guidelines for the labelling of leucocytes with (111)In-oxine. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 37:835-841
113. Rodriguez-Porcel M (2010) In vivo imaging and monitoring of transplanted stem cells: clinical applications. *Current cardiology reports* 12:51-58
114. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, Le Tourneau T, Agostini D, Gaxotte V, Sportouch C, Galinier M, Crochet D, Teiger E, Richard MJ, Polge AS, Beregi JP, Manrique A, Carrie D, Susen S, Klein B, Parini A, Lamirault G, Croisille P, Rouard H, Bourin P, Nguyen JM, Delasalle B, Vanzetto G, Van Belle E, Lemarchand P (2011) Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *European heart journal* 32:1748-1757
115. Sasaki DT, Dumas SE, Engleman EG (1987) Discrimination of viable and non-viable cells using propidium iodide in two color immunofluorescence. *Cytometry* 8:413-420
116. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 355:1210-1221
117. Schots R, De Keulenaer G, Schoors D, Caveliers V, Dujardin M, Verheye S, Van Camp G, Franken PR, Roland J, Van Riet I, Everaert H (2007) Evidence that intracoronary-injected CD133+ peripheral blood progenitor cells home to the myocardium in chronic postinfarction heart failure. *Experimental hematology* 35:1884-1890
118. Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T (2010) Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Molecular reproduction and development* 77:2
119. Stadtfeld M, Hochedlinger K (2010) Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development* 24:2239-2263
120. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2001) [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 126:932-938
121. Su CY, Chong KY, Owen OE, Dillmann WH, Chang C, Lai CC (1998) Constitutive and inducible hsp70s are involved in oxidative resistance evoked by heat shock or ethanol. *Journal of molecular and cellular cardiology* 30:587-598
122. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Smolenski RT, Varela-Carver A, Fukushima S, Coppens SR, Partridge TA, Yacoub MH (2004) Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18:1153-1155
123. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872
124. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676

125. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD, Kraus WE (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature medicine* 4:929-933
126. Templin C, Zweigerdt R, Schwanke K, Olmer R, Ghadri JR, Emmert MY, Muller E, Kuest SM, Cohrs S, Schibli R, Kronen P, Hilbe M, Reinisch A, Strunk D, Haverich A, Hoerstrup S, Luscher TF, Kaufmann PA, Landmesser U, Martin U (2012) Transplantation and tracking of human-induced pluripotent stem cells in a pig model of myocardial infarction: assessment of cell survival, engraftment, and distribution by hybrid single photon emission computed tomography/computed tomography of sodium iodide symporter transgene expression. *Circulation* 126:430-439
127. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musialek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ (2009) Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *European heart journal* 30:1313-1321
128. Teng CJ, Luo J, Chiu RC, Shum-Tim D (2006) Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: implications for cellular cardiomyoplasty. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 132:628-632
129. Terrovitis J, Lautamaki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, Leppo MK, Pomper MG, Wahl RL, Seidel J, Tsui BM, Bengel FM, Abraham MR, Marban E (2009) Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *Journal of the American College of Cardiology* 54:1619-1626
130. Terrovitis J, Stuber M, Youssef A, Preece S, Leppo M, Kizana E, Schar M, Gerstenblith G, Weiss RG, Marban E, Abraham MR (2008) Magnetic resonance imaging overestimates ferumoxide-labeled stem cell survival after transplantation in the heart. *Circulation* 117:1555-1562
131. Terrovitis JV, Smith RR, Marban E (2010) Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circulation research* 106:479-494
132. Visser EP, Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Gotthardt M, Oyen WJ, Boerman OC (2009) Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 50:139-147
133. Volk SW, Theoret C (2013) Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 21:382-394
134. Welling MM, Duijvestein M, Signore A, van der Weerd L (2011) In vivo biodistribution of stem cells using molecular nuclear medicine imaging. *Journal of cellular physiology* 226:1444-1452
135. Wolfs E, Struys T, Notelaers T, Roberts SJ, Sohni A, Bormans G, Van Laere K, Luyten FP, Gheysens O, Lambrichts I, Verfaillie CM, Deroose CM (2013) 18F-FDG labeling of mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells for PET imaging: effects on ultrastructure and differentiation capacity. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 54:447-454

136. Wu JC, Abraham MR, Kraitchman DL (2010) Current perspectives on imaging cardiac stem cell therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 51 Suppl 1:128S-136S
137. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation research* 91:501-508
138. Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M (2007) In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42:441-448
139. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW (2004) Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 109:3154-3157
140. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, Tarin C, Mas S, Ortiz A, Egido J (2011) Animal models of cardiovascular diseases. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011:497841
141. Zhang JJ (2013) The Mechanisms of Cell Therapy for Clinical Investigations: An Urgent Need for Large-Animal Models. *Circulation*
142. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE (2001) Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology* 33:907-921
143. Zhang SJ, Wu JC (2007) Comparison of imaging techniques for tracking cardiac stem cell therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 48:1916-1919
144. Zhu J, Zhou L, XingWu F (2006) Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *The New England journal of medicine* 355:2376-2378
145. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature medicine* 12:452-458
146. Zimmet H, Porapakham P, Porapakham P, Sata Y, Haas SJ, Itescu S, Forbes A, Krum H (2012) Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *European journal of heart failure* 14:91-105
147. Zvibel I, Smets F, Soriano H (2002) Anoikis: roadblock to cell transplantation? *Cell transplantation* 11:621-630

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Cajetan Lang, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Positronen-Emissions-Tomographie basiertes In-Vivo Imaging der initialen Retention intramyokardial injizierter Stammzellen im Mausmodell

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand