

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

Konstruktion von künstlichem Herzgewebe aus Herzzellen der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Isabel Stoll, geb. Armbrüster

aus

Nürnberg

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 27.08.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. W.-H. Zimmermann

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. St. Baldus

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

**Gewidmet meinem Großvater
Eugen Rall**

1	<u>Einleitung</u>	4
1.1	<u>Epidemiologie der Herzinsuffizienz</u>	4
1.2	<u>Klinik und Ursachen der Herzinsuffizienz</u>	5
1.3	<u>Aktuelle Therapie der Herzinsuffizienz</u>	5
1.4	<u>Molekularbiologische Zusammenhänge kardiovaskulärer Erkrankungen</u>	6
1.5	<u>Modelle zur Validierung neuer Therapieansätze</u>	7
1.6	<u>Gewebeersatzstrategien</u>	9
1.7	<u>Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit</u>	12
2	<u>Material und Methoden</u>	13
2.1	<u>Zellisolation</u>	13
2.1.1	Tierhaltung und Genehmigung	13
2.1.2	Organentnahme	13
2.1.3	Zellpräparation	14
2.1.4	Trypsinverdau	14
2.2	<u>Kardiomyozyten Einzelschichtkulturen</u>	16
2.2.1	Kulturbedingungen	16
2.2.2	Immunfluoreszenzfärbungen von Einzelschichtkulturen und Morphometrie	17
2.3	<u>Rekonstituierte Herzgewebe der Maus</u> <i>(murine Engineered Heart Tissue, mEHT)</i>	18
2.3.1	Herstellung von Gussformen	18
2.3.2	Herstellung von Collagen Typ I	19
2.3.3	Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	20
2.3.4	Herstellung von mEHTs	20
2.3.5	Kultur von mEHTs	22
2.4	<u>Analyse der Kontraktionsparameter von mEHTs</u>	23
2.4.1	Isometrische Kontraktionskraftmessung	23
2.4.2	Datenerfassung und –verarbeitung	27
2.5	<u>Morphologische Analyse von mEHTs</u>	27
2.5.1	Fixierung und Verarbeitung der Präparate	27
2.5.2	Hämatoxylin-, Eosin-Färbung und Lichtmikroskopie	28
2.5.3	Immunfluoreszenzfärbung und konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie (CLSM)	29
2.5.4	Elektronenmikroskopie	31
2.6	<u>Herstellung transgener mEHTs</u>	32
2.6.1	Adenoviraler Gentransfer von β -Galaktosidase in mEHTs	32

2.6.2	Herstellung von mEHTs aus Indikatormäusen (α MHC-nLacZ)	32
2.6.3	Nachweis von β -Galaktosidase in transgenen mEHTs	33
2.7	<u>Statistik</u>	33
2.8	<u>Substanzen, Hilfsmittel und Geräte</u>	34
2.8.1	Substanzen	34
2.8.2	Hilfsmittel und Geräte	36
3	<u>Ergebnisse</u>	38
3.1	<u>Enzymatische Isolation, Ausbeute und Vitalität der Kardiomyozyten</u>	38
3.2	<u>Analyse des Wachstumsverhaltens von Kardiomyozyten auf biologischen Matrices sowie unter Zellzyklusinhibition</u>	38
3.2.1	Analyse der Kardiomyozytengröße in 2D-Kultur	39
3.2.2	Beurteilung der kontraktilen Funktion von Kardiomyozytenkulturen	39
3.3	<u>Etablierung von kohärent kontrahierenden mEHTs</u>	44
3.3.1	Verwendung von Ganzherzzellisolaten zur mEHT-Herstellung	44
3.3.2	Variation der mEHT-Geometrie und Kulturbedingungen	44
3.3.3	Variation der Zellzahl in mEHTs	45
3.3.4	Variation der Matrixzusammensetzung von mEHTs	47
3.4	<u>Optimierung der kontraktilen Funktion von mEHTs</u>	49
3.4.1	Passagere Zellzyklusinhibition mit Ara C in mEHTs	49
3.4.2	Effekt des Sauerstoffgehalts unter Kultur auf die mEHT-Funktion	51
3.4.3	Effekt von Wachstumsfaktoren auf die mEHT-Funktion	51
3.4.4	Effekt mechanischer Dehnung auf die mEHT-Funktion	54
3.5	<u>Strukturelle und funktionelle Eigenschaften optimierter mEHTs</u>	56
3.5.1	Strukturelle Eigenschaften von optimierten mEHTs	57
3.5.1.1	Immunfluoreszenzfärbung	57
3.5.1.2	Ultrastrukturanalyse von mEHTs	57
3.5.2	Kontraktile Eigenschaften von optimierten mEHTs	60
3.5.2.1	Spontanfrequenz	60
3.5.2.2	Inotroper Effekt von Calcium	60
3.5.2.3	Inotroper und lusitroper Effekt von Isoprenalin	60
3.5.2.4	Inotroper Effekt von Carbachol	60
3.6	<u>Vergleich von mEHTs aus Kardiomyozyten unterschiedlicher Mausstämme</u>	61
3.7	<u>Herstellung transgener mEHTs</u>	64
3.7.1	Adenoviraler Gentransfer in mEHTs	64

	3.7.2 Herstellung von mEHTs aus Indikatormäusen	64
4	<u>Diskussion</u>	67
4.1	<u>Entscheidende Faktoren bei der Entwicklung eines mEHT-Modells</u>	68
	4.1.1 Verwendete Zellpopulation und –zahl	68
	4.1.2 Anwendung von Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel	70
	4.1.3 Passagere Zellzyklusinhibition mit AraC (Kulturtag 5-7)	73
	4.1.4 Kultur unter 40% Sauerstoff	74
	4.1.5 Mediumsupplementierung mit T3 und ITS+1	75
	4.1.6 Kultur unter auxotonischer Dehnung	77
4.2	<u>Physiologische und pharmakologische Charakterisierung von mEHT</u>	78
4.3	<u>Histologische Charakterisierung von mEHT</u>	82
4.4	<u>Anwendung von mEHT als transgenes Modell</u>	83
5	<u>Zusammenfassung</u>	84
6	<u>Ausblick</u>	85
7	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	86
8	<u>Literaturverzeichnis</u>	90
9	<u>Danksagung</u>	104
10	<u>Lebenslauf</u>	105
11	<u>Erklärung</u>	106
12	<u>Ergebnistabellen</u>	107

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems spielen in der westlichen Welt eine herausragende Rolle. Alleine im Jahr 2005 starben in Deutschland 367.361 Menschen (44% aller Todesfälle) an einer Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems. Dies entspricht einer Mortalität von 448 auf 100.000 Einwohner im selben Jahr (Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamts, 2006). Frauen zeigen eine um etwa 10% höhere kardiovaskuläre Mortalität als Männer, wobei Männer hinsichtlich des Myokardinfarkts überrepräsentiert sind, ansonsten jedoch seltener an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems versterben. Spätfolge eines abgelaufenen Herzinfarktes ist häufig eine chronische Herzmuskelschwäche (Herzinsuffizienz). Weltweit leiden etwa 15 Millionen Menschen unter Symptomen der Herzinsuffizienz (Eriksson 1995). Bei einer stetig steigenden Lebenserwartung ist durch die erhöhte Morbidität im Alter auch in Zukunft mit einer weiter zunehmenden Prävalenz der Herzinsuffizienz zu rechnen. In Deutschland war die Herzinsuffizienz im Jahr 2005 mit 47.939 Todesfällen die dritthäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, 2006). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit einer Herzinsuffizienz wird mit 40-50% angegeben (Eschenhagen und Weil, 1998). Im Jahr 2004 führte die Herzinsuffizienz in Deutschland zu 260.801 stationären Krankenhausaufnahmen, wobei sich während der neunziger Jahre diesbezüglich steigende Werte abzeichneten (Statistisches Bundesamt, 2006). Diese Zahlen deuten nicht nur auf die erhebliche Konsequenz für den betroffenen Patienten, sondern auch auf enorme Kosten, die dem Gesundheitssystem durch diese Erkrankung entstehen. So belegen Herz-Kreislaferkrankungen hinsichtlich der dem Gesundheitswesen anfallenden Kosten den ersten Platz aller Krankheiten mit einem Anteil von 15,2%, was im Jahr 2004 einer Summe von 35,5 Mrd. € und somit jedem siebten im Gesundheitswesen ausgegebenen Euro entsprach. Davon entfielen auf die Herzinsuffizienz allein 2,5 Mrd. € (Statistisches Bundesamt, 2006). Betrachtet man die verlorenen Lebensjahre durch Krankheit in der Bundesrepublik, so standen Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 37,8% aller verlorenen Lebensjahre ebenfalls auf Platz eins. Deshalb ist die Erforschung von pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz und die daraus resultierende Entwicklung effizienter und kostengünstiger Therapieansätze nicht nur für den einzelnen Patienten, sondern auch für die gesamte Gesellschaft von großer Bedeutung.

1.2 Klinik und Ursachen der Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz ist das Herz nicht mehr in der Lage, in Ruhe oder bei Belastung das Gewebe mit genügend Blut und Sauerstoff zu versorgen. Dies äußert sich in den klinischen Leitsymptomen Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention. Nach dem Auftreten der Symptome wird die Schwere der Erkrankung gemäß den Empfehlungen der *New York Heart Association* (NYHA) in die Stadien NYHA I – IV eingeteilt, wobei NYHA I das leichteste Stadium ohne Einschränkungen bei normaler körperlicher Betätigung und NYHA IV das schwerste Stadium mit Symptomen bereits in Ruhe darstellt. Ergänzend können Patienten ebenfalls in *ABCD*-Stadien eingestuft werden. Hierbei umfasst Gruppe A symptomfreie Patienten mit Risikofaktoren für Herzinsuffizienz, Gruppe B symptomfreie Patienten mit bereits bestehenden strukturellen Herzschädigungen und Gruppe C symptomatische Patienten mit strukturellen Herzschädigungen. Somit erlaubt die Klassifikation in Gruppe A oder B eine bessere Differenzierung von Patienten des Stadiums NYHA I. Gruppe D ist identisch mit NYHA IV.

Im Gegensatz zu den relativ einheitlichen Symptomen sind die möglichen Ursachen einer Herzinsuffizienz weit gefächert. Die häufigste Ursache ist eine koronare Herzerkrankung, die meist von einer arteriellen Hypertonie begleitet wird, gefolgt von einer isolierten arteriellen Hypertonie. Als weitere Ursachen kommen unter anderem idiopathische Myopathien, Klappenfehler und andere Vitien, eine Myokarditis oder Herzrhythmusstörungen in Frage (Hoppe und Erdmann 2001, Eschenhagen und Weil 1998).

1.3 Aktuelle Therapie der Herzinsuffizienz

Ein Verlust von funktionellem Myokard bzw. von Kardiomyozyten ist die Ursache einer Herzinsuffizienz. Kardiomyozyten befinden sich in einem Zustand der terminalen Differenzierung (Pasumarthi et al. 2002), sodass ein Zellverlust als irreversibel gilt und nicht durch einen einfachen Zellersatz im Sinne von Zellhyperplasie kompensiert werden kann. Alternativ hypertrophiert das Restmyokard. Allerdings kommt es hierbei über die Kompensation des Zellverlustes (physiologische Hypertrophie) hinaus zu pathologischen Veränderungen wie Funktionsverlust und Zelltod (pathologische Hypertrophie; Weber et al. 1987). Des Weiteren beginnen Gewebeumbauvorgänge (*remodelling*) mit Fibrosierung, die Störungen der kontraktiven Herzfunktion nach sich ziehen. So kommt es schließlich zu Dilatation und zur Herzinsuffizienz (Jugdutt 1993). Konservative Behandlungsstrategien verzögern diesen Prozess, Einhalt kann ihm aber nicht geboten werden. Therapeutisch existiert eine Vielzahl verschiedener Behandlungsoptionen, die zu einer Verbesserung von

Prognose und/oder Lebensqualität der Patienten führen können (Henderson et al. 1998, RESOLVD 1999, MERIT-HF 1999). Ansätze sind hierbei die Verbesserung der kontraktilen Funktion (Herzglykoside), eine Verbesserung der Stauungssymptomatik (Diuretika), der Schutz vor neurohumoraler Überstimulation (Betaadrenorezeptorenblocker, ACE-Hemmer und Spironolacton) und die Verminderung des pathologischen Remodellings (ACE-Hemmer). Obwohl die konventionelle Therapie die 5-Jahresüberlebensrate von 30% (1950 – 1969) auf 41% (1990 – 1999) verbessert hat (Levy et al. 1995), bleibt bei therapierefraktären Patienten als *ultima ratio* und einzige kausale Therapie oftmals nur die Herztransplantation, die mit einer 5-Jahresüberlebensrate von 83,9% (Colombo et al. 1998) hier eindeutig überlegen ist. Diese chirurgische Intervention geht mit einem hohen Operationsrisiko, der Gefahr einer Transplantatabstoßung und den Nebenwirkungen von Immunsuppressiva einher. Tatsächlich limitierend ist jedoch die mangelnde Verfügbarkeit von Spenderorganen. Bei immer größerer Nachfrage und weltweiter Unterversorgung mit Spenderherzen muss diese Therapie vielen Patienten vorenthalten bleiben. So konnten in Deutschland im Jahr 2006 bei 743 Neuanmeldungen lediglich 412 Herzen transplantiert werden, wobei die strenge Indikationsstellung auf Grund des Organmangels in Betracht gezogen werden muss und der tatsächliche Bedarf somit durchaus höher angesetzt werden darf (Deutsche Stiftung für Organtransplantation, 2006). Trotz optimierter pharmakologischer Therapie konnten alternative Operationsmethoden und die dauerhafte Anwendung intra- bzw. extrakorporaler Pumpsysteme die orthotope Herztransplantation bislang nicht ersetzen (Aufiero et al. 1995, Starling 1997).

1.4 Molekularbiologische Zusammenhänge kardiovaskulärer Erkrankungen

Um neue Ansätze für verbesserte Therapien kardiovaskulärer Erkrankungen zu entwickeln, ist das Verständnis pathophysiologischer und molekularbiologischer Vorgänge im Rahmen kardiovaskulärer Krankheiten unabdingbar. Die Erforschung physiologischer Zusammenhänge an Herzmuskel von Mensch und Tier kann bereits auf eine Jahrhunderte alte Geschichte zurückgreifen (Harvey 1628, Bowditch 1871, Ringer 1882, Frank 1895, Starling 1918), wohingegen die molekularbiologische Erforschung von Kardiomyozyten und Herzerkrankungen weitaus jünger ist. So sind erst in den letzten 25 Jahren charakteristische Genmutationen als Ursache für Herzerkrankungen identifiziert und molekulare Änderungen im erkrankten Myokard beschrieben worden (Übersicht bei Ganten und Ruckepaul 1998).

Zum einen konnten so Krankheiten wie die hypertrophische Kardiomyopathie (Vosberg und Haberbosch 1998) oder das *Long-QT Syndrome* (Roden et al. 1996, Wang et al. 1998) einer spezifischen Genmutation zugeordnet werden. Zum anderen wurden aber auch im

insuffizienten Myokard von Mensch und Tier qualitative und quantitative Veränderungen der Genexpression ohne primär genetische Ursache beschrieben (Übersicht bei Eschenhagen und Weil 1998), die in der Regel als Adaptation des Organismus an veränderte physiologische und pathologische Belastungen gedeutet werden. Beispielsweise konnte im insuffizienten Myokard eine Reexpression von sogenannten fetalen Genen wie dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP) und der skelettalen Isoform des α -Aktins (Ruwhof und van der Laarse 2000) beobachtet werden. Neben der Expression fetaler Gene ist eine Verminderung der β -Adrenorezeptoren im insuffizienten Myokard charakteristisch (Bristow et al. 1982, Brodde 1991). Diese wird einerseits auf eine verminderte Expression und andererseits auf eine gesteigerte Desensitivierung, Internalisierung und Degeneration des stimulierten Rezeptors zurückgeführt (Hausdorff et al. 1990). Dabei erfolgt die Desensitivierung von β -Adrenorezeptoren unter adrenerger Stimulation durch Rezeptorkinasen (GRK2, bzw. β -ARK1), die in insuffizientem Myokard vermehrt exprimiert werden (Hausdorff et al. 1990, Ungerer et al. 1993, Lohse 1995, Freedman et al. 1995, Freedman und Lefkowitz 1996). Zusätzlich wird der β -adrenerge Signalweg durch vermehrt exprimierte inhibitorische G-Proteine inhibiert (Feldman et al. 1988, Neumann et al. 1988, Böhm et al. 1990, Eschenhagen et al. 1992). Insgesamt dürfen diese Veränderungen als Schutzmechanismen des Organismus gegen eine gesteigerte neurohumorale Aktivierung bei der Herzinsuffizienz betrachtet werden.

1.5 Modelle zur Validierung neuer Therapieansätze

Zur Interpretation der Auswirkungen genetischer und molekularer Alterationen werden heute vor allem *in vitro* Untersuchungen an zweidimensionalen Zellkulturen durchgeführt. Hier können an zumeist tierischen Kardiomyozyten Kontraktionsexperimente sowie elektrophysiologische und molekularbiologische Untersuchungen auch unter chronischer mechanischer, pharmakologischer und molekularbiologischer Manipulation durchgeführt werden (Schaub et al. 1997, Kada et al. 1999). Bei diesen *in vitro* Modellen sind allerdings eine Reihe von Limitationen zu beachten. So neigen frisch isolierte terminal differenzierte Kardiomyozyten zu einer schnellen morphologischen und funktionellen Degeneration, die durch fortwährende elektrische Stimulation verzögert, aber nicht aufgehalten werden kann (Berger et al. 1994). Langzeitkulturen von fetalen oder neonatalen Kardiomyozyten neigen nach der enzymatischen Präparation ebenfalls zu einer starken Dedifferenzierung mit vollständigem Verlust der charakteristischen Zellstruktur. Hier kommt es allerdings zu einer Redifferenzierung, durch die eine „Inkulturnahme“ erst ermöglicht wird. Der Differenzierungsgrad dieser Zellen bleibt in der Regel jedoch auf einer sehr unreifen Stufe stehen, was sich in der Reexpression früher Gene und einem Verlust von Proteinen später

Entwicklungsstufen widerspiegelt (Allen et al. 1988, Eppenberger-Eberhardt et al. 1990, Woodcock et al. 1992, Fitzgerald et al. 1994, Vincan et al. 1995).

Neben Änderungen der Genexpression wird auch die Zellmorphologie durch unterschiedliche Kulturbedingungen beeinflusst. Eine Reihe von Zellspezies lassen unter klassischen Kulturbedingungen nur wenig morphologische Gemeinsamkeiten mit differenzierten Zellen *in vivo* erkennen. Durch dreidimensionale Kulturmodelle konnten für einige Zellspezies (Endothelzellen, Drüsenepithelien, Myozyten, Fibroblasten u.a.) Bedingungen etabliert werden, unter denen sich morphologische Korrelate differenzierter Zellen ausbildeten (Gibson et al. 1982, Montesano et al. 1983, Rocha et al. 1985, Mauch et al. 1988, Vandenburg et al. 1988). Collagen diente dabei zumeist als Matrixsubstrat für eine dreidimensionale Rekonstitution.

Kardiomyozyten wurden erstmals durch die Modifikation einer Methode zur dreidimensionalen Kultur von Fibroblasten (Kolodney und Wysolmerski 1992, Kolodney und Elson 1993) in einer Collagenmatrix zu dreidimensionalen *Cardiac Myocyte-Populated Matrices* (CMPM) am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie in Hamburg rekonstituiert (Eschenhagen et al. 1997). Dadurch wurde es erstmals möglich, direkte Messungen von Kontraktionsparametern (Kontraktionskraft, Grundspannung, Kontraktionskinetik, Kontraktionsfrequenz) unter standardisierten Bedingungen an *in vitro* konstruierten myokardialen multizellulären Präparaten durchzuführen. Die Kardiomyozytenkultur in Form von CMPMs bzw. *Engineered Heart Tissues* (EHTs) gelang bereits mit Herzzellen embryonaler Hühnchen (Eschenhagen et al. 1997) und neonataler Ratten (Zimmermann et al. 2000). Dabei weisen EHTs einige Vorteile im Vergleich zu herkömmlichen Methoden wie dem Tiermodell, der 2D-Zellkultur sowie isolierten Muskelpräparaten auf:

1. Als *in vitro* rekonstituiertes multizelluläres Herzmuskelmodell zeigen EHTs morphologische, kontraktile und molekulare Charakteristika von intaktem Herzgewebe.
2. Im Gegensatz zu isolierten Muskelpräparaten können langfristige (Tage bis Monate) Interventionen *in vitro* durchgeführt werden und damit chronische Effekte diverser Stimuli auf Herzmuskelzell-Funktion, -Morphologie und -Genexpression untersucht werden.

3. EHTs stellen ein einfaches *in vitro* Zellsystem dar, bei dem *in vivo* auftretende Kompensationsmechanismen eine untergeordnete Rolle spielen sollten.
4. Durch die Anwendung von EHT können Tierversuche eingespart werden.

Durch die Entwicklung genetischer Manipulationen im Mausmodell ist es möglich geworden, Gene gezielt auszuschalten („*knock-out* Tiere“) bzw. zu aktivieren (transgene Tiere). Dadurch kann die Rolle entsprechender Genprodukte für die kontraktile Funktion von Herzmuskelzellen *in vivo* definiert werden. Die Anwendung solcher *in vivo* Modelle ist häufig mit einem enormen Zeit- und Kostenaufwand (v. a. bei der Anwendung der homologen Rekombination) verbunden (Übersicht bei Hübner und Kreutz 1998). Zum anderen muss immer auch berücksichtigt werden, dass genomische Alterationen häufig unvorhersehbare Adaptationsmechanismen hervorrufen, die eine Interpretierbarkeit der im *in vivo* Experiment gewonnenen Daten erschweren. Vor diesem Hintergrund wird heute eine Kombination von *in vivo* und *in vitro* Experimenten gefordert, um die relevante Funktion einzelner Moleküle zu identifizieren.

EHTs könnten sich möglicherweise als „Physiologie-nahes“ Herzmuskelmodell zur gezielten Analyse von genetischen Manipulationen *ex vivo* eignen. Entsprechende Ansätze wurden im Rattenmodell bereits erprobt (Zimmermann et al. 2000, Most et al. 2002, El-Armouche et al. 2003). Durch die Entwicklung einer murinen EHT-Technologie könnte im Sinne einer Erweiterung dieses „Target-Validierungs-Ansatzes“ auf eine Vielzahl von bereits vorhandenen genetisch manipulierten Mäusen zurückgegriffen werden, um die Auswirkungen einer spezifischen Manipulation selektiv auf die Herzmuskelaktivität zu untersuchen. Darüber hinaus könnten in diesem Modell z. B. durch adenovirale Überexpression eines im Tiermodell bzw. mEHT ausgeschalteten Gens oder durch Gentransfer von siRNA zur Abschaltung eines im Tiermodell bzw. mEHT überexprimierten Gens wertvolle Kontrollexperimente (sogenannte *Rescue*-Experimente) durchgeführt werden, um die Spezifität einer genetischen Manipulation weiter zu bestätigen.

1.6 Gewebeersatzstrategien

Ein alternativer, wenngleich noch experimenteller Ansatz zu etablierten pharmakologischen und interventionellen Therapien ist der Ersatz von defektem Herzgewebe mit Zellen (Reinlib und Field 2000, Murry et al. 2005). So konnten einige Gruppen zeigen, dass Kardiomyozyten (Koh et al. 1993, Soonpaa et al. 1994, Scorsin et al. 2000), skelettale Myoblasten (Taylor et al. 1998, Scorsin et al. 2000, Menasche et al. 2001), glatte Muskelzellen (Li et al. 1999a) und

Knochenmarkstammzellen (Orlic et al. 2001, Strauer et al. 2002, Stamm et al. 2003) nach Injektion in geschädigtes Myokard überleben und im Fall von Kardiomyozyten weiter differenzieren und Interzellularkontakte ausbilden. Allerdings bleibt fraglich, ob die teilweise beobachteten Funktionsverbesserungen auf einen direkten Effekt der injizierten Zellen oder vielmehr auf unspezifischen Entzündungsreaktionen, parakrinen Effekte oder mechanischen, d.h. Infarkt stabilisierenden, Effekten beruhen. Gegen eine echte funktionelle Integration und einen aktiven Beitrag der implantierten Zellen an der kontraktilen Funktion des Ventrikels spricht vor allem, dass nur maximal 15% der eingesetzten Zellen überleben (Muller-Ehmsen et al. 2002), dass Effekte auch bei der Implantation von minimalen Zellmengen beobachtet wurden und dass „funktionelle“ Effekte auch mit *a priori* nicht kontraktilen Zellen erzielt werden konnten (Li et al. 1999b, Menasche et al. 2001).

Als Alternative zur Implantation von Zellsuspensionen besteht gleichermaßen der Ansatz, durch *in vitro* gezüchtete Gewebekonstrukte (*tissue engineering*) defektes Herzgewebe zu ersetzen. Hierbei kommen sowohl vorgeformte Matrices, als auch flüssige Trägermaterialien, wie Collagen, zum Einsatz. Als abbaubare vorgeformte Trägermaterialien werden in der Regel Natriumalginat und Kalziumgluconat, Gelschäume oder Polyglykolsäure (Carrier et al. 1999, Leor et al. 2000, Li et al. 2000) verwendet. Hier gelang die Konstruktion dreidimensionaler Kardiomyozytenverbände mit der Fähigkeit zu spontaner Kontraktion (Li et al. 1999) und elektrischer Erregbarkeit (Bursac et al. 1999), die auf infarziertem Myokard bis zu 5 Wochen überleben (Li et al. 1999) konnten. Allerdings konnte weder eine zufriedenstellende Integration der Konstrukte in das Empfängergewebe (Leor et al. 2000), noch eine Funktionsverbesserung des geschädigten Myokards (Li et al. 1999) beobachtet werden. Neben der Herstellung von künstlichem Herzgewebe aus festen Trägermaterialien wurden flüssige Ausgangsmaterialien als Trägersubstanz für die Herstellung von Herzgewebe *in vitro* verwendet. Mit Kardiomyozyten aus Hühnerembryonen (Eschenhagen et al. 1997) und neonatalen Wistar-Ratten ist dies bereits erfolgreich gelungen (Zimmermann et al. 2000). Hierbei wurde als Grundlagenmatrix hauptsächlich Collagen Typ I verwendet, das mit isolierten, neonatalen Kardiomyozyten und extrazellulären Matrixbestandteilen gemischt wurde. Im Weiteren wird dreidimensional rekonstituiertes Gewebe als *Engineered Heart Tissue* (EHT) bezeichnet, da es sich bei diesem neuen *in vitro* Modell nicht um eine mit Kardiomyozyten besiedelte präformierte Matrix, sondern um ein dreidimensionales Gewebe mit herzmuskelspezifischen Charakteristika handelt. Diese Methode hat folgende Vorteile (Zimmermann et al. 2002):

- 1.) EHTs stellen ein organisiertes Gewebekonstrukt aus Muskelgewebe (Kardiomyozyten), Gefäßen (Endothelzellen) und Bindegewebe (Fibroblasten) dar.
- 2.) Kardiomyozyten bilden in EHTs ein dreidimensionales, longitudinal ausgerichtetes Netzwerk, welches spontan und synchron kontrahiert und darüber hinaus einen hohen Differenzierungsgrad aufweist.
- 3.) Größe und Form der Konstrukte können variiert und zum Zweck der Implantation entsprechenden Bedürfnissen und Anforderungen angepasst werden.
- 4.) Die kontraktile Parameter von EHTs können unter standardisierten isometrischen Bedingungen vor einer *in vivo* Anwendung gemessen werden, so dass eine Qualitätskontrolle vor Implantation erfolgen kann.
- 5.) EHTs werden vor Implantation 2 Wochen *in vitro* konditioniert, d.h. es findet eine Auslese von Zellen statt, die sich einerseits bereits von der enzymatischen Zellisolation regeneriert haben und andererseits vermutlich eine gewisse Hypoxieresistenz während der *in vitro* Kultur erworben haben. Dadurch sollte ein Überleben von EHT-Implantaten *in vivo* verbessert werden.

Erste Studien zur Anwendung von EHT als Implantat zeigten, dass diese bis mindestens vier Wochen nach Implantation überleben, terminal differenzieren, zügig vaskularisiert werden und noch aktiv kontrahieren (Zimmermann et al. 2002). Folgende grundsätzliche Probleme bei der Herstellung und auch *in vivo* Anwendung von künstlichen Herzgeweben sind allerdings ungeklärt: (1) Bisher entwickelte künstliche Herzgewebe bestehen nicht aus kompakter Herzmuskulatur; (2) wie nach der Injektion von Zellen kommt es auch bei der Herstellung künstlicher Herzgewebe zu einem starken Zellverlust; (3) künstliche Herzgewebe haben kein funktionelles Gefäßbett; (4) bisher entwickelte künstliche Herzgewebe sind für eine klinische Anwendung zu klein. Diese 4 Punkte stehen in einem unmittelbaren Zusammenhang. Die nur rudimentäre Ausbildung eines komplexen Herzmuskelgewebes ist durch die hohe Rate an Zelltod bei fehlender Teilungsfähigkeit der Herzmuskelzellen bedingt. Das Absterben von Herzmuskelzellen nach enzymatischer Isolation und anschließender Rekonstitution zu künstlichem Herzgewebe wird vermutlich zum Teil durch irreversiblen Zellschaden mit nachfolgendem nekrotischen Zelltod aber auch apoptotischem Zelltod hervorgerufen. Es ist davon auszugehen, dass die Integration eines Gefäßbettes die metabolische Versorgung von Zellen verbessern würde und damit langfristig das Überleben von Herzmuskelzellen in künstlichen Herzgeweben fördert. Zusätzlich könnte durch antiapoptotische oder Zellzyklus-aktivierende Strategien einerseits der initiale Zelltod vermindert und die Regenerationsfähigkeit *in vitro* gesteigert werden. Beide Strategien ließen sich unter Zuhilfenahme von im Mausmodell etablierten transgenen Ansätzen überprüfen.

1.7 Zielsetzung und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Zusammenfassend war das Ziel der Arbeit die Etablierung eines EHT-Modells aus Kardiomyozyten neonataler Mäuse.

Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Bedingungen erlauben die Kultur von Kardiomyozyten der neonatalen Maus in einer dreidimensionalen Collagenmatrix?
2. Zeigen murine EHTs strukturelle und funktionelle Eigenschaften von differenziertem Myokard?
3. Können murine EHTs aus Herzzellen transgener Tiere hergestellt werden?
4. Eignet sich der adenovirale Gentransfer zur transgenen Modifikation von murinen EHTs?

2 Material und Methoden

2.1 Zellisolation

Alle Arbeitsschritte wurden, soweit nicht im Text anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1.1 Tierhaltung und Genehmigung

Männliche und weibliche C57 black sowie NMRI (*Naval Medical Research Institute*) Mäuse aus Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin®) und Leitungswasser *ad libitum* gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neonatale Tiere verwendet (1.-3. Tag postnatal; n=1476). Die Genehmigung für die durchgeführten Organentnahmen wurde von der Tierschutzbehörde Oberfranken in Würzburg erteilt.

2.1.2 Organentnahme

Die Tiere wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in gekühltem calcium- und bicarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES (CBFHH) gelagert.

CBFHH

NaCl	136,9 mmol/l
KCl	5,36 mmol/l
MgSO ₄ (H ₂ O)	70,81 mmol/l
Glucose	5,55 mmol/l
KH ₂ PO ₄	0,44 mmol/l
Na ₂ HPO ₄ (H ₂ O)	70,34 mmol/l
HEPES	20 mmol/l

gelöst in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (*Aqua ad iniectabilia*), pH 7,5. Zur Herstellung wurden konzentrierte Stammlösungen benutzt, die mit *Aqua ad iniectabilia* angesetzt und autoklaviert wurden. Die Glucose- und HEPES-Stämme wurden nicht autoklaviert, sondern steril filtriert. Stammlösungen und CBFHH wurden bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.1.3 Zellpräparation

Kardiomyozyten wurden in 48 Präparationen aus insgesamt 1476 Herzen isoliert. Die Anzahl der Mäuse pro Präparation variierte von 8 bis 76. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert und/oder autoklaviert. Das verwendete Besteck (gebogene Schere, Pinzette) und das später verwendete Zellsieb wurden vor jeder Präparation autoklaviert.

Nach der Herzentnahme erfolgten die Zellpräparation und anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Penicillin G und Streptomycin (P/S; 100 U/ml und 100 µg/ml; Invitrogen, Karlsruhe) wurden zur Antibiose eingesetzt. Nach Säuberung der Herzen und Abtrennung des Gefäßstiels wurden bei einigen Versuchen die Vorhöfe abgetrennt. Anschließend wurden die Herzen in eine neue Kulturschale mit CBFHH transferiert und in der Mitte zweigeteilt. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von kleiner als 1 mm³ zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß, in dem nach weiterem dreimaligen Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) durchgeführt wurde.

2.1.4 Trypsinverdau

Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 7,5 ml (bei 30-40 Herzen) Trypsin/DNase-Arbeitslösung versetzt und für 10 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Desaga SM1, Sarstedt, Nümbrecht; Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min) inkubiert. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Nach Resuspension der Gewebestücke in 7,5 ml Trypsin/DNase-Arbeitslösung und einer Inkubation (10 min) unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml Sammelgefäß, das 2 ml Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung des Trypsins enthielt, überführt. Nach Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (6,5 ml) und Triturierung (Auf- und Abpipettieren, weitlumige 5 ml Pipette, 25-30 mal) wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Die Zeiten der weiteren Inkubationen mit Trypsin/DNase-Arbeitslösung wurden dem Maß der Trübung angepasst, wobei eine maximale Zeit von 5 min nicht überschritten wurde. Dieser Wechsel von Proteinverdau und Inaktivierung des Trypsins durch in der DNase-Arbeitslösung enthaltenes FKS bei gleichzeitigem Aufschluss von extrazellulärer DNA (aus toten Zellen) wurde unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin/DNase-Arbeitslösung) bzw. 5

ml (DNase-Arbeitslösung), jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes, durchgeführt. Der komplette Verdau der Gewebestücke dauerte bei 30-40 Herzen im Mittel 3,5 h, wobei durchschnittlich 4 Sammelgefäße gefüllt wurden. Gefüllte Sammelgefäße wurden in der Zeit auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Sammelgefäße in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen des klaren Überstandes mit einer an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette wurden die pelletierten Zellen in den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen und in einem Sammelgefäß (50 ml) gesammelt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml NKM gespült und auch diese Volumina zusammen mit dem Rest vereint. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (0,8% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert, die Zellen wurden erneut trituriert und dann wiederum durch Zentrifugation pelletiert (60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 3 ml NKM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Zefa Laborcenter, München; Maschengröße: 250 µm) gegeben und das Sammelgefäß und das Sieb mit 3 ml NKM gespült. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Nach Färbung mit Trypanblau (250 µl Trypanblau, 150 µl PBS, 100 µl Zellsuspension) wurde die Zahl der vitalen, in diesem Fall nicht gefärbten, Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Trypsin-Stammlösung

100 mg Trypsin pro ml CBFHH

bei 4 °C über Nacht rotierend lösen. Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren.

DNase-Stammlösung

100 mg DNase in 50 ml PBS ansetzen.

Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

Trypsin/DNase-Arbeitslösung

Trypsin-Stammlösung		1,5 ml
DNase-Stammlösung		0,7 ml
Penicillin/Streptomycin (P/S)		0,5 ml (Endkonz. 100 U/ml [P] und 100 µg/ml [S])
CBFHH	ad	50 ml

Auf Eis lagern.

DNase-Arbeitslösung

FKS (Hitze-inaktiviert)		1 ml
DNase-Stammlösung		0,7 ml

P/S 0,5 ml
 CBFHH ad 50 ml
 Auf Eis lagern.

PBS

NaCl 8 g
 KCl 0,2 g
 Na₂HPO₄ (H₂O)₇ 1,15 g
 KH₂PO₄ 0,2 g
 Aqua bidest. ad 1000 ml
 Mit HCl pH auf 7,4 einstellen.

NKM

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM)
 10% FKS
 1% P/S
 1% L-Glutamin

2.2 Kardiomyozyten-Einzelschichtkulturen

2.2.1 Kulturbedingungen

Um den Einfluss verschiedener Matrices auf das Wachstum muriner Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden diese in gekammerten Objektträgern auf unterschiedlichen Matrices kultiviert. Hierfür wurden die einzelnen Kammern mit einer Collagen/Fibronectin (50 µg/ml, 10 µg/ml), Collagen (50 µg/ml), Fibronectin (10 µg/ml), Gelatine (1% in PBS), Laminin (10 µg/ml) oder Poly-L-Lysin (100µg/ml) beschichtet. Je Kammer (1 cm²) wurden 50.000 Zellen eingesetzt und mit EHT-Medium (250 µl pro Kammer) überschichtet. In einer Versuchsreihe wurde für die gesamte Kulturdauer 25 µM Cytosinarabinosid (Ara C) zur Zellzyklusinhibition zugegeben. Die Kultur erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank bei täglichem Mediumwechsel. Die Kulturdauer betrug 6 Tage.

EHT-Medium

Dulbeccos Minimal Essential Medium, 1 g/l Glucose (DMEM)
 10% Pferdeserum (Hitze-inaktiviert)
 2% Hühnerembryonenextrakt
 1% P/S (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)

2.2.2 Immunfluoreszenzfärbungen von Einzelschichtkulturen und Morphometrie

An Kulturtag 6 wurden die Zellen zur Fixierung 10 Minuten bei 4 °C mit 4% Formaldehyd in PBS behandelt und anschließend immunfluoreszenzmarkiert (Tabelle 1). Zunächst wurden die Präparate mit Triton X-100 permeabilisiert und zugleich unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in 10% fetalem Kälberserum und 1% bovinem Serumalbumin blockiert (Blocklösung). Die primären und sekundären Antikörper wurden in einer Antikörperlösung wie unten angegeben aufgenommen. Nach der Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Zellen in Mowiol eingedeckelt, mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie (CLSM) aufgenommen und schließlich morphometriert.

1.	TBS	RT	5 min
2.	4% Formalin	RT	10 min
3.	TBS	RT	5 min
4.	Blocklösung	RT	30 min
5.	TBS	RT	5 min
6.	Primärer Antikörper	RT	45 min (Feuchtkammer)
7.	TBS	RT	4x 10 min
8.	sekundärer Antikörper	RT	30 min (Feuchtkammer)
9.	TBS	RT	4x 10 min
10.	Eindeckeln mit Mowiol 4-88	Bei 4 °C im Dunkeln lagern	

Tabelle 1: Protokoll der Immunfluoreszenzmarkierung

Blocklösung

Thimerosal 0,05%

Triton-X 100 0,5%

BSA 1%

FCS 10%

in TBS (0,05 M, pH 7,2-7,4)

Antikörper-Lösung (für Primär- und Sekundär-Antikörper)

Thimerosal 0,05%

Triton-X 100 0,5%

BSA 1%

in TBS (0,05 M, pH 7,2-7,4)

Mowiol

Mowiol 4-88	2,4 g
Glycerol	6,0 g
Aqua bidest.	6 ml
TrisHCl (0,2 mol/l, pH 8,5)	12 ml

Mowiol in Glycerol und Wasser durch mehrstündiges Rühren lösen, dann TrisHCl zugeben und 10 min bei 50°C schütteln. Anschließend 15 min bei 5.000 g zentrifugieren und den Überstand bei -20°C lagern.

10x TBS: Trishydroxymethylaminmethan ultra pure 121,14 g, NaCl 180 g in 2 l Aqua dest., mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Primärer Antikörper

Antikörpertyp	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Species
EA-53 (IgG1)	α -sarkomerisches Aktinin	1:1000	Sigma	Maus

TRITC markiertes Phalloidin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 1,5 μ g/ml zur Aktinfärbung verwendet. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (Molecular Probes) in einer Konzentration von 1 μ g/ml gefärbt.

Sekundärer Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Species
Anti-Maus IgG	Alexa 488	1:400	Molecular Probes	Ziege

2.3 Rekonstituierte Herzgewebe der Maus (*murine Engineered Heart Tissue*, mEHT)

EHTs wurden aus Herzzellen der Maus (s.o.), Collagen und Matrigel hergestellt und in Kulturmedium mit Pferdeserum und Hühnerembryonenextrakt gehalten. Für die Herstellung wurden fernerhin die im Folgenden beschriebenen Gussformen benötigt.

2.3.1 Herstellung von Gussformen

In autoklavierbare Kulturschalen (\varnothing 6 cm, Glas) wurden zwei oder vier Silikondochte (\varnothing 2,6 mm, etwa 80% der Schalenhöhe) pro Schale eingeklebt. Darauf wurden Teflonscheiben (s.u.) über die Dochte gestülpt und die Schalen bis auf Höhe dieser Scheiben mit Silikon

ausgegossen. Zur Optimierung der EHT-Geometrie wurden Gussformen mit einem Fassungsvermögen von 376 μl Volumen von unterschiedlicher Form verwendet: Zum einen eine flache (Höhe: 2,5 mm) und breite (Innendurchmesser: 4 mm, Außendurchmesser: 14,4 mm) sowie eine hohe (Höhe: 5 mm), schlanke (Innendurchmesser: 4 mm, Außendurchmesser: 10,6 mm) Formgeometrie. Nach Aushärten des Silikons wurden die Teflonscheiben wieder entfernt und Zylinder aus Teflon (\varnothing 4 mm) auf die Dochte aufgebracht, so dass 2 oder 4 ringförmige Gussformen entstanden. Die Kulturschalen wurden schließlich vor der ersten Benutzung mehrere Stunden ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert.

2.3.2 Herstellung von Collagen Typ I

Rattenschwänze wurden von den Kadavern von 4 Wistar Ratten abgetrennt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Vor der Collagenpräparation wurden die Rattenschwänze aufgetaut und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die Collagenpräparation erfolgte daraufhin unter sterilen Bedingungen. Nach Inzision in der Längsachse des Schwanzes wurde die Haut mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette entfernt. Die bindegewebigen, Collagen Typ I enthaltenden Fasern wurden mit Skalpell und Pinzette abgetrennt und in phosphatgepufferter Lösung (PBS) gewaschen. Nach Überführung und gleichmäßiger Verteilung der kollagenhaltigen Sehnenfäden in zwei Zentrifugengefäße erfolgte die Zugabe von jeweils 200 ml Essigsäure (0,1% in *Aqua ad iniectabilia*). Unter kontinuierlichem Rühren bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Sehnenfäden über Nacht fast komplett gelöst. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 g für 2 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zur Abtrennung von nicht gelösten Geweberesten wurde der Überstand gesammelt. Durch die langsame Zugabe eisgekühlter NaCl-Lösung (25% in H_2O) wurde die Salzkonzentration in der Suspension unter ständigem Rühren auf 4% angehoben. Nach einer Inkubation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht unter ständigem Rühren wurde die Suspension in neue sterile Zentrifugengefäße überführt und zur Pelletierung des ausgefällten Collagens zentrifugiert (20.000 g, 30 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Überstände wurden anschließend verworfen und die beiden Pellets in jeweils 200 ml kalter Essigsäure (0,1% in *Aqua ad iniectabilia*) aufgenommen. Die Lösung der Pellets erfolgte wieder bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und Rühren über Nacht. Durch zweimalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1% in *Aqua ad iniectabilia*) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der NaCl-Gehalt in der Kollagensuspension auf unter 0,9% reduziert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Lösen des Collagens in 0,003% SDS bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 Minuten und anschließender photometrischer Bestimmung nach der Methode von Bradford (1976). Die Reinheit und Konzentration des Collagens wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Comassiefärbung überprüft.

2.3.3 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

120 angebrütete Eier (9. Bruttag, Landesversuchsanstalt für Kleintierzucht, Kitzingen) wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Schalen wurden am runden Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und die Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen. Nach der Dekapitation wurden Köpfe und Körper in zwei 500 ml Flaschen mit je 150 ml eisgekühltem CBFHH + 2% P/S gesammelt. Die Embryonen wurden dann auf insgesamt 4 Zellkulturflaschen (150 ml) verteilt, homogenisiert (Polytron® Homogenisator; 6x 15 sec bei Stufe 11) und anschließend zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 1.000 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen und Sammeln der Überstände wurden die Pellets vereinigt, mit CBFHH auf 300 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert (6x 15 s bei Stufe 11, 3x 5 s bei Stufe 20). Nach erneuter Zentrifugation (1.000 g, 15 min, 4 °C) und Zusammenführen aller Überstände wurde der Hühnerembryonenextrakt in Aliquots á 14 ml bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Präparation mit 120 angebrüteten Eiern ergab durchschnittlich 500 ml Hühnerembryonenextrakt.

2.3.4 Herstellung von mEHTs

Bei der Herstellung der mEHTs wurde grundsätzlich analog des bereits etablierten Rattenmodells vorgegangen (Zimmermann et al. 2002). So wurde nach Einstellung der gewünschten Zellkonzentration im Sammelröhrchen zum Abschluss der Zellpräparation die Zellsuspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt gelagert. Alle zur Herstellung der mEHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Collagens bzw. der Rekonstitutionsmischung zu verhindern. Es wurde immer die gleiche Pipettierreihenfolge eingehalten. Collagen Typ I wurde vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem, mit Serum supplementiertem DMEM (2x EHT-Medium) vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemischs wurde mit NaOH (0,1 N) neutralisiert. Die Zugabe von extrazellulärer Matrix erfolgte anschließend vor der Vermengung mit der volumenangepassten Zellsuspension. Nach wiederholtem Triturieren des Collagen-Zell-Gemischs wurde davon je 450 µl zügig in die Gussformen pipettiert. Trotz des geringeren Fassungsvermögens (376 µl) der Gussformen konnte der Volumenüberschuss (74 µl) ob der hohen Viskosität des Collagen-Zellgemischs auf die Formen aufgeschichtet werden. Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, um eine leichte Aushärtung des Collagen-Zell-Gemisches zu erreichen, und nachfolgend vorsichtig mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2, bzw. 4 EHTs) überschichtet.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von zwei EHTs:

Collagen (5,5 mg/ml)	160 µl	→ 0,4 mg/EHT
2x EHT-Medium	160 µl	
NaOH 0,1 N	34,75 µl	
extrazelluläre Matrix	100 µl	→ 10% v/v
Zellsuspension	545,25 µl	
Gesamtvolumen	1000 µl	

Zweifach konzentriertes EHT-Medium (2x EHT-Medium):

10x DMEM	1,0 ml
Pferdeserum (inaktiviert)	1,0 ml
Hühnerembryonenextrakt	0,2 ml
P/S	0,1 ml
Aqua ad iniectabilia	ad 5 ml

Vor Herstellung der EHTs frisch herstellen.

10x DMEM

10x DMEM Pulver	133 mg
Aqua ad iniectabilia	10 ml

Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren. Bei 4 °C lagern.

Als extrazelluläre Matrices wurden Laminin, Matrigel® (extrazelluläre Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus) und wachstumsfaktorreduziertes Matrigel® verwendet. Es wurden auch mEHTs ohne extrazelluläre Matrix hergestellt. Die Rekonstitution wurde auch bei Variation der extrazellulären Matrix jeweils auf 1 ml für 2 mEHTs mit EHT-Medium eingestellt. Aufgrund der Viskosität der Mischung musste ein Pipettierverlust von 50 µl pro EHT einkalkuliert werden. Deshalb konnten mit einem Ansatz von 1000 ml 2 mEHTs mit einem Volumen von jeweils 450 µl gegossen werden.

2.3.5 Kultur von mEHTs

Die Kultur der mEHTs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂. Der Sauerstoffgehalt während der Kulturdauer betrug 20 oder 40%. Das Medium wurde am ersten Tag nach der Herstellung und anschließend jeden zweiten Tag nach mikroskopischer Kontrolle gewechselt.

Das Medium wurde zur Optimierung des murinen EHT-Modells in verschiedener Weise mit Supplementen versetzt. Diese wurden, soweit nicht im Text anders angegeben, für die volle Kulturdauer zugegeben. Die Substanzen wurden jeweils mit dem Medium erneuert und, soweit möglich, in *Aqua ad iniectabilia* gelöst. Folgende Kulturmediumzusätze wurden erprobt:

- Trijodthyronin (T3; 1 nM)

- ITS+1:	Insulin	10	µg/ml
	Transferrin	5,5	µg/ml
	Selen	0,005	µg/ml
	α-Linolensäure	4,5	µg/ml

- Insulin (10 mg/ml),

- Glutamin (200 mM)

- Retinsäure (10 µM)

- Vitamin B₁₂ (2 µg/ml)

- Nicht essentiellen Aminosäuren:	L-Alanin	(0,89 g/l)
	L-Asparagin H ₂ O	(1,5 g/l)
	L-Aspartat	(1,33 g/l)
	L-Glutamin	(1,47 g/l)
	Glycin	(0,75 g/l)
	L-Prolin	(1,15 g/l)
	L-Serin	(1,05 g/l)

- Mausserum (10%)

Weiterhin wurde die Auswirkung einer transienten (Kulturtag 5-7) Zellzyklusinhibition mit Cytosinarabinosid (Ara C, 25 µM) analysiert. AraC wurde hierfür dem Medium an Kulturtag 5 zugegeben und bis zum erneuten Mediumwechsel an Kulturtag 7 belassen.

Die Kulturschalen wurden alle auf einer horizontal rotierenden Platte aus eigener Herstellung (30 Rotationen/Minute) gelagert. Die kontinuierliche Rotation wurde begonnen, wenn erste kohärente Kontraktionen der mEHTs zu beobachten waren (in der Regel ab Kulturtag 3).

An Tag 7 wurden die nun um den Teflonzylinder kondensierten mEHTs (Abb. 1A) vorsichtig mit einer Pipette von den Teflonzylindern abgenommen, mit Hilfe einer Pipette und einer autoklavierten Pinzette auf entweder statische, phasische oder auxotonische Dehnungsvorrichtungen (Abb. 1 B-D) gespannt. Hierbei wurde jeweils auf maximal 110% der Ausgangslage gedehnt (Ausgangslage: 12,6 mm innerer Umfang, Dehnung: 13,8 mm innerer Umfang). Vor dem Gebrauch wurden die Haltevorrichtungen autoklaviert. Die Kultur wurde für 7 Tage unter Dehnung fortgesetzt (Gesamtkulturdauer: 14 Tage).

2.4 Analyse der Kontraktionsparameter von mEHTs

2.4.1 Isometrische Kontraktionskraftmessung

An Kulturtag 14 wurden die Kontraktionsparameter der mEHTs in modifizierter Tyrode-Lösung (0,2-1,2 mmol/l Calcium) in temperierten Standardorganbädern (Abbildung 2) ermittelt. Die Kontraktionsexperimente wurden unter elektrischer Stimulation (Frequenz 6 oder 8 Hz, Pulsdauer 5 ms, Stromstärke 20% über der Reizschwelle) bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) zur pH-Kontrolle (pH 7,4) durchgeführt. Die Aufhängung der mEHTs erfolgte vorerst ohne Vordehnung (L₀) zwischen induktiven Kraftaufnehmern und stabilen Haltern in Organbädern mit Tyrode-Lösung. Als L₀ wurde die durch den Abstandhalter während der Kultur vorgegebene Gewebelänge (6,9 mm) definiert. Die spontane Kontraktionsfrequenz wurde direkt nach Aufhängung der EHTs in den Organbädern (t₀) und nach einer Äquilibrationszeit von 30 min (t₃₀) bei 1 mM Calcium ohne elektrische Stimulation und ohne Vordehnung (L₀) ermittelt. Nach Einschalten der elektrischen Stimulation wurde die Vordehnung in Schritten von 0,1 mm von L₀ auf L_{max} (Gewebedehnung mit optimaler Kontraktionskraft) gesteigert. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung abgelassen, durch Tyrode-Lösung mit 0,2 mmol/l Calcium ersetzt und für 15 min äquilibriert. Die Kontraktionsparameter wurden anschließend nach schrittweiser Erhöhung der Calciumkonzentration auf 1,2 mmol/l ermittelt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden zur Äquilibration Pausen von jeweils 5 min eingelegt. Nach erneutem zweimaligen Wechsel der Tyrode-Lösung und Einstellung der Calcium-Konzentration auf 0,4 mmol/l erfolgte die Bestimmung der Reaktion auf betaadrenerge Stimulation durch Boluszugabe von 1 µmol/l Isoprenalin. Anschließend wurde die Antagonisierbarkeit der Isoprenalineffekte durch muskarinerge Stimulation mit 1 µmol/l Carbachol untersucht.

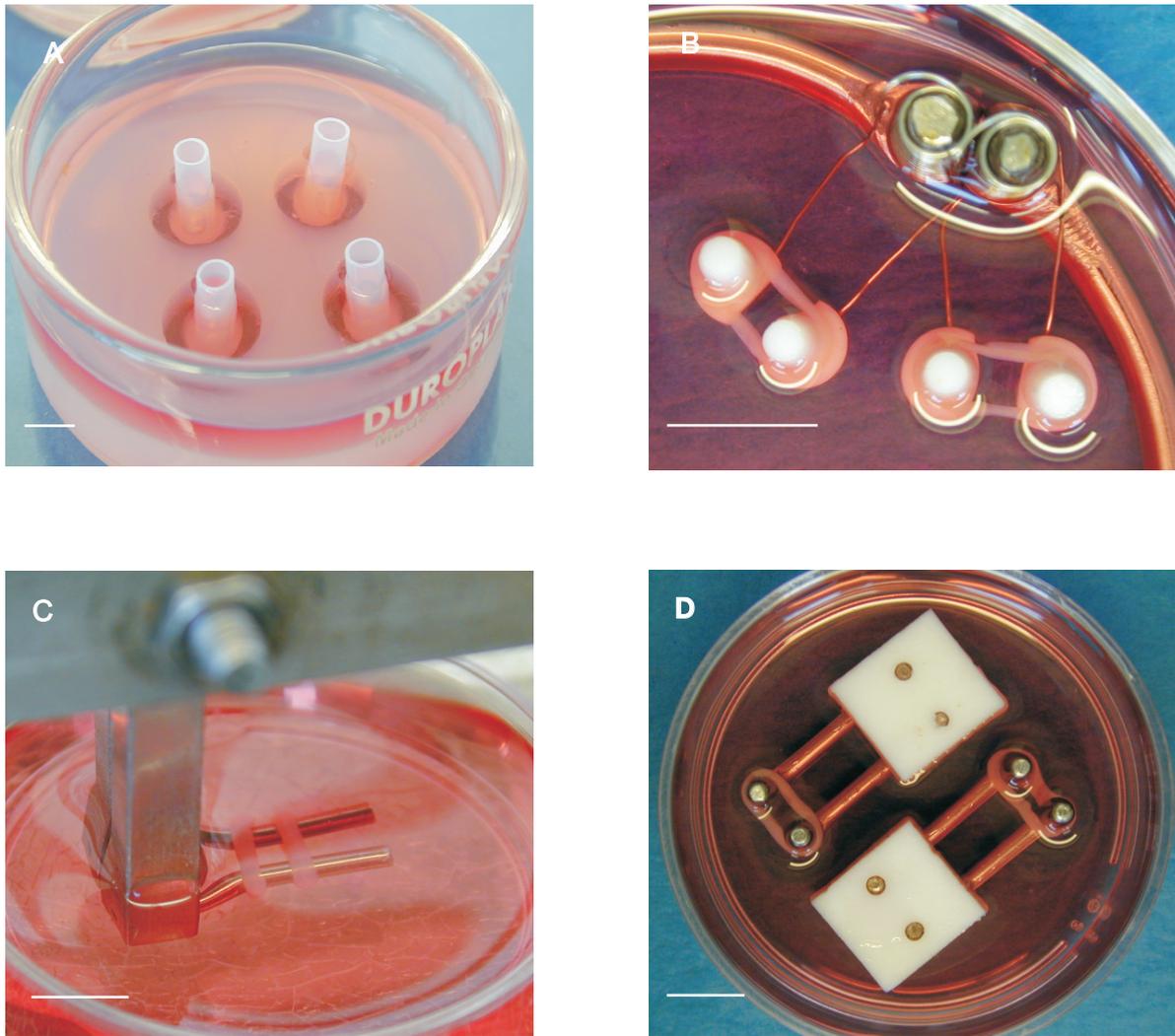


Abbildung 1: mEHT-Kultur in zirkulären Gussformen (A; bis Kulturtag 7) sowie unter mechanischer Dehnung (B-D; von Kulturtag 7 bis 12): (B) Gefederte Dehnung (erlaubt auxotonische Kontraktionen); (C) phasische Dehnung bei 2 Hz; (D) statische Dehnung (erlaubt isometrische Kontraktionen). Die maximale Dehnung wurde jeweils auf 110% der Ausgangslage eingestellt. Bei Einsatz der gefederten Dehnung ist die Spannung der Feder so definiert, dass eine Federauslenkung um 1 mm einer Kraftentwicklung von 1 mN entspricht. Maßstäbe: 10 mm

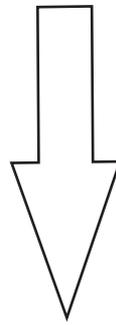
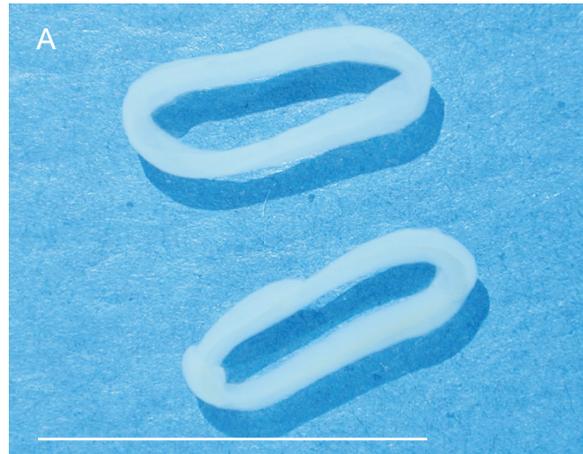


Abbildung 2: mEHTs wurden an Kulturtag 12 von den Dehnapparaturen abgenommen, in Kulturschalen mit Tyrode-Lösung gewaschen (A) und anschließend zur Kontraktionskraftmessung mit induktiven Kraftaufnehmern in klassische Organbäder überführt (B). Maßstäbe 10 mm

Nach den Kontraktionsversuchen wurde ein Teil der mEHTs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Ein anderer Teil wurde entweder in PBS mit 4% Formaldehyd für lichtmikroskopische und CLSM-Analysen oder in PBS mit 2,5% Glutaraldehyd für elektronenmikroskopische Analysen fixiert.

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung

NaCl	119,8	mmol/l	
KCl	5,4	mmol/l	
CaCl ₂	0,2	mmol/l	
MgCl ₂	1,05	mmol/l	
NaHCO ₃	22,6	mmol/l	
NaH ₂ PO ₄	0,42	mmol/l	
Glucose	5,05	mmol/l	
Na ₂ EDTA	0,05	mmol/l	
Ascorbinsäure	0,56	mmol/l	in <i>Aqua bidest.</i>

CaCl₂-Stamm 2,25 mol/l

CaCl ₂ (H ₂ O) ₂		165,57 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad	500 ml

MgCl₂-Stamm 1,05 mol/l

MgCl ₂ (H ₂ O) ₆		106,83
<i>Aqua bidest.</i>	ad	500 ml

Stamm I für Tyrode-Lösung

NaCl		175 g
KCl		10 g
CaCl ₂ -Stamm		2,22 ml
MgCl ₂ -Stamm		25 ml
<i>Aqua bidest.</i>	ad	1000 ml

Stamm II für Tyrode-Lösung

NaHCO ₃		50 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad	1000 ml

Stamm III für Tyrode-Lösung

NaH ₂ PO ₄		5,8 g
----------------------------------	--	-------

Aqua bidest. ad 1000 ml

Herstellung der modifizierten Tyrode-Lösung

Stamm I	40 ml
Stamm II	38 ml
Stamm III	10 ml
Glucose	1 g
Ascorbinsäure	100 mg
Na ₂ EDTA	18,6 mg
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

2.4.2 Datenerfassung und -verarbeitung

Die Erfassung der Kontraktionsdaten erfolgte mittels eines PC-gestützten Biomonitoring Systems (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Die Messverstärker wurden vor jeder Messung mittels eines Gewichtes von 30 mg kalibriert. Die Ausgabe der minimalen und maximalen Kraft erfolgte durch die Messsoftware als Mittelwert einer Sekunde. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler Kraft und der Grundspannung errechnet. Anspannungs- und Relaxationszeiten wurden als Zeit von 50-100% der maximalen Kontraktion (T1) bzw. Zeit von der maximalen Kontraktion bis 50% Relaxation (T2) registriert. Die Weiterverarbeitung der Kontraktionsdaten erfolgte mit EXCEL[®] (Microsoft AG, Ismaning) und InStat-Prism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.5 Morphologische Analyse von mEHTs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden EHTs per Lichtmikroskopie, konfokaler Laserscanning Mikroskopie und Elektronenmikroskopie analysiert.

2.5.1 Fixierung und Verarbeitung der Präparate

mEHTs wurden über Nacht in 4% Formalin/PBS bei 4°C fixiert (Lichtmikroskopie und konfokale Laserscanning Mikroskopie) und eine weitere Nacht in PBS gewaschen. Anschließend wurden EHTs zum Teil in 2% Agarose eingegossen, um eine Ausrichtung bei der Paraffineinbettung bzw. das Schneiden per Vibratom zu vereinfachen. Einige EHTs wurden als *whole-mount* Präparate verarbeitet. Für Ultrastrukturanalysen per Elektronenmikroskopie wurden EHTs in ~2x1 mm große Fragmente zerschnitten und darauf in 2,5% Glutaraldehyd/PBS mit 30 mM 2,3-Butandionmonoxim (BDM) und 0,1 mM

Calciumchlorid bei 4 °C über Nacht fixiert. Nach Waschen in PBS für 24 h wurden die EHTs in Epon eingebettet.

2.5.2 Hämatoxylin-, Eosin-Färbung und Lichtmikroskopie

Die Agaroseblöcke wurden zunächst in einer aufsteigenden Isopropylalkohol-Reihe entwässert und in Paraffinblöcke eingebettet (Tabelle 2). Von den Paraffinblöcken wurden auf einem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die daraufhin bei 52 °C in einem Wasserbad gestreckt und schließlich auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Die Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und schließlich in einer absteigenden Ethanol-Reihe bewässert, mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt, in einer aufsteigenden Ethanolreihe und abschließendem Xylolbad wieder entwässert und mit Eukitt® eingedeckelt (Tabelle 3). Die Präparate wurden in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung mit einem Zeiss-Axioplan-Lichtmikroskop betrachtet und mit einer Nikon-Coolpix- bzw. Zeiss-Axiocam-Kamera aufgenommen.

Poly-Lysin-Beschichtung: Objektträger mit Aceton reinigen, in *aqua dest.* waschen, für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Poly-L-Lysin (1 mg/ml) inkubieren, erneut in *aqua dest.* waschen und über Nacht bei 60 °C trocknen. Lagerung bei Raumtemperatur für maximal 2 Wochen.

Eosinlösung (0,1 %): 0,5 g Eosin gelblich in 500 ml Aqua dest lösen, dunkel lagern.

Hämalaunlösung nach Mayer: 1 g Hämatoxylin in 1 l aqua dest lösen, 0,2 g NaJO₃ und 50 g KAl(SO₄)₂ einrühren bis die Lösung eine blauviolette Farbe annimmt, 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure einrühren bis die Lösung eine rotviolette Farbe annimmt, vor Gebrauch filtrieren.

1.	70% Isopropanol	2 – 3 Stunden (oder über Nacht)	Raumtemperatur
2.	80% Isopropanol	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
3.	96% Isopropanol I	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
4.	96% Isopropanol II	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
5.	100% Isopropanol I	2 – 3 Stunden	Raumtemperatur
6.	100% Isopropanol II	2 – 3 Stunden (oder über Nacht)	Raumtemperatur
7.	100% Isopropanol III	1 Stunde	60 °C
8.	Paraffin/Isopropanol 1:1	1 Stunde	60 °C
9.	Paraffin I	2 Stunden	60 °C

10.	Paraffin II	2 Stunden	60 °C
11.	Paraffin III	2 Stunden (oder über Nacht)	60 °C
12.	Ausgießen mit Paraffin		60 °C

Tabelle 2: Protokoll zur Paraffineinbettung

1.	Xylol I	15 min
2.	Xylol II	15 min
3.	100% Ethanol I	5 min
4.	100% Ethanol II	5 min
5.	96% Ethanol I	5 min
6.	96% Ethanol II	5 min
7.	80% Ethanol	5 min
8.	70% Ethanol	5 min
9.	Aqua dest.	5 min
10.	Hämalaunlösung	20 min
11.	Leitungswasser, fließend	10 min
12.	Aqua dest.	spülen
13.	Eosinlösung	10 min
14.	Aqua dest.	spülen
15.	96% Ethanol I	spülen
16.	96% Ethanol II	spülen
17.	100% Ethanol I	spülen
18.	100% Ethanol II	spülen
19.	Xylol	3 – 5 min
20.	Eindeckeln mit Eukitt®	

Tabelle 3: Protokoll der HE-Färbung

2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale *Laserscanning* Mikroskopie (CLSM)

Vibratonschnitte mit einer Schichtdicke von 100 µm wurden von den in Agarose eingebetteten mEHTs angefertigt. Teilweise wurden die EHTs auch als gesamtes Konstrukt (*whole-mount*) ungeschnitten gefärbt. Dabei wurden folgende Antikörper und Substanzen, wie in Tabelle 4 im Detail aufgeführt (Substanzen siehe auch 2.2.2), verwendet:

Primäre Antikörper

Antikörpertyp	Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Species
EA-53 (IgG1)	α -sarkomerisches Aktinin	1:1000	Sigma	Maus
1A4 (IgG2a)	α -glattmuskuläres Aktin	1:400	Sigma	Maus
6-9H6 (IgG1)	Prolyl-4-hydroxylase	1:500	Chemicon	Maus
TLD-3A12 (IgG)	CD31 (PECAM)	1:100	Serotec	Maus

TRITC markiertes Phalloidin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ zur Aktinfärbung verwendet. Die Zellkerne wurden teilweise mit Propidiumjodid (Molecular Probes) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ gefärbt.

Sekundärer Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Species
Anti-Maus IgG	Alexa 488	1:400	Molecular Probes	Ziege

1.	TBS	RT	5 min
2.	4% Formalin	4 °C	Über Nacht
3.	TBS	RT	4x 15 min
4.	Blocklösung	RT	1 h
5.	TBS	RT	5 min
6.	Primärer Antikörper	4 °C	über Nacht (Feuchtkammer)
7.	TBS	RT	2x 4 h dann über Nacht
8.	sekundärer Antikörper	RT	2 h (Feuchtkammer)
9.	TBS	RT	2x 4 h dann über Nacht
10.	Eindeckeln mit Mowiol 4-88	Bei 4 °C im Dunkeln lagern	

Tabelle 4: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Blocklösung, Antikörper-Lösung (für Primär- und Sekundär-Antikörper), Mowiol, s. 2.2.2

2.5.4 Elektronenmikroskopie

Die in Glutaraldehyd fixierten Präparate wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur in 1% Osmiumtetroxyd und 1,5% Kaliumferricyanid in PBS postfixiert. Nach erneutem Waschen in PBS über Nacht bei 4°C wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Acetonreihe dehydriert und in Epon mit 2% 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30, Sigma) eingegossen (Tabelle 5). Nach Anfertigung von ultradünnen Schnitten (50 nm) und Aufziehen der Schnitte auf Kupfergitter wurden die Schnitte mit 10% Uranylacetat in 40% Ethanol (10 min bei Raumtemperatur) und 2,8% Bleicitrat in 0,16 molarer NaOH (5 Minuten bei Raumtemperatur) kontrastiert und anschließend mit einem Zeiss Leo 906 Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) betrachtet.

1.	2,5% Glutaraldehyd in PBS	über Nacht	4°C
2.	PBS	über Nacht	4°C
3.	1% Osmiumtetroxyd + 1,5% Kaliumferricyanid in PBS	2 h	Raumtemperatur
4.	PBS	3x 10 min	Raumtemperatur
5.	PBS	über Nacht	4°C
6.	70% Ethanol	1 h	Raumtemperatur
7.	80% Ethanol	30 min	Raumtemperatur
8.	90% Ethanol	30 min	Raumtemperatur
9.	100% Ethanol	2x 30 min	Raumtemperatur
10.	50% Aceton in Ethanol	30 min	Raumtemperatur
11.	Aceton	30 min	Raumtemperatur
12.	33% Epon in Aceton	30 min	Raumtemperatur
13.	66% Epon in Aceton	30 min	Raumtemperatur
14.	Epon mit 2% DMP 30 I	über Nacht	4°C
15.	Epon mit 2% DMP 30 II	über Nacht	60°C
16.	Epon mit 2% DMP 30 III	über Nacht	80°C

Tabelle 5: Protokoll zur Eponeinbettung für TEM-Untersuchungen

2.6 Herstellung transgener mEHTs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur Herstellung transgener mEHTs verwendet:

- 1) Adenoviraler Gentransfer von β -Galaktosidase (β -Gal; LacZ)
- 2) Anwendung von Herzzellen aus transgenen Mäusen (Expression von kernlokalisierter β -Gal [nLacZ] unter Kontrolle des α -Myosinschwerkettenpromotors [α -MHC])

2.6.1 Adenoviraler Gentransfer von β -Galaktosidase in mEHTs

Für den Gentransfer wurde das für β -Galaktosidase kodierende rekombinante replikationsdefiziente Adenovirus (Ad5LacZ) aus eigener Herstellung verwendet. Die β -Galaktosidase wird in diesem Konstrukt unter der Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. Aufzucht und Vermehrung der Adenoviren erfolgte in der menschlichen Nierenzelltumorklinie HEK 293. mEHTs wurden am 14. Kulturtag mit 100×10^6 bav (entspricht einer *Multiplicity of infection* [MOI] 50 bei 2×10^6 Zellen/mEHT) in 0,5 ml DMEM mit 1% P/S (100x) infiziert. Zur Infektion wurden die EHTs von der Dehnapparatur abgenommen und vollständig in die Virussuspension gelegt. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank wurde wieder komplettes EHT-Medium hinzugegeben und die EHTs auf die Dehnvorrichtungen gehängt. Nach 48 h wurden die infizierten EHTs dreimal 5 Minuten in PBS gewaschen, in 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd fixiert (5 Minuten bei 4 °C) und schließlich einer β -Galaktosidase-Färbung zugeführt (s. 2.6.3).

2.6.2 Herstellung von mEHTs aus Indikatormäusen (α MHC-nLacZ)

mEHTs wurden aus Indikatormäusen hergestellt, die eine nukleär lokalisierte β -Galactosidase unter der Kontrolle des kardialen α -MHC-Promotors exprimieren (α -MHC-nLacZ Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. L. J. Field, Indianapolis, USA bereit gestellt). Die Herstellung von mEHTs aus α MHC-nLacZ Herzzellen erfolgte analog zu der unter 2.5 beschriebenen Methode. Zuvor mussten allerdings die transgenen Tiere eines Wurfes (heterozygote Verpaarung; α MHC-nLacZ [DBA2J; ♂] x WT [C3H; ♀]) identifiziert werden. Dafür wurde bei der Organentnahme von jedem Herz ein Vorhofschnipsel abgetrennt und in 1 ml x-Gal Puffer (s.u.) mit 1 mg/ml x-Gal inkubiert. Nach 5-10 Minuten färbten sich die β -Galaktosidase exprimierenden Herzen blau. Die sich nicht anfärbenden Herzen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Transgene mEHTs wurden wie unter 2.5 beschrieben kultiviert und an den Kulturtagen 3, 7 und 14 nach einer kurzen Fixierung (5

Minuten bei 4 °C) in 2% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd einer β -Galaktosidase-Färbung zugeführt (s. 2.6.3).

2.6.3 Nachweis von β -Galaktosidase in transgenen mEHTs

Transgene mEHTs wurde nach der beschriebenen Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixierung dreimal mit PBS gewaschen und in x-Gal Puffer mit 1 mg/ml x-Gal inkubiert (12 h, 37 °C). Schließlich wurde nochmals mit PBS gewaschen und dann mit 4% Formaldehyd über Nacht postfixiert.

x-Gal Puffer: 20 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 20 mM $K_4[Fe_2(CN)_6]$, 2 mM $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 0,02% Ipegal, 0,01% Na-Desoxycholat, in PBS gelöst

x-Gal: 40 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid in DMSO gelöst

2.7 Statistik

Alle dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte \pm SEM und wurden mit dem Computerprogramm Excel berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem 2-seitigen Student-t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben oder ANOVA Test ermittelt. Ein p-Wert niedriger als 0,05 wurde als signifikant angenommen. „n“ bezeichnet die Anzahl unabhängiger Experimente.

2.8 Substanzen, Hilfsmittel und Geräte

2.8.1 Substanzen

- (2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure) (HEPES), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
- Aceton, Apotheke Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Aminosäuren, nicht essentielle, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
- Aprotinin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
- Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
- Ascorbinsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
- Bradford Reagenz, Bio-Rad, München, Deutschland
- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid (α -Gal) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Calciumchlorid (CaCl_2), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Carbacholhydrochlorid, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
- Carbogengas (95% O_2 , 5% CO_2), Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland
- Chick embryo extract, Hühnerembryonenextrakt, CEE, eigene Herstellung
- Chloroform, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Coomassie-Blau, G 250, Serva, Heidelberg, Deutschland
- 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Desoxycholat, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt, Deutschland
- DMEM, Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Eisessig, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Eosin G, gelblich, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol, Apotheke Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na_2EDTA ; Titriplex[®] III), Merck, Darmstadt, Deutschland
- fetales Kälberserum (FKS), 0,1 μm sterilfiltriert, Mycoplasma frei, Gibco, Berlin, Deutschland
- Fibronectin, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Formaldehyd, säurefrei mindestens 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Gelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland

- Glutamin (100x=200 mM), Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Glycerin, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glutaraldehyd (25%), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Growth factor reduced Matrigel, BD Biosciences, Bedford, USA
- Harbor Extracellular Matrix, TEBU GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland
- Hämatoxylin, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Hydrogenchlorid (HCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Insulin, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- ITS+1, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- (\pm)-Isoprenalin-HCl, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Laminin, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Magnesiumchlorid (MgCl_2), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Magnesiumsulfat (MgSO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mausserum, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Methanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mowiol 4-88, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (100x; P/S), Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Pferdeserum, Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- Poly-L-Lysin, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Retinsäure, Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Silikon, Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland
- Sodium-dodecyl-sulfat (SDS), Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Thimerosal, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Trijodthyronin (T_3), Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Trishydroxymethylaminmethan (Tris), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Triton-X 100, Fluka, Steinheim, Deutschland
- Vitamin B₁₂, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
- Xylol, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen hatten den höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

2.8.2 Hilfsmittel und Geräte

- 50 ml Reaktionsgefäß, 2070 Blue Max 50 Conical Tube, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA
- Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Hamburg, Deutschland
- Brutschrank, Funktion Line, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
- Chamber Slides, Nunc GmbH, Wiebaden, Deutschland
- Christ-Zentrifuge, Render + Hobein, München, Deutschland
- Dehnvorrichtungen (statisch, phasisch, auxotonisch), Eigenanfertigung der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen-Nürnberg
- Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml, B.Braun Melsungen AG, Deutschland
- Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland
- Feinanalysewaage, Mettner H51, Giessen, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- Gewebekulturröhrchen 14 ml steril, # 163160, Cellstar, Greiner Laborbedarf, Frickenhausen, Deutschland
- Glasschalen, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Heizplatte, FMI EHE-3501, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim, Deutschland
- Horizontalrotierende Platte, Eigenanfertigung der Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen-Nürnberg
- Kippwippe, Desaga, Heidelberg, Deutschland
- Konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM Pascal auf Axiovert 100, Zeiss, Jena, Deutschland
- Kraftaufnehmer, IBJ, Heidelberg, Deutschland
- Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA
- Kulturschalen, Falcon Tissue Dish, steril, Becton Dickinson Labware, Plymouth, England
- Kulturschalen (Polymethylpenten), Nalge Co, Nalgene Labware Div., Rochester, NY, USA
- Mikroskop, Labovert, Leitz, Wetzlar, Deutschland
- Mikroskop, Axioplan, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Sondheim/Rhön, Deutschland
- Objektträger, Lab-Tek Chamber Slide with Cover, steril, 2 well, Cat# 177380, Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA
- Organbäder, Eigenanfertigung Glasbläserei, UKE, Hamburg
- Pap-Pen, Dako, Glostrup, Dänemark

- Parafilm, American National, Greenwich, CT, USA
- Pasteur Pipetten, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
- pH-Meter, Knick GmbH, Biberach, Deutschland
- Photometer (Smart Spec 3000), Bio-Rad, München, Deutschland
- Pipetten, 5 ml , wide tip with plug, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
- Pipetten, 10 ml (serological), Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
- Pipettierhilfe, pipettus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- Polytron Homogenisator, PT 10-35, Kinematica GmbH, Luzern, Schweiz
- Präparationsbesteck, Hammacher Instrumente, Solingen, Deutschland
- Schlittenmikrotom, Leica SM 2000 R, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- Schüttler, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
- Schütteltisch, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen
- Silikondocht, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
- Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
- Sterilfilter (0,2 µm), einmal Filterhalter, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
- Sterilfilter (0,22 µm), Steritop, Vakuumfilter, Millipore, Bedford, MA, USA
- Teflonscheiben, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen
- Teflonzylinder, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Uni Erlangen
- Transmissions Elektronen Mikroskop, TEM, Zeiss Leo 906 EM, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
- Ultracut, UCT, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- Ultrazentrifuge Centricon T-2170, Kontron Instruments, München, Deutschland
- USF Reinstwassersystem, USF Deutschland, Ransbach-Baumbach, Deutschland
- Vortex Typ REAX 1, Heidolph, Deutschland
- Waage, OHAUS GT410, Florham Peak, NJ, USA
- Waage, PM 480 Delta Range, Mettler Instruments, Giessen, Deutschland
- Wasserbad, GfL m.b.H., Hannover-Vienhorst, Deutschland
- Wasserbad, Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
- Zellsieb, 60 mesh (250 µm), CD-1 Sieb, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse zur Entwicklung und Optimierung von mEHTs sowie der Kontraktionsexperimente sind ausführlich in tabellarischer Form am Ende dieser Arbeit (Ergebnistabellen, Kapitel 12) aufgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung der Daten im Text auf ein für das Verständnis notwendiges Maß beschränkt.

3.1 Enzymatische Isolation, Ausbeute und Vitalität der Kardiomyozyten

Als Standardprotokoll für den Zellverdau wurde der Trypsinverdau analog zum bereits etablierten Rattenmodell verwendet. Dies geschah zum einen aufgrund der langjährigen Erfahrung der Arbeitsgruppe mit der Methode, zum anderen wegen der guten Standardisierbarkeit und damit Reproduzierbarkeit des Verfahrens.

In 47 durchgeführten Präparationen lag die Zellausbeute pro Herz durchschnittlich bei $0,98 \pm 0,02 \times 10^6$ Zellen. Bei Präparationen weniger Tiere (bis 20) wurde eine kleinere Ausbeute erzielt als bei großen Tierzahlen, was beim Rattenmodell in ähnlicher Weise zu beobachten war. Die Zellvitalität wurde anhand dreier stichprobenartig ausgewählter Zellpräparationen mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Hierbei können avitale Zellen aufgrund ihrer Blaufärbung unter dem Mikroskop erkannt und ausgezählt werden. Im Mittel belief sich der Anteil avitaler, Trypan blau-gefärbter Zellen auf $9 \pm 0,01\%$.

3.2 Analyse des Wachstumsverhaltens von Kardiomyozyten auf biologischen Matrices sowie unter Zellzyklusinhibition

Während die Kultur neonataler Rattenkardiomyozyten ein gut standardisiertes und weit verbreitetes Verfahren ist, waren Bedingungen für die Kultur von Herzmuskelzellen neonataler Kardiomyozyten der Maus zum Zeitpunkt dieser Arbeit kaum beschrieben (Karlner et al. 2000). Daher wurde zunächst der Einfluss von extrazellulärer Matrix bzw. anderen polymeren Kulturoberflächen (Collagen, Fibronectin, Gelatine, Laminin oder Poly-L-Lysin) sowie von Zellzyklusinhibition (Cytosin-Arabinosid [25 μ M]) zur Verhinderung von unkontrolliertem Wachstum von Nicht-Kardiomyozyten erprobt. Nach 6 Kulturtagen wurden die kultivierten Zellen fixiert und nach Immunfluoreszenzfärbung von α -Aktinin per CLSM analysiert.

3.2.1 Analyse der Kardiomyozytengröße in 2D-Kultur

Auf Laminin kultivierte Kardiomyozyten zeigten im Vergleich zu den anderen Gruppen dichte und gut differenzierte Sarkomerstrukturen (Abb. 3 und 4) und waren dabei deutlich größer (Abb. 3-5). Unter Zellzyklusinhibition mit AraC waren Herzmuskelzellen im Mittel um 24% kleiner (Abb. 5). Sowohl die Größe als auch Anzahl von Fibroblasten waren unter Ara-C Behandlung geringer (Abb. 3-4).

3.2.2 Beurteilung der kontraktile Funktion von kultivierten Kardiomyozyten

Mauskardiomyozyten zeigten auf Poly-L-Lysin und Gelatine nur sehr vereinzelt spontane Kontraktionen. Dagegen entwickelten sich gut kontrahierende Kardiomyozyten auf Collagen/Fibronectin, Collagen, Fibronectin und Laminin. Unter Zellzyklusinhibition mit AraC zeigte sich in allen Gruppen ein höherer Anteil avitaler Zellen (abgerundete Zellen oder Zelltrümmer). Zugleich war der Anteil kontrahierender Zellen unter AraC-Behandlung höher.

Verwendete Matrix	Zellzyklus- inhibition	Kardiomyozytenanteil	Avitale Zellen	Kontrahierende Herzmuskelzellen
Collagen/Fibronectin	+ AraC	++	++	ja
Collagen/Fibronectin	- AraC	+	+	ja
Collagen	+ AraC	++	++	ja
Collagen	- AraC	+	+	ja
Fibronectin	+ AraC	+	++	ja
Fibronectin	- AraC	+	+	nein
Gelatine	+ AraC	+	++	nein
Gelatine	- AraC	+	++	nein
Laminin	+ AraC	+++	+	ja
Laminin	- AraC	++	+	ja
Poly-L-Lysin	+ AraC	+	++	nein
Poly-L-Lysin	- AraC	+	++	nein

Tabelle 6: Semiquantitative Beurteilung von murinen Kardiomyozyten-Einzelschichtkulturen auf unterschiedlichen Kulturoberflächen sowie in An- bzw. Abwesenheit von Zellzyklusinhibition mit AraC an Kulturtag 6

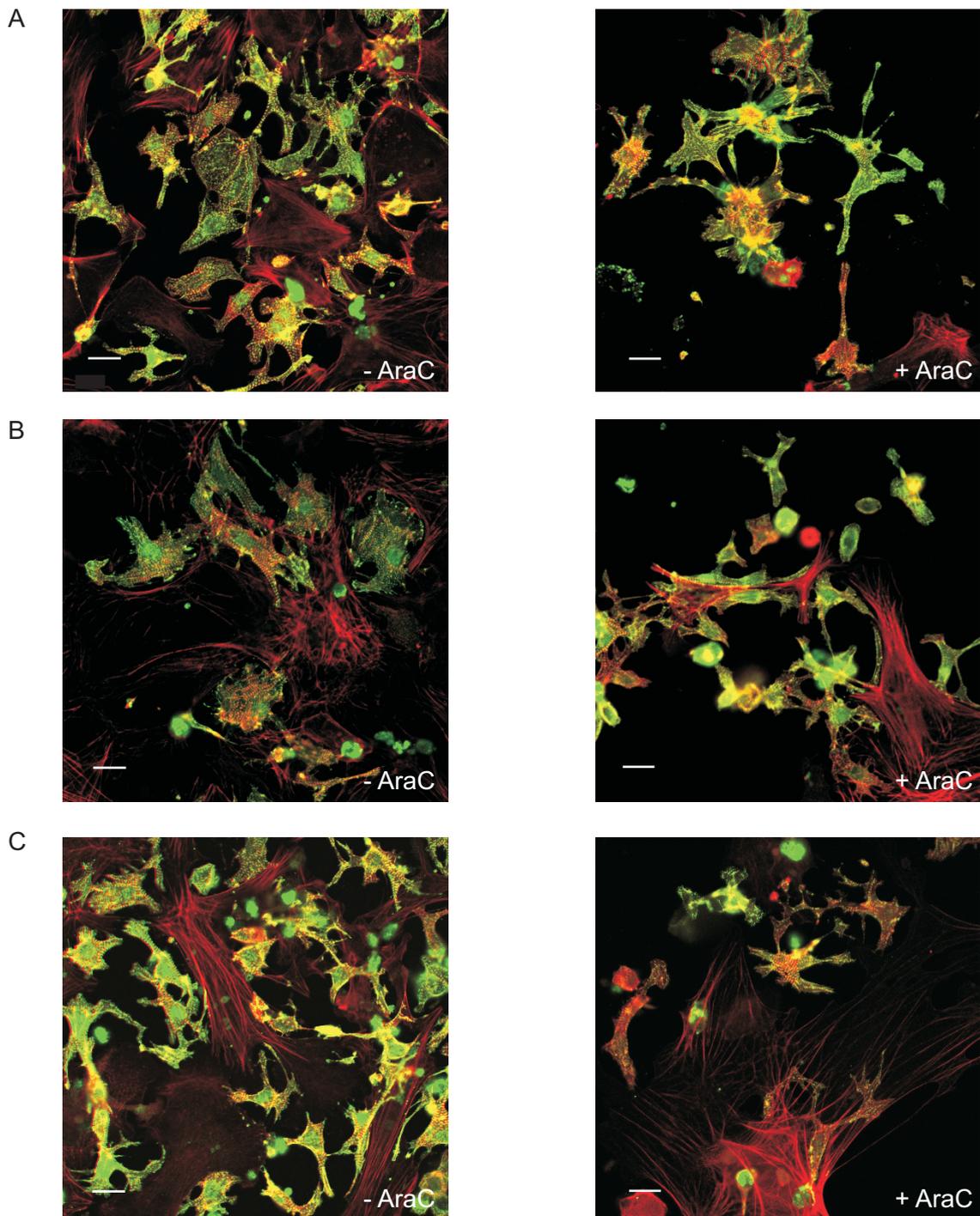


Abbildung 3: Effekt verschiedener biologischer Matrices sowie von Zellzyklusinhibition (25 µM Cytosinarabinsid: AraC) auf das Wachstum muriner Kardiomyozyten in Einzellschichtkulturen. Die Abbildungen zeigen die Morphologien von Herzmuskelzellen auf Collagen/Fibronectin (A), Collagen (B), und Fibronectin (C) ohne und mit AraC. Dargestellt sind CLSM-Aufnahmen immunfluoreszenzgefärbter Zellen (α-Aktinin - grün und f-Aktin - rot). Maßstäbe 20 µm

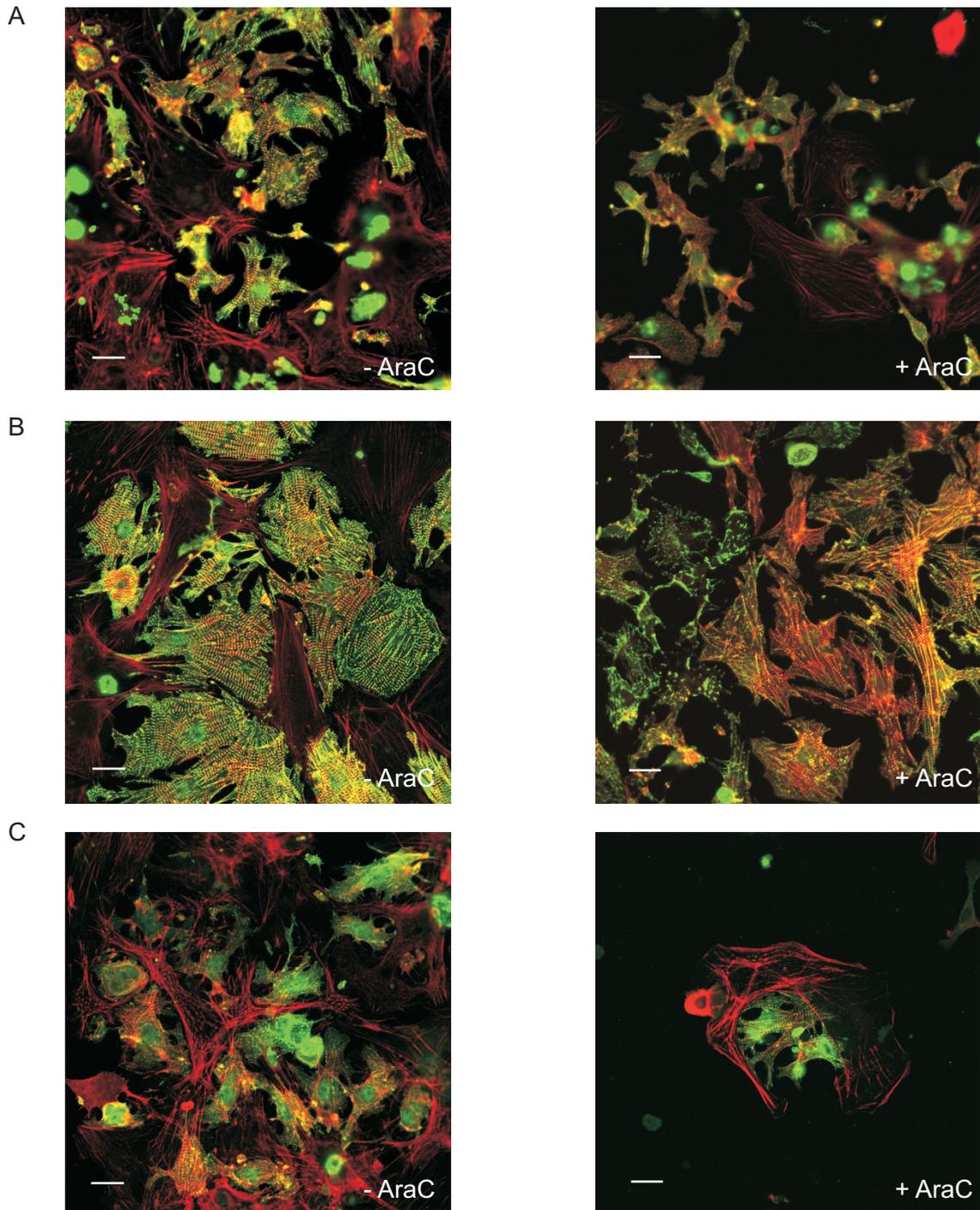
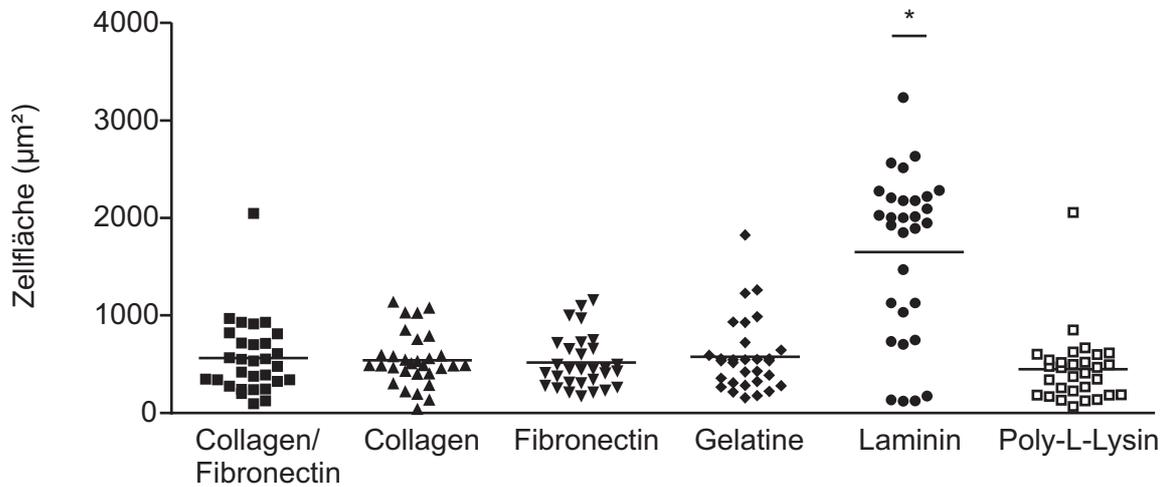


Abbildung 4: Effekt verschiedener biologischer Matrizes sowie von Zellzyklusinhibition (25 µM Cytosinarabinsid: AraC) auf das Wachstum muriner Kardiomyozyten in Einzellschichtkulturen. Die Abbildungen zeigen die Morphologien von Herzmuskelzellen auf Gelatine (A), Laminin (B) und Poly-L-Lysin (C) ohne und mit AraC. Dargestellt sind CLSM-Aufnahmen immunfluoreszenzgefärbter Zellen (α-Aktinin - grün und f-Aktin - rot). Maßstäbe 20 µm

A



B

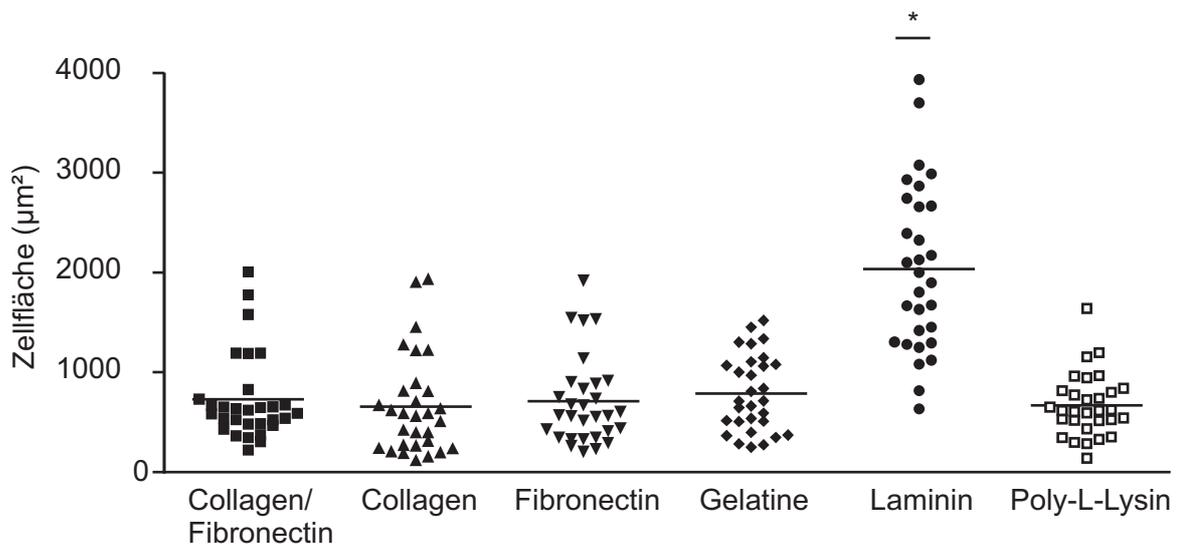


Abbildung 5: Darstellung der individuellen Kardiomyozytengröße bei Kultur auf verschiedenen biologischen Matrices. Hierbei erfolgte die Kultur mit (A) und ohne (B) Zellzyklusinhibition (25 µM AraC). Die Zellgröße wurde morphometrisch nach Immunfluoreszenzfärbung (s. Abb. 3 und 4) ausgewertet. Die Matrices wurden in folgenden Konzentrationen zur Beschichtung der Kulturoberfläche verwendet: Collagen/Fibronectin (50/10 µg/ml), Collagen (50 µg/ml), Fibronectin (10 µg/ml), Gelatine (1% in PBS), Laminin (10 µg/ml), Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml). * $p < 0,05$ vs. Collagen/Fibronectin mittels *one way ANOVA* und Bonferroni post-hoc Test.

3.3 Etablierung von kohärent kontrahierenden mEHTs

Das etablierte Protokoll zur Herstellung von EHTs aus Herzmuskelzellen neonataler Ratten eignete sich nicht zur Herstellung von mEHTs, so dass die Rekonstitutionsbedingungen zunächst an das Mausmodell angepasst werden mussten. Dafür wurde die Zellzusammensetzung in EHTs, die Geometrie der EHT-Gussformen, die Zellzahl pro EHT und die EHT-Matrixzusammensetzung modifiziert. Im Rahmen dieser Versuche wurde auf Kontraktionsexperimente weitestgehend verzichtet und lediglich beurteilt, ob sich spontan und kohärent kontrahierende mEHTs unter den gewählten Bedingungen ausbildeten.

3.3.1 Verwendung von Ganzherzzellisolaten zur mEHT-Herstellung

Aufgrund der geringeren Zellausbeute pro Mauserz (1×10^6 /Herz) im Vergleich zur Zellausbeute aus neonatalen Rattenherzen ($2-3 \times 10^6$ /Herz) wurde der EHT-Rekonstitutionsansatz aus praktischen Gründen halbiert (450 μ l im Mausmodell vs. 900 μ l im Rattenmodell). Darüber hinaus war, im Gegensatz zum Rattenmodell, die Verwendung von ventrikulären und atrialen Zellen zur Herstellung von kontraktile mEHTs notwendig. mEHTs mit reinen ventrikulären Zellpopulationen entwickelten keine Kontraktionen.

3.3.2 Variation der mEHT-Geometrie und Kulturbedingungen

Um die Ausbildung von zirkulären mEHTs zu fördern, wurden die verwendeten Gussformen auf das im Vergleich zum Rattenmodell reduzierte Volumen (450 μ l) angepasst und in ihrer Geometrie variiert. Dafür wurden, unter Berücksichtigung eines konstanten Rekonstitutionsvolumens von 450 μ l, breite/flache (Durchmesser: 10,4 mm, Höhe: 2,5 mm) und schmale/hohe (Durchmesser: 6,6 mm, Höhe: 5 mm) Gussformen hergestellt. In den flachen Gussformen bildeten sich lediglich einzelschichtartige Kulturen aus, die sich im Kulturverlauf von den Rändern aus einzurollen begannen. Das „Einrollen“ blieb allerdings inkomplett, und ein Großteil der EHT-Rekonstitutionsmatrix blieb am Kulturschalenboden angeheftet. Dieser Prozess sollte durch auf die EHT-Ränder einwirkende Scherkräfte verbessert werden. Dafür wurden die mEHTs unter dauerhafter horizontaler Rotation kultiviert. Die Rotation wurde zu einem Zeitpunkt begonnen, an dem mEHTs bereits einzelne kontrahierende Areale aufwiesen. Dies war in der Regel an Kulturtag 2 der Fall. Obwohl die Rotation zu einer verbesserten Ausbildung von mEHT in flachen Gussformen führte, blieb der EHT-Entwicklungsprozess suboptimal. In hohen Gussformen bildeten sich dagegen auch ohne Rotation kompakte zirkuläre EHT-Strukturen aus, die zu einem späteren Kulturzeitpunkt (Kulturtag 7) ohne Probleme in eine Dehnapparatur transferiert werden

konnten. Jedoch beschleunigte eine Kultur unter horizontaler Rotation (Kulturtag 2-7) auch hier die Ausbildung zirkulärer mEHTs. Neben den mechanischen Einflüssen (Scherkräfte) der Rotationskultur, sollte dadurch eine ständige Durchmischung des Kulturmediums mit einer gleichmäßigen Verteilung und damit Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet werden.

3.3.3 Variation der Zellzahl in mEHTs

Während die EHT-Rekonstitutionsmischung in den initialen Versuchen der Standard-Ratten-EHT-Zusammensetzung entsprach ($1,25 \times 10^6$ Zellen/450 μ l EHT), wurde im Folgenden die Zelldichte pro EHT variiert (1×10^6 bis 3×10^6 pro EHT). Bei niedrigen Zellkonzentrationen (1×10^6 Zellen) kam es nach anfänglichem Spreiten der Zellen innerhalb der mEHTs nur zu einer spärlichen Ausbildung von Zell-Zell Kontakten. Kohärente Kontraktionen zeigten sich in nur einem von 4 mEHTs mit 1×10^6 Zellen. Konstrukte mit höheren Zellzahlen bildeten in Abhängigkeit von der Zelldichte vermehrt längsorientierte, rhythmisch kontrahierende Zellstränge aus. Parallel zur Zunahme der zellulären Organisation zeigten mEHTs mit höheren Zelldichten eine Anhäufung abgerundeter, vermutlich avitaler Zellen. Diese konzentrierten sich vorzugsweise isoliert innerhalb der mEHTs in Form klumpiger Aggregate, aber auch entlang kontrahierender Zellstränge. Bei 3×10^6 Zellen/EHT zeigte sich eine massive Ansammlung von Zell- bzw. Debrisaggregaten. Kohärent schlagende Strukturen waren in mEHTs mit 3×10^6 Zellen nicht zu beobachten.

Neben der Kontraktilität veränderte sich auch die Konsistenz der Konstrukte in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl. So wiesen mEHTs mit $1-1,5 \times 10^6$ Zellen eine sehr weiche Konsistenz und damit erschwerte Handhabung auf. Vor allem das manuelle Überführen der mEHTs von den Kulturschalen auf die, zu diesem Zeitpunkt standardmäßig verwendeten, physischen Dehnvorrichtungen an Kulturtag 7 erwies sich als limitierender Faktor, d.h. zellärmere EHTs neigten dazu, beim Transfer zu zerreißen. mEHTs aus 3×10^6 Zellen hingegen zeigten eine ausgeprägte, im Kulturverlauf zunehmende Steifheit. Dieses führte dann wiederum zu vermehrten Konstruktrissen vor allem zu späteren Zeitpunkten während der Kultur unter chronischer Dehnung (ab Kulturtag 7). In Tabelle 7 sind die Eigenschaften von mEHTs mit unterschiedlichen Zelldichten dargestellt.

Zellzahl/mEHT	1×10^6	$1,5 \times 10^6$	2×10^6	$2,5 \times 10^6$	3×10^6
Anzahl hergestellter mEHTs	4	4	4	4	4

Zell-Zell-Kontakte	+	+	+++	+++	+
Abgerundete, avitale Zellen	+	+	+	++	+++
Zellstränge	-	+	+++	+++	-

Gerissen bis Kulturtag 7	3	0	0	0	0
Gerissen ab Kulturtag 7	0	0	0	0	4

Kontrahierende mEHTs	1	4	4	4	0
Stärke der Kontraktionen	+	++	+++	+++	-

Tabelle 7: Auswirkung der Zelldichte auf die Morphologie, Funktion und Festigkeit von mEHTs. Der mikroskopische Vergleich der Anzahl sich ausbildender Zell-Zell-Kontakte, der Ansammlung abgerundeter Zellen sowie der Ausbildung von Zellsträngen in mEHTs erfolgte an Kulturtag 7. Die mEHT-Kultur wurde ab Kulturtag 7 für weitere 7 Tage unter chronischer (phasischer) Dehnung fortgeführt. Angegeben ist ebenfalls die Anzahl von nach 14 Kulturtagen kohärent kontrahierenden mEHTs sowie eine mikroskopische Beurteilung der Kontraktionsstärke dieser mEHTs.

- (nicht nachweisbar) bis +++ (stark vorhanden).

3.3.4 Variation der Matrixzusammensetzung von mEHTs

Matrigel (~60% Laminin, ~30% Collagen und Wachstumsfaktoren) wurde als essentieller Faktor zur Herstellung von EHTs aus Herzmuskelzellen neonataler Ratten identifiziert (Zimmermann et al. 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Einzelschichtkultur-Experimente zeigten, dass Laminin, im Gegensatz zu den anderen getesteten Matrices (Abb. 3-5), das Wachstum von murinen Herzmuskelzellen fördert. Ausgehend von diesen Vorbefunden wurde die Anwendung von Matrigel, Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel und Laminin zur mEHT Herstellung getestet. Alternativ wurden mEHTs ohne Matrigel bzw. Laminin hergestellt. mEHTs jeder Gruppe bildeten im Kulturverlauf spontan kontrahierende Areale aus. Ein wichtiger Faktor bei der EHT-Herstellung ist die Entwicklung einer stabilen Gewebe-ähnlichen Struktur, die eine Kultur unter mechanischer Dehnung ermöglicht, und die Ausbildung kohärenter Kontraktionen. Hier zeigten EHTs mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel Vorteile gegenüber den anderen Versuchsgruppen, d.h. der Anteil, der im Kontraktionsexperiment messbar Kraft entwickelnden mEHTs war in dieser Gruppe höher (47% vs 0 [Matrigel]/19[Laminin]/25[-Matrigel]%; Abb. 6).

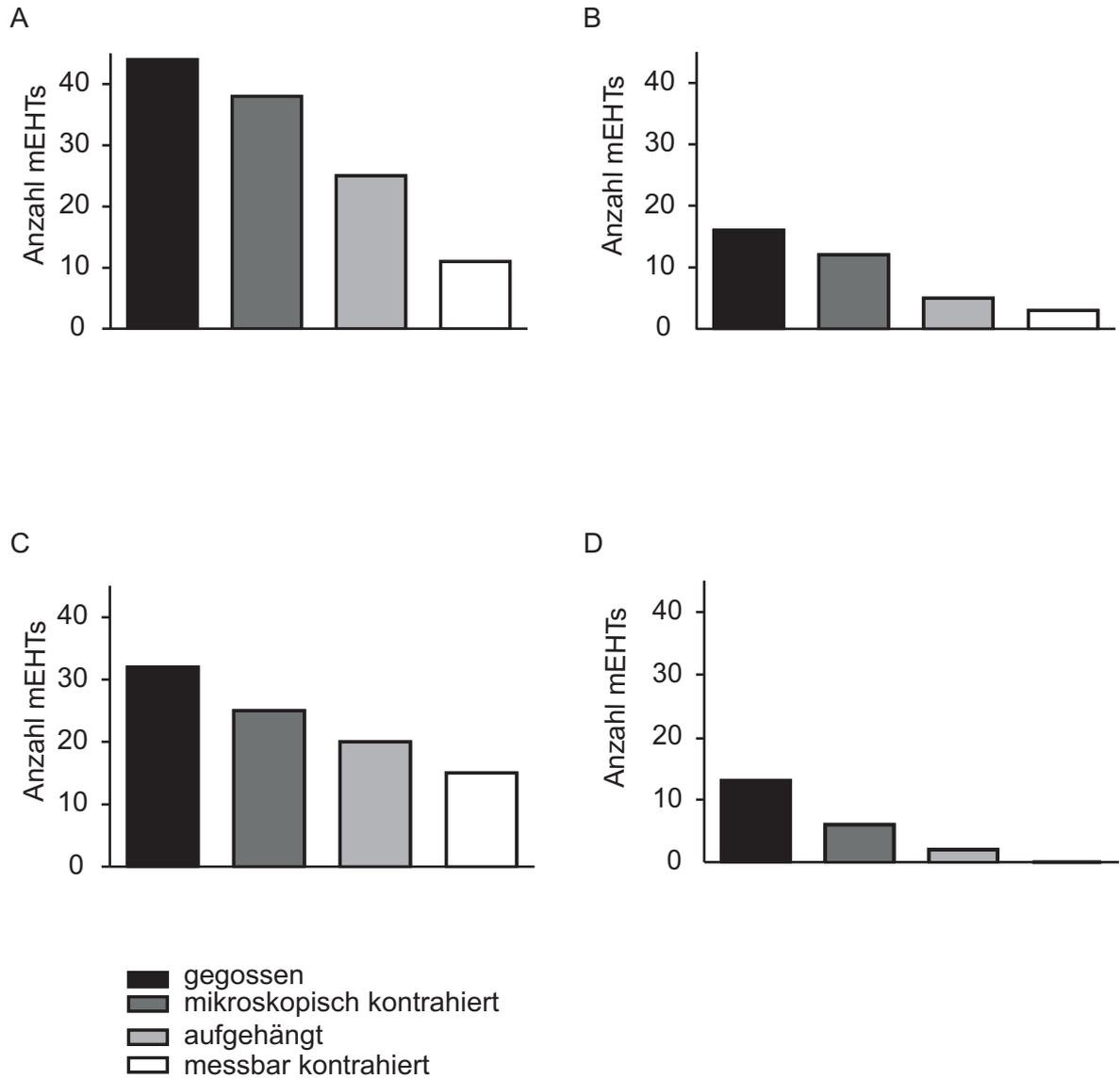


Abbildung 6: Beurteilung der Anwendung unterschiedlicher biologischer Matrices zusätzlich zu Collagen Typ I bei der Herstellung von mEHTs; verglichen wurden nur aus Collagen (A) sowie mit Laminin (B), Matrigel Wachstumsfaktor-reduziert (C) oder Matrigel (D) hergestellte Konstrukte. Auf den Ordinaten ist die Anzahl der jeweils hergestellten ("gegossen"), der mikroskopisch sichtbar kontrahierenden, der ins Organbad transferierten ("aufgehängt") und der messbar kontrahierenden mEHTs der jeweiligen Bedingung dargestellt.

3.4 Optimierung der kontraktile Funktion von mEHTs

Nach der Etablierung einer Technologie zur Herstellung kohärent kontrahierender mEHTs sollte deren kontraktile Funktion durch Modifikation der Kulturbedingungen optimiert werden. Dafür wurde im Folgenden der Einfluss von Zellzyklusinhibition, Sauerstoff, mechanischer Dehnung sowie von Wachstum fördernden Medium-Supplementen auf die mEHT-Entwicklung untersucht. Im Gegensatz zu den Etablierungsexperimenten wurde hier als Endpunkt die kontraktile Funktion von mEHTs im isometrischen Kontraktionsexperiment bestimmt. Alle Experimente wurden mit mEHTs (450 μ l Rekonstitutionsvolumen; 2×10^6 atriale und ventrikuläre Herzzellen; 10% Wachstumsfaktor reduziertes Matrigel) in den zuvor beschriebenen hohen Gussformen, sowie unter horizontaler Rotation (Kulturtag 2-7) und anschließender mechanischer Dehnung (Kulturtag 7-14) durchgeführt.

3.4.1 Passagere Zellzyklusinhibition mit AraC in mEHTs

Im Gegensatz zu Ratten-EHTs bildeten mEHTs im Kulturverlauf eine deutlich festere Matrixstruktur aus. Fibroblasten sind ein wesentlicher Bestandteil frisch isolierter Herzzellen und tragen in EHTs zu Matrix-Um/Aufbauvorgängen bei. In Einzelschichtkulturen kommt es in der Regel zu einer Überwucherung postmitotischer Kardiomyozyten durch Fibroblasten. Durch eine pharmakologische Zellzyklusinhibition mit Cytosin-Arabinosid (AraC) kann dieses verhindert werden (Karliner et al. 2000). Um eine Überwucherung mit Fibroblasten und damit zugleich eine „Fibrosierung“ von mEHTs zu verhindern, wurde der Effekt einer passageren Zellzyklusinhibition mit AraC (25 μ mol/l) erprobt. Um die Zellzyklusinhibition so selektiv wie möglich auf das Fibroblastenwachstum unter Schonung der Kardiomyozyten durchzuführen, wurde das Kulturmedium nur an den Kulturtagen 5-7 mit AraC supplementiert. Zu diesem Zeitpunkt konnten in mEHTs bereits kohärent kontrahierende Areale identifiziert werden. Zugleich war eine progrediente „Fibrosierung“ von mEHT besonders in diesem Zeitraum zu beobachten. Postmitotische Kardiomyozyten sollten im Gegensatz zu den sich teilenden Fibroblasten nicht von einer AraC-Behandlung beeinflusst werden. Tatsächlich führte die transiente Zugabe von AraC zu einer höheren Kontraktionskraft (Kontraktionskraft bei 0,2 mmol/l Calcium in μ N; +AraC, n=11 vs. -AraC, n=9: 40 ± 10 vs. 20 ± 4 ; Abb. 7A) sowie gesteigertem Ansprechen auf inotrope Stimulation mit Calcium (Änderung der Kontraktionskraft von 0,2 mmol auf 1,2 mmol Calcium in $\Delta\mu$ N, - vs. +AraC: $+20 \pm 6$ vs. 43 ± 13 ; Abb. 7B) von mEHTs wobei dieser Effekt keine statistische Signifikanz erreichte ($p=0,06$ per *two-way* ANOVA für Messwiederholungen). Die mEHTs dieser Versuchsreihe wurden zwischen Kulturtag 7 und 14 unter auxotonischer Dehnung kultiviert.

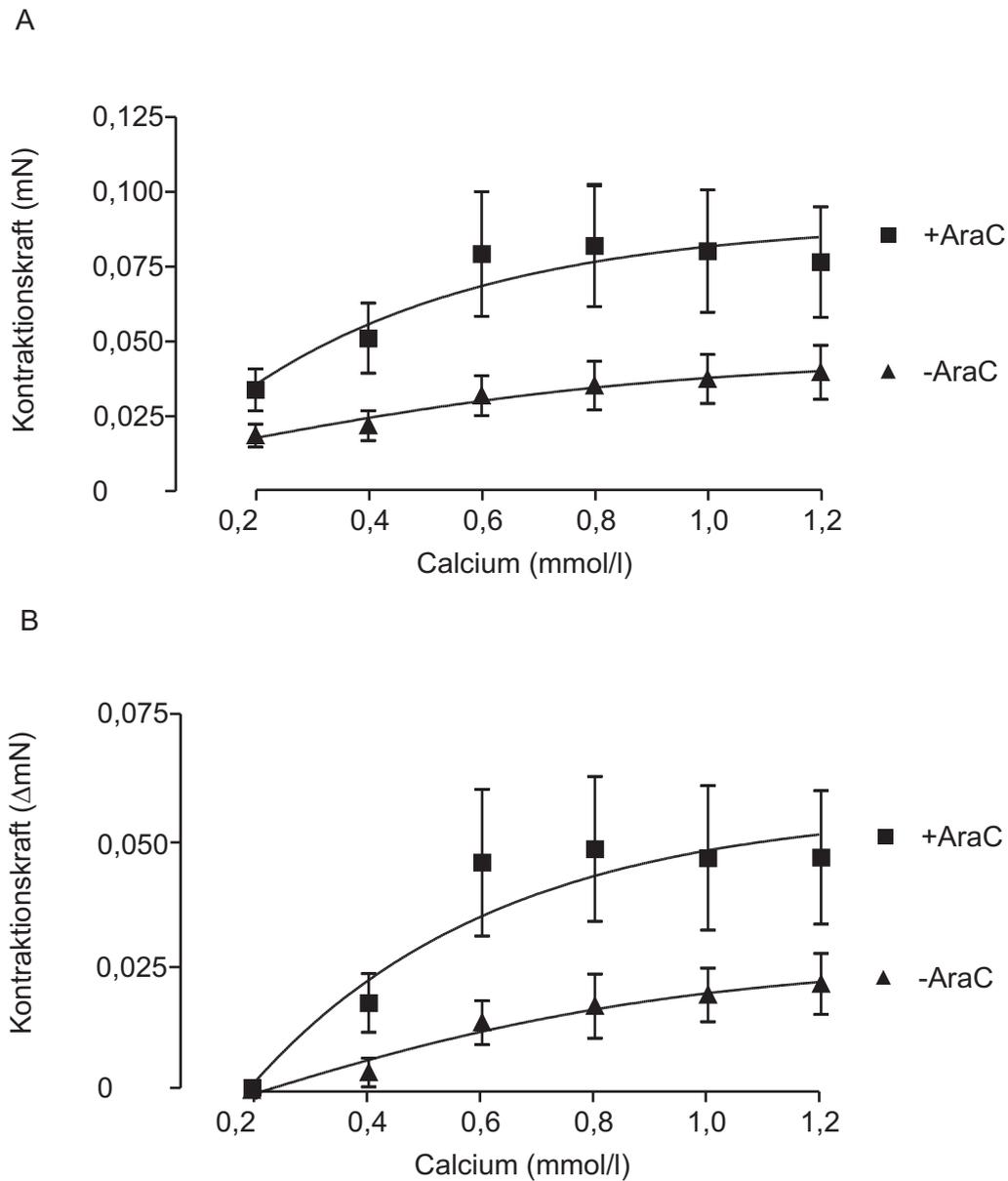


Abbildung 7: Effekte transientser Zellzyklusinhibition (Kulturstage 5-7) mit AraC (25 μ M) auf die kontraktile Funktion von mEHTs. Die Ordinatens stellen die Kontraktionskraft in mN (A) bzw. die Änderung der Kontraktionskraft in Δ mN (B) unter kumulativer inotroper Stimulation mit Calcium dar. -AraC (n=9) vs. +Ara (n=11); p=0,06 per *two-way* ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test.

3.4.2 Effekt des Sauerstoffgehalts unter Kultur auf die mEHT-Funktion

Herzmuskelzellen sind in hohem Maße von einer ausreichenden Sauerstoffzufuhr abhängig. Hypoxie führt zu einem Funktionsverlust von Kardiomyozyten sowie zu Apoptose (Eschenhagen und Weil 1998). Bereits unter Raumsauerstoff (21%) neigen vor allem metabolisch hoch aktive Zellen *in vitro* zur Hypoxie. Daher wurde der Effekt einer Erhöhung des Sauerstoffanteils auf 40% im Kulturmilieu auf die Entwicklung von mEHTs erprobt. Dabei zeigte sich eine deutliche höhere maximale Kraftentwicklung von mEHTs (Kontraktionskraft bei 1,2 mmol/l Calcium in mN, 21 vs. 40% O₂: 0,05±0,01 vs. 0,14±0,02, [n=19]; Abb. 8A) sowie ein signifikant gesteigertes Ansprechen auf inotrope Stimulation mit Calcium (Änderung der Kontraktionskraft von 0,2 mmol auf 1,2 mmol Calcium in ΔmN, 21 vs. 40% O₂: +0,02±0,01 vs. 0,09±0,02, Abb. 8B; p<0,001 per *two-way* ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test). Parallel zu der verbesserten kontraktile Funktion entwickelten mEHTs unter 40% O₂ einen höheren sarkomerischen Reifegrad mit der Ausbildung von längs orientierten, quergestreiften Kardiomyozyten, wenn verglichen mit mEHTs bei 21% O₂ (Abb. 8C+D). Die mEHTs dieser Versuchsreihe wurden zwischen Kulturtag 7 und 14 unter auxotonischer Dehnung kultiviert.

3.4.3 Effekt von Wachstumsfaktoren auf die mEHT-Funktion

Zur weitergehenden Optimierung des murinen EHT-Modells wurden Effekte verschiedener Mediumsupplemente untersucht. Während die Zugabe von Glutamin, Retinsäure, Vitamin B₁₂, nicht essentiellen Aminosäuren (L-Alanin/L-Asparagin/L-Glutamin/Glycin/L-Prolin/L-Serin) und Mausserum keinen Effekt auf die mEHT-Entwicklung und Funktion zeigte, konnte die Kontraktilität von mEHTs durch Triiodothyronin (T3; +200% von der Ausgangslage), sowie einer Mischung aus Insulin, Transferrin, Selen und Linolensäure (ITS+1; +300% von der Ausgangslage) verbessert werden (Abb. 9). Bei einer Kombination von T3 und ITS+1 zeigte sich ein additiver Effekt (+900% von der Ausgangslage; Abb. 9). Ein direkter Vergleich von T3 und ITS+1 Supplementation mit einer T3 und Insulin (10 µg/ml) Supplementation zeigte, dass der ITS+1 Effekt vor allem durch dessen Insulin-Anteil (ebenfalls 10 µg/ml) hervorgerufen wurde (Abb. 9). Die mEHTs dieser Versuchsreihe wurden zwischen Kulturtag 5 und 7 mit 25 µM AraC behandelt und an den Kulturtagen 7 und 14 unter auxotonischer Dehnung gehalten.

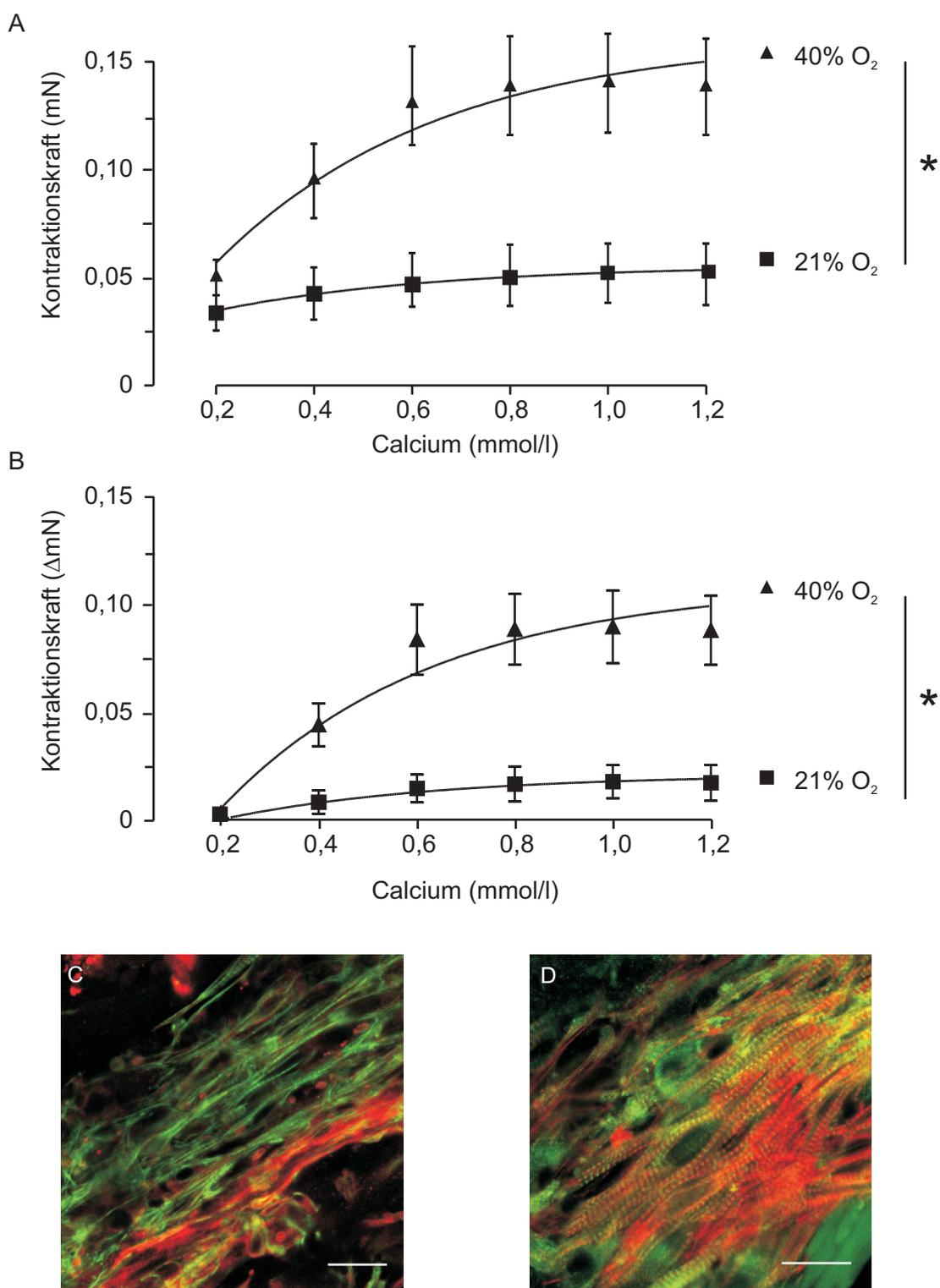


Abbildung 8: Effekte von Sauerstoff auf die kontraktile Funktion und myokardiale Struktur von mEHTs. A und B: Die Ordinaten stellen die Kontraktionskraft in mN (A) bzw. die Änderung der Kontraktionskraft der untersuchten mEHTs ($n=19$) in Δ mN (B) unter kumulativer inotroper Stimulation mit Calcium dar. C (21% O₂) und D (40% O₂): Repräsentative Darstellungen von Herzmuskelstrukturen in mEHTs (α -sarkomerisches Aktinin: grün; f-Aktin: rot; Maßstäbe: 20 μ m). * $p<0,05$ 21% vs. 40% Sauerstoff (two-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test).

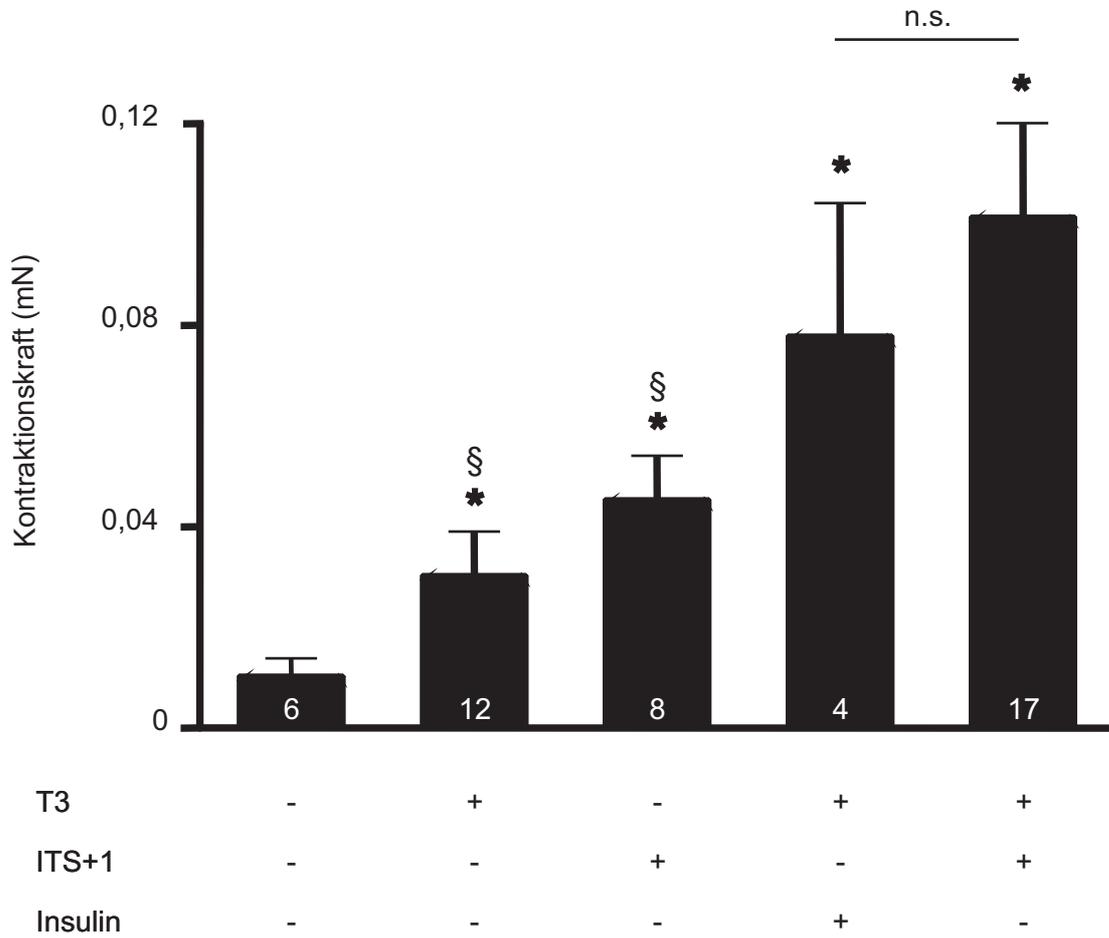


Abbildung 9: Effekt von T3- und Insulin-Supplementierung auf die Funktion von mEHTs. Dargestellt ist die Kontraktionskraft von chronisch (12 Tage) stimulierten mEHTs bei 1 mmol/l Calcium. Die Anzahl der pro Bedingung untersuchten mEHTs ist am Fuße der Säulen angegeben. * $p < 0,05$ vs. - Supplemente; § $p < 0,05$ vs. T3/ITS+1 (ANOVA mit LSD Test).

3.4.4 Effekt mechanischer Dehnung auf die mEHT-Funktion

Mechanische Dehnung führt zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion von EHTs aus Herzmuskelzellen embryonaler Hühnchen und neonataler Ratten (Fink et al. 2000). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass zirkuläre EHTs aus Herzmuskelzellen der Ratte weniger von phasischer als von auxotonischer Dehnung profitieren (Zimmermann et al. 2006). In auxotonisch gedehnten mEHTs (Kulturtag 7-14) zeigte sich ebenfalls eine bessere maximale Kontraktionskraft im Vergleich zu statisch oder phasisch (jeweils Kulturtag 7-14) gedehnten mEHTs (Abb. 10A) sowie ein besseres Ansprechen auf inotrope Stimulation mit Calcium (Abb. 10 B), wobei hierbei keine statistische Signifikanz erreicht wurde ($p=0,07$ per *two-way* ANOVA und Bonferroni post-hoc Test).

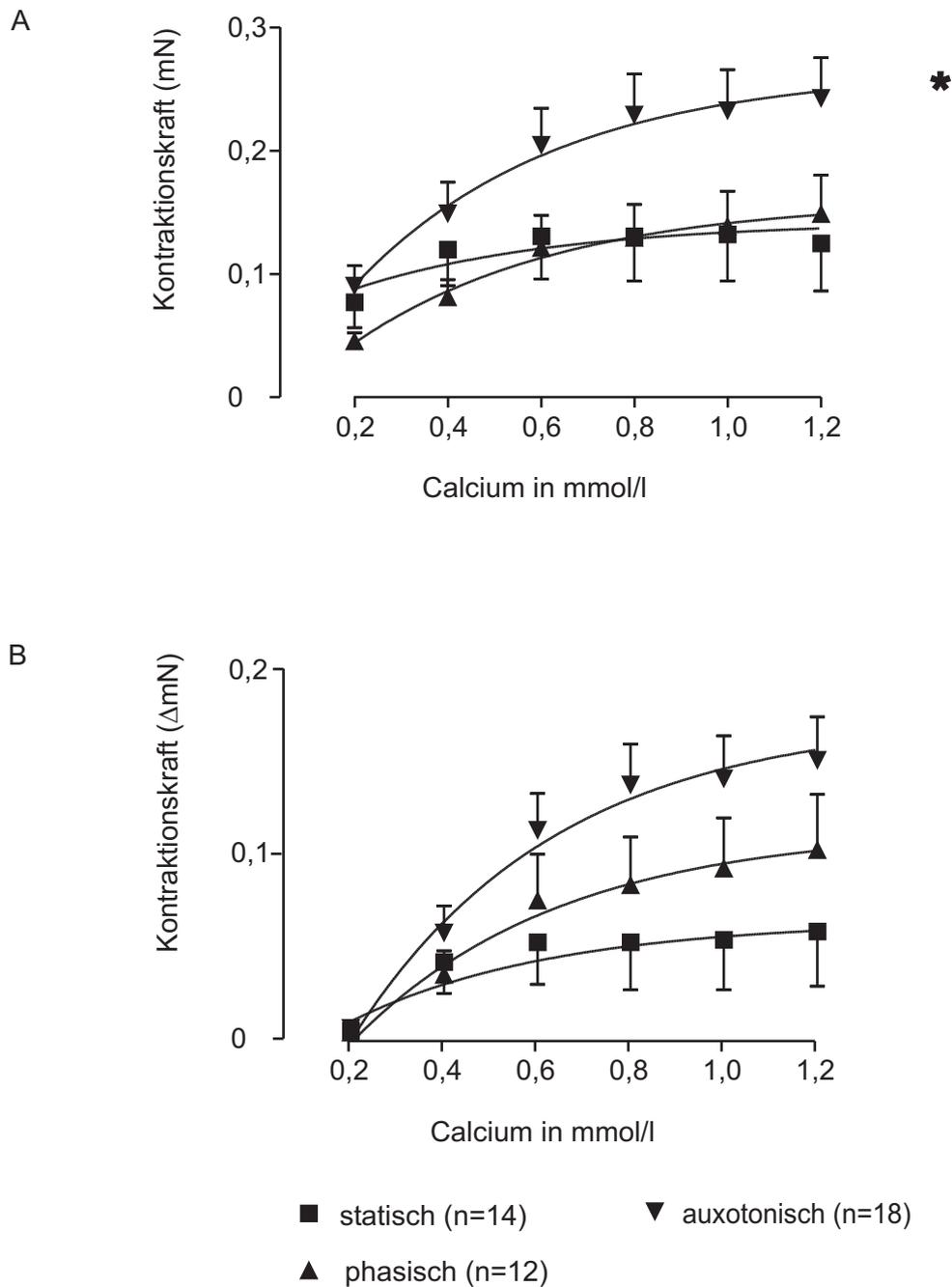


Abbildung 10: Effekte kontinuierlicher mechanischer Dehnung auf die kontraktile Funktion von mEHTs. Die Ordinaten stellen die Kontraktionskraft in mN (A) bzw. die Änderung der Kontraktionskraft der untersuchten mEHTs in Δ mN (B) unter kumulativer inotroper Stimulation mit Calcium dar. * $p < 0,05$ vs. statisch und phasisch (ANOVA für Messwiederholungen).

3.5 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften optimierter mEHTs

Aus den Befunden der zuvor beschriebenen Experimente wurde folgendes Standardprotokoll zur Herstellung von mEHTs abgeleitet:

Rekonstitutionsmischung zur Herstellung von 2 mEHTs:

Collagen Typ I (5,5 mg/ml)	160 μ l	→ 0,4 mg/EHT
2x EHT-Kulturmedium	160 μ l	
NaOH (0,1 N)	35 μ l	
Wachstumsfaktor reduziertes Matrigel	100 μ l	→ 10% v/v
Atriale/ventrikuläre Herzzellen ($8,1 \times 10^6$ Zellen/ml)	545 μ l	→ 2×10^6 Zellen/EHT
Gesamtvolumen	1000 μ l	

mEHT-Kulturbedingungen:

- 1) Kultur in Gussformen mit folgenden Maßen: 6,6/4 mm äußerer/innerer Durchmesser
5 mm Höhe
- 2) Kultur unter horizontaler Rotation von Kulturtag 2-7
- 3) Passagere Zellzyklusinhibition mit 25 μ mol/l AraC während den Kulturtagen 5-7
- 4) Kultur in Sauerstoff (40%) angereicherter Raumluft
- 5) Mediumsupplementation mit T3 und ITS+1
- 6) Kultur unter auxotonischer Dehnung von Kulturtag 7-14

In einer extra Versuchsserie wurden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von optimierten mEHT mittels CLSM und Elektronenmikroskopie sowie isometrischem Kontraktionsexperiment untersucht. Die Kontraktionsexperimente dienten hier vor allem zur Charakterisierung klassischer physiologischer Kontraktionsparameter wie dem Ansprechen auf Calcium sowie der Kontrolle der Funktionalität G-Protein vermittelter Effekte (G_s : Isoprenalin/ G_i : Carbachol).

3.5.1 Strukturelle Eigenschaften von optimierten mEHTs

3.5.1.1 Immunfluoreszenzfärbung

Innerhalb der mEHTs ließ sich ein charakteristisches Verteilungsmuster der Herzzellen erkennen. Ein Großteil der murinen Kardiomyozyten konzentrierte sich in Form eines dominanten, gut differenzierten Muskelstrangs am freien Rand der mEHTs. Die Zellstränge (Durchmesser $94 \pm 23 \mu\text{m}$; $n=4$) setzten sich aus mehreren Schichten längsorientierter Kardiomyozyten mit einer differenzierten Sarkomerstruktur zusammen (Abb. 11A). Im Zentrum der mEHTs bildeten sich vor allem lose Zellnetze aus vitalen und einzelnen abgekugelten avitalen Kardiomyozyten (Abb. 11B). Insgesamt war die Zellverteilung in mEHTs auch von der relativen Lage zu der Halteapparatur abhängig. Während differenzierte, lang gestreckte Kardiomyozyten hauptsächlich an den freien mEHT-Rändern zu beobachten waren (Abb. 11C), zeigte sich an den Stellen, an denen die EHTs direkt der Dehnapparatur anlagen, eine dichte, unausgerichtet wirkende Anhäufung muriner Kardiomyozyten (Abb. 11D).

3.5.1.2 Ultrastrukturanalyse von mEHTs

Elektronenmikroskopische Analysen zeigten, dass die Sarkomerorganisation in mEHTs abhängig von der Einbindung der Kardiomyozyten in einen rekonstituierten Muskelstrang war. Während Sarkomere von einzeln in der Matrix liegenden Kardiomyozyten keine gerichtete Organisation aufwiesen (Abb. 12A), zeigten die in Muskelsträngen organisierten Kardiomyozyten eine hochdifferenzierte sarkomerische Struktur mit einem klassischen Bandenmuster sowie eine parallele Sarkomerausrichtung (Abb. 12B). Ebenfalls zeigte sich die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über *gap junctions* (Abb. 12C) und *fasciae adhaerentes* (Abb. 12D).

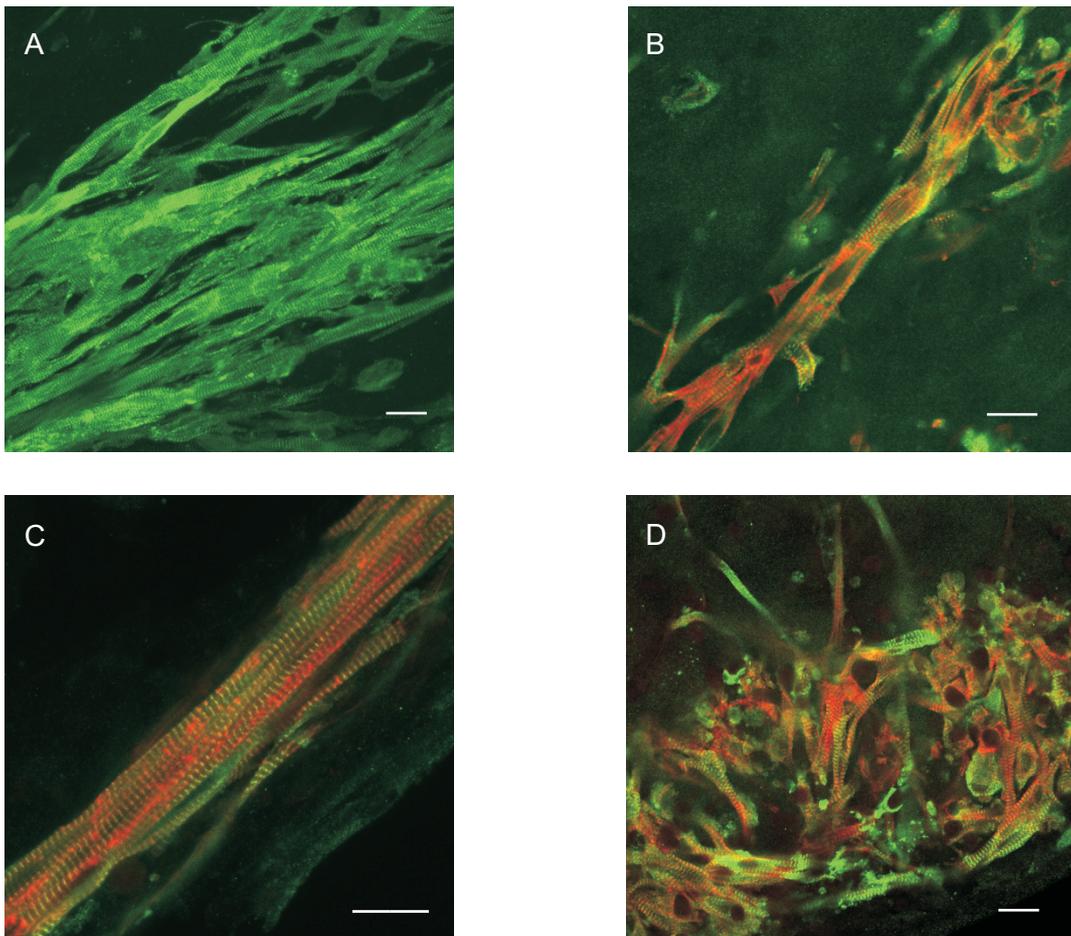


Abbildung 11: Entwicklung von komplexen myokardialen Strukturen in mEHTs. CLSM-Aufnahmen nach Immunfluoreszenzmarkierung von α -Aktinin (grün), f-Aktin (rot): (A) Ausgerichtete, differenzierte Muskelstränge an den freien Rändern der mEHTs; (B) unausgerichtete, in dünnen Strängen angeordnete Kardiomyozyten in der Mitte der mEHT-Matrix. Darüber hinaus ist der Unterschied zwischen frei kontrahierenden (C) und der Dehnapparatur während Kultur anliegenden mEHT-Bereichen (D) abgebildet. Maßstäbe 20 μ m

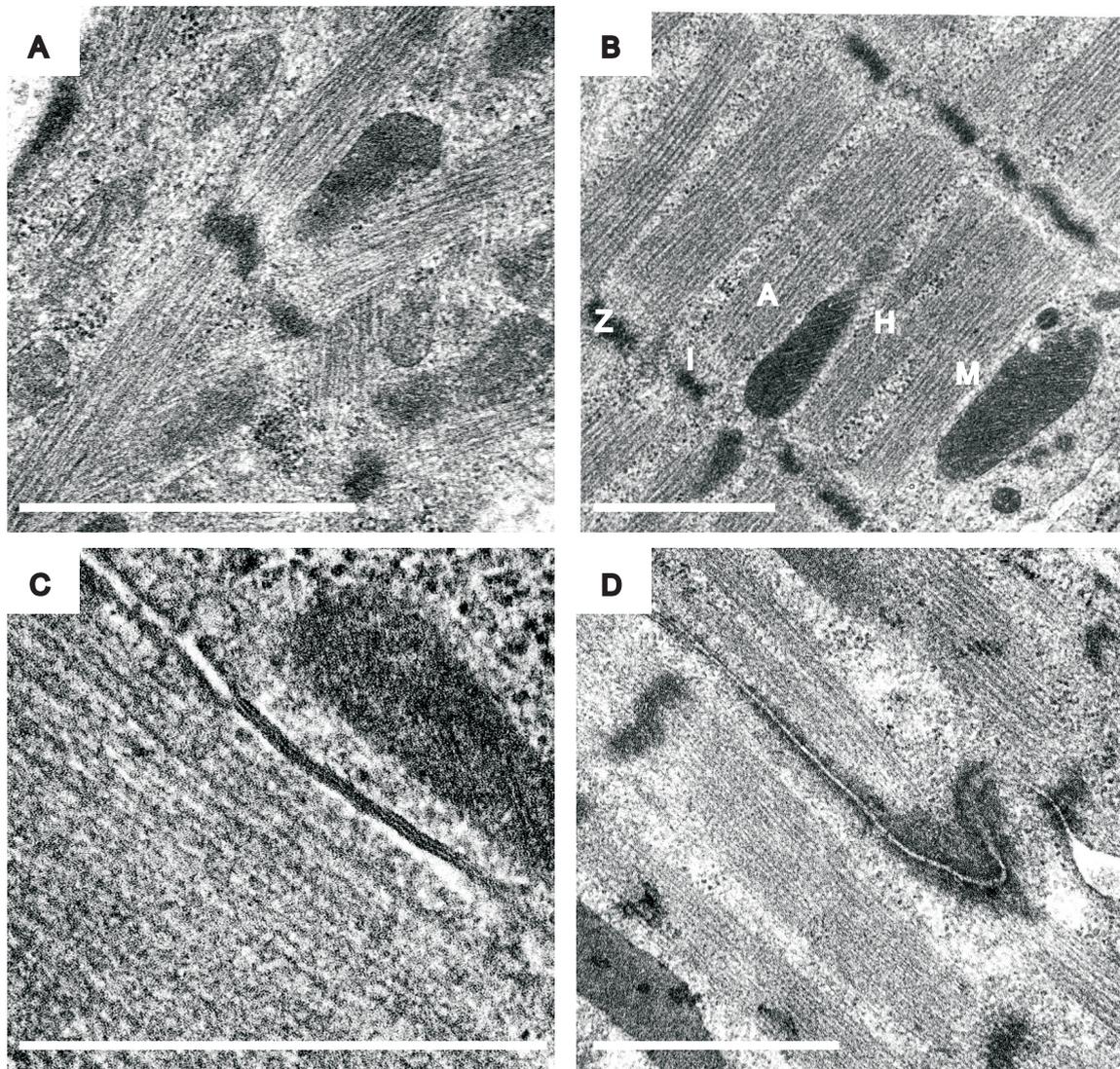


Abbildung 12: Ultrastrukturanalyse von mEHTs mittels Elektronenmikroskopie: (A) Isolierte Kardiomyozyte mit unausgerichteter Sarkomeranordnung; (B) in einen Muskelstrang integrierte Kardiomyozyte mit hoch differenzierter (abgrenzbare Z-, I-, A-, H- und M-Banden) Sarkomerstruktur; Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über *gap junctions* (C) und *fasciae adhaerentes* (D). Maßstäbe 1 μ m

3.5.2 Kontraktile Eigenschaften von optimierten mEHTs

3.5.2.1 Spontanfrequenz

mEHTs zeigten direkt nach dem Aufhängen in Organbäder mit Tyrode-Lösung bei 1 mM Calcium hohe Kontraktionsfrequenzen. Diese lagen spontan und unstimuliert bei $6,5 \pm 0,3$ Hz ($n=6$; Abb. 13A). Nur sehr selten wurden mEHTs während der Äquilibrationsphase von 30 Minuten arrhythmisch mit Phasen hochfrequenter Kontraktionssalven und Pausen. Bei Feldstimulation mit 8 Hz kontrahierten alle mEHTs rhythmisch. Die folgenden Kontraktionsexperimente wurden daher bei 8 Hz durchgeführt.

3.5.2.2 Inotroper Effekt von Calcium

Unter Stimulation bei 8 Hz zeigten mEHTs einen positiv inotropen Effekt unter Calciumstimulation. Ausgehend von $0,12 \pm 0,03$ mN bei 0,2 mM Calcium war eine maximale Kraftentwicklung von $0,31 \pm 0,07$ mN bei 1 mM Calcium (C_{max}) zu beobachten (+158%; Abb. 13B). Der halbmaximale Calciumeffekt (EC_{50}) war bei 0,4 mM erreicht. Eine Steigerung über 1,2 mM Calcium führte zu einer leichten Abnahme der Kontraktionskraft und zu einem Auftreten von Arrhythmien.

3.5.2.3 Inotroper und lusitroper Effekt von Isoprenalin

Isoprenalin aktiviert durch Stimulation von β -Adrenorezeptoren vermittelt über stimulatorische G-Proteine (G_s) die Adenylylcyclase (Katz 1992). Der Nachweis inotroper und lusitroper Effekte von Isoprenalin erfolgte bei 0,2 mM Calcium. Dafür wurden mEHTs mit einer Isoprenalinkonzentration von 1 μ M stimuliert. Hier steigerte Isoprenalin die Kontraktionskraft der mEHTs um 92%, verkürzte die Anspannungszeit (T_2) um 27% und verminderte die Grundspannung um 21% (Abb. 13B).

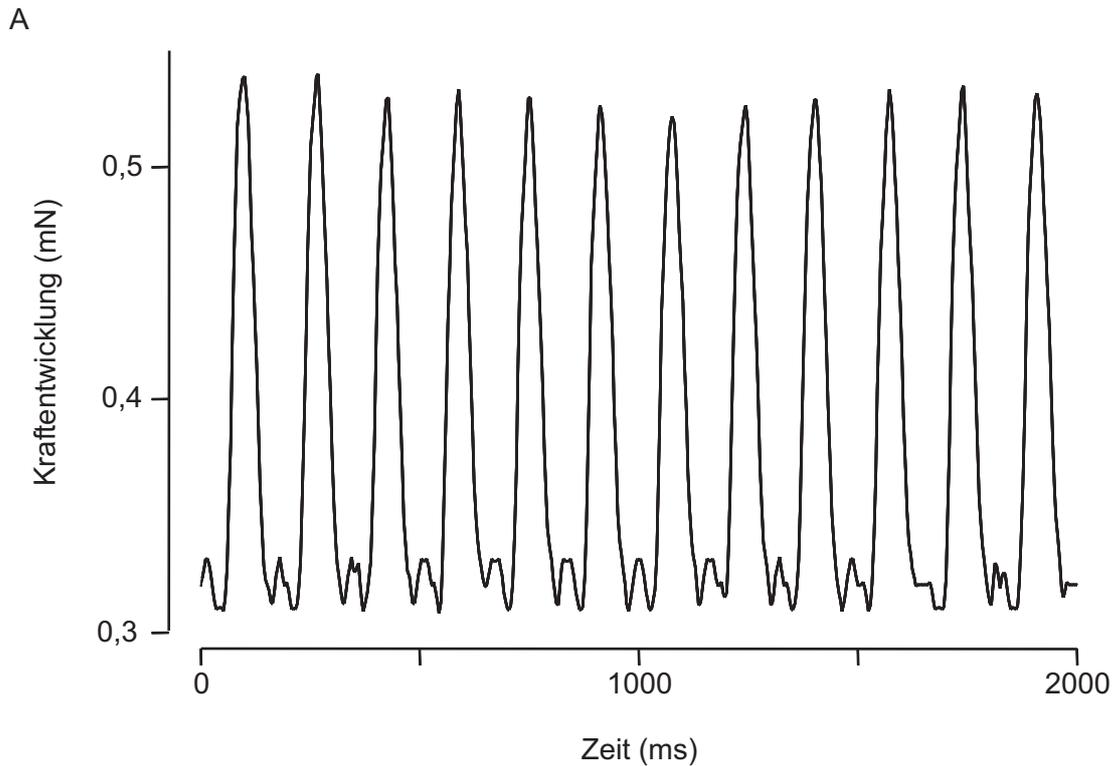
3.5.2.4 Inotroper Effekt von Carbachol

Carbachol führt über die Stimulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (M_2) zu einer Hemmung der Adenylylcyclase über inhibitorische G-Proteine (G_i ; Katz 1992). Untersucht wurde der indirekte Carbacholeffekt nach Isoprenalinstimulation auf Kontraktionskraft und Kontraktionsdauer von mEHTs. Während der lusitrope Effekt von Isoprenalin von Carbachol (1 μ M) nicht aufgehoben wurde, antagonisierte Carbachol den positiv inotropen

Isoprenalineffekt teilweise (Abb. 13B). Während die Kontraktionskraft um 17% abnahm, blieb die Grundspannung unverändert.

3.6 Vergleich von mEHTs aus Kardiomyozyten unterschiedlicher Mausstämme

Die bisher beschriebenen Befunde wurden ausschließlich mit Herzzellen von NMRI-Mäusen erhoben. Dabei handelt es sich um einen Auszuchtstamm mit einer großen Nachkommenzahl, der allerdings nicht für genetische Manipulationen geeignet ist. Da dem mEHT-Modell vor allem Verwendung zur *in vitro Target-Validierung* unter Zuhilfenahme von Herzzellen aus genetisch manipulierten Mäusen zgedacht ist, wurde die Anwendung von Herzmuskelzellen von C57/black 6 (C57/b6) Mäusen erprobt. Dieser Inzuchtmausstamm wird regelhaft zur Herstellung genetisch manipulierter Mäuse verwendet. Auch mit C57/b6 Mäusen gelang die Herstellung von kontraktile mEHTs. In beiden parallel untersuchten mEHT-Modellen war ein positiv inotroper Effekt nach Stimulation mit Calcium nachweisbar. Dabei erreichten NMRI-mEHTs ein leicht höheres Kraftniveau (nicht signifikant) als C57/b6-mEHTs (Kontraktionskraft in mN bei 1 mmol/l Calcium: $0,12 \pm 0,03$ (n=7) vs. $0,07 \pm 0,02$ (n=8) bei gleicher Ausgangslage bei 0,2 mM Calcium; Abb. 14).



B

Calcium (mM)	0,2	1	0,2	0,2
Isoprenalin (μM)			1	1
Carbachol (μM)				1
Kontraktionskraft (mN)	$0,12 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,07^*$	$0,23 \pm 0,05^*$	$0,19 \pm 0,05^{*/**}$
Grundspannung (mN)	$0,24 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,04$
Anspannungszeit (ms)	22 ± 1	25 ± 1	$16 \pm 1^*$	$15 \pm 1^*$
Kontraktionszeit (ms)	30 ± 1	31 ± 1	$26 \pm 1^*$	$25 \pm 1^*$

Abbildung 13: Charakterisierung der kontraktiven Funktion von mEHT. (A) Repräsentative Aufzeichnung spontaner, unstimulierter Kontraktionen von mEHTs in Tyrode-Lösung bei 1 mM Calcium. (B) Zusammenfassung der kontraktiven Eigenschaften von mEHTs unter optimalen Rekonstitutionsbedingungen ($n=5$). * $p < 0,05$ vs. 0,2 mM Calcium; ** $p < 0,05$ vs. 1 μM Isoprenalin (gepaarter t-Test)

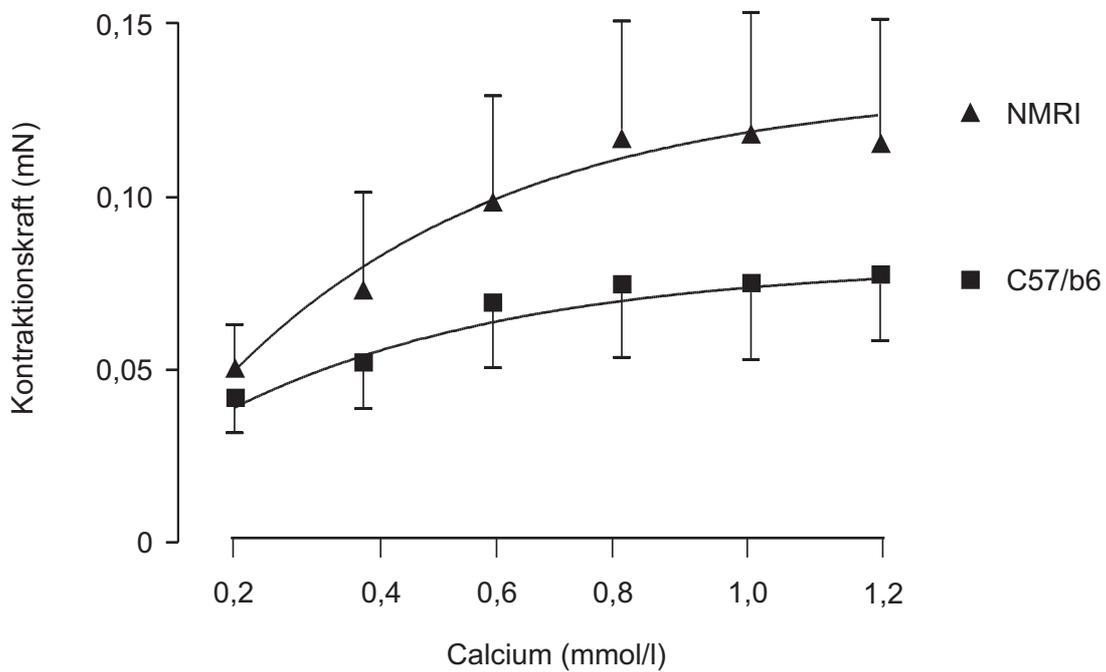


Abbildung 14: Kontraktile Eigenschaften von mEHTs aus Herzzellen von NMRI (n=7)- und C57/b6 (n=8)-Mäusen. Dargestellt ist die Kontraktionskraft von mEHTs bei steigenden extrazellulären Calciumkonzentrationen in Tyrode-Lösung. Die Daten wurden parallel in zwei unabhängigen Versuchsserien erhoben. NMRI vs. C57/b6 kein signifikanter Unterschied (*two-way ANOVA* für Messwiederholungen).

3.7. Herstellung transgener mEHTs

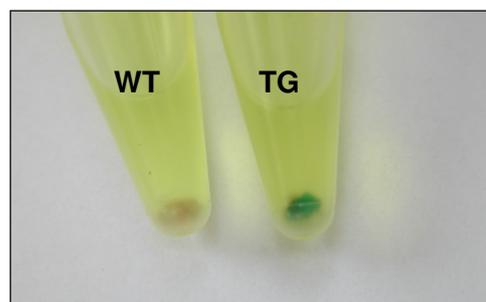
3.7.1 Adenoviraler Gentransfer in mEHTs

Rekombinante Adenoviren vom Typ 5 (Ad5LacZ) dienen als Vektoren zur Transfektion der bakteriellen β -Galaktosidase in mEHTs ($n=3$). Bei einer MOI von 50 zeigte sich eine transgene Markierung von Zellen in mEHTs (Abb. 15). Bei der verwendeten MOI wurde allerdings nur eine ungleichmäßige Transduktion erreicht. Die Transduktionseffizienz wurde im Rahmen dieser Studie nicht weiter optimiert. Bezüglich der erreichten Kontraktionskraft unterschieden sich die transgenen mEHTs nicht signifikant von der mitgeführten Kontrolle.

3.7.2 Herstellung von mEHTs aus Indikatormäusen

mEHTs wurden aus Herzzellen von Mäusen, die eine nukleäre β -Galaktosidase ausschließlich in Herzmuskelzellen exprimieren, hergestellt. Transgene Tiere wurden durch Färbung von Vorhofbiopsien direkt vor der enzymatischen Zellisolation identifiziert. Transgene β -Galaktosidase wurde eindeutig in den untersuchten Herzen identifiziert (Mendelsche Verteilung bei Verpaarung von heterotopen Transgenen mit Wildtyp-DBA2J-Mäusen; Abb. 16). X-Gal-Färbungen an Kulturtag 3, 7 und 14 verdeutlichten den Verlauf der Herzmuskelrekonstitution in mEHTs. Während sich die Kardiomyozyten an Kulturtag 3 noch gleichmäßig mit lokalen Zellanhäufungen über das mEHT verteilten (Abb. 17A), zeigte sich an Kulturtag 7 bereits eine Umverteilung mit Ausbildung einer dünnen ringförmigen und locker zusammenhängenden Struktur am zentralen mEHT-Rand (Abb. 17B). Zugleich war die Zelldichte inmitten der Matrix deutlich vermindert. Während der Kulturdauer unter kontinuierlicher auxotonischer Dehnung bis Kulturtag 14 kam es in mEHTs schließlich zur Ausbildung eines kompakten Herzmuskelstrangs (Abb. 17C).

Abbildung 16: Genotypisierung anhand Schnellfärbungen von atrialem Gewebe der potentiell transgenen Mäuse. WT: Vorhofgewebe eines Wildtyp-Tiers in x-Gal-Puffer mit 1 mg/ml x-Gal, TG: Vorhofgewebe eines transgenen Tieres in x-Gal-Puffer mit 1 mg/ml x-Gal.



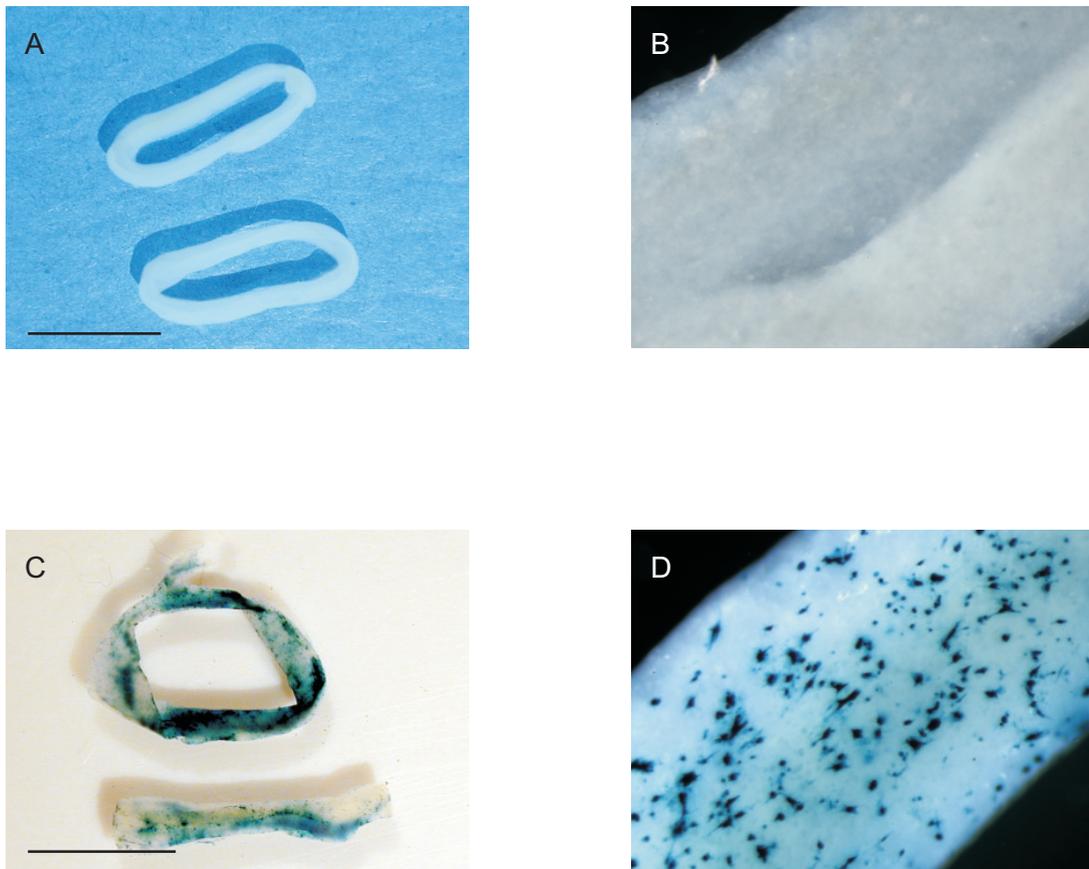


Abbildung 15: Transgene Expression von β -Galaktosidase in mEHTs nach adenoviralem Gentransfer (Ad5LacZ). Der β -Galaktosidasenachweis erfolgte 48 Stunden nach Infektion mit einer MOI 50 an Kulturtag 12. Übersicht- und Detailaufnahme von Kontroll-EHTs (A+B); Übersicht- und Detailaufnahme transfekzierter mEHTs (C+D). Transfekzierte Zellen stellen sich blau dar. Maßstäbe: 5 mm

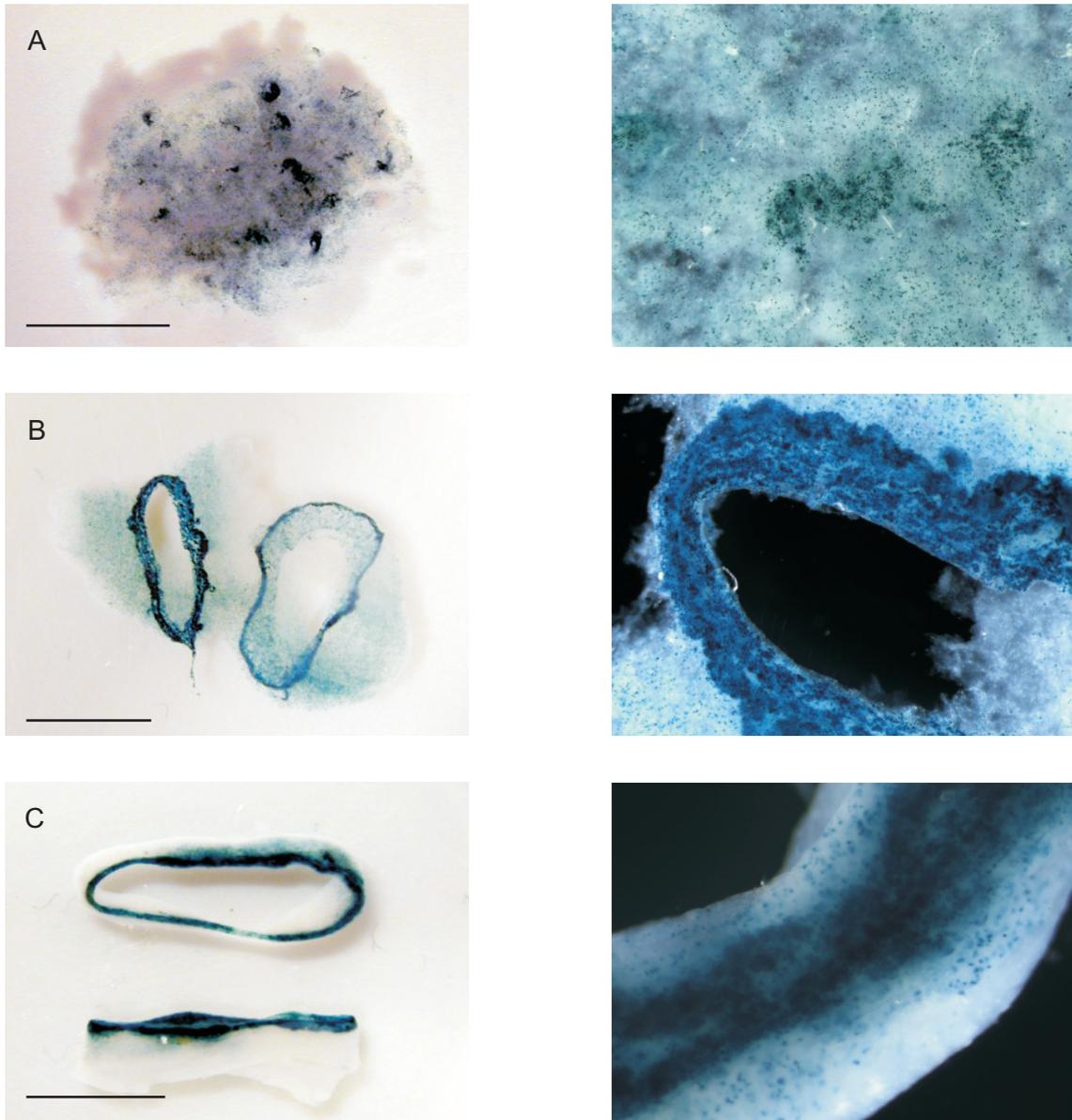


Abbildung 17: Transgene Expression von β -Galaktosidase unter Kontrolle des α -Myosinschwerkettenpromotors in Herzmuskelzellen in mEHTs aus Kardiomyozyten genetisch manipulierter Mäuse (α -MHCnLacZ). (A) Übersicht- und Detailaufnahme von transgenen mEHTs an Kulturtag 3; (B) Übersicht- und Detailaufnahme von mEHTs an Kulturtag 7; (C) Übersicht- und Detailaufnahme von mEHTs an Kulturtag 14. Maßstäbe: 5 mm

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines murinen EHT-Modells (mEHT). Dabei stellten sich folgende Fragen: (1) Welche Bedingungen erlauben die Kultur von Kardiomyozyten der neonatalen Maus in einer dreidimensionalen Collagenmatrix? (2) Zeigen mEHTs strukturelle und funktionelle Eigenschaften von differenziertem Myokard? (3) Können mEHTs per adenoviralem Gentransfer transduziert werden? (4) Können mEHTs aus Kardiomyozyten transgener Mäuse hergestellt werden?

Die Hauptergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammen fassen:

1. Für die Herstellung von mEHTs waren folgende Bedingungen entscheidend:
 - a) Anwendung von atrialen und ventrikulären Herzzellen
 - b) Anwendung von Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel
 - c) Kultur unter horizontaler Rotation (Kulturtage 2-7)
 - d) Passagere Zellzyklusinhibition mit AraC (Kulturtage 5-7)
 - e) Kultur unter 40% Sauerstoff
 - f) Mediumsupplementation mit T3 und ITS+1
 - g) Kultur unter auxotonischer Dehnung (Kulturtage 7-14)

2. mEHTs zeigten Kontraktionsparameter intakter Herzmuskulatur:
 - a) Hohe spontane Kontraktionsfrequenz
 - b) Positiv inotroper Effekt nach Calciumstimulation
 - c) Positiv inotroper und lusitroper Effekt nach Isoprenalinstimulation
 - d) Funktionelle Antagonisierbarkeit des inotropen Isoprenalineffekts durch Carbachol

3. Herzmuskelzellen bilden in mEHTs ein zusammenhängendes zirkuläres Netzwerk aus zum Teil hoch differenzierten Kardiomyozyten aus.

4. mEHTs können durch adenoviralen Gentransfer markiert werden.

5. mEHTs können aus Herzzellen transgener Mäuse konstruiert werden.

4.1 Entscheidende Faktoren bei der Entwicklung eines mEHT-Modells

Die zentrale Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Definition experimenteller Bedingungen, die eine dreidimensionale Rekonstitution von Kardiomyozyten der neonatalen Maus zu mEHTs möglich machen. Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine zur Herstellung von EHTs aus Kardiomyozyten neonataler Ratten (rEHTs) etablierte Methodik (Zimmermann et al. 2000).

4.1.1 Verwendete Zellpopulation und -zahl

Zunächst stellte sich die Anwendung von Mischkulturen aus ventrikulärem und atrialem Herzgewebe als entscheidend heraus. mEHTs rein ventrikulärer Zellherkunft entwickelten keine Kontraktionen. Dass der permissive Effekt der atrialen Zellen auf die Anwesenheit von primären Schrittmacherzellen und somit *in vitro* Impulsgebern zurückzuführen ist, scheint wahrscheinlich.

Insgesamt rekrutieren sich die für die EHT-Herstellung aus neonatalen Mausherzen isolierten Zellen aus unterschiedlichen Zellspezies (u.a. Muskel-, Bindegewebe- und Gefäßzellen). Diese sind jeweils für unterschiedliche Eigenschaften der Herzmuskulatur verantwortlich, können sich aber auch gegenseitig synergistisch beeinflussen. In 2D Herzmuskelzellkulturen kommt es in der Regel zu einer Überwucherung von postnatal postmitotischen Kardiomyozyten durch proliferierende Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Diese stellen ihr Wachstum erst nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens weitestgehend ein, was in kardialen Mischkulturen ohne Wachstumsinhibition schließlich zu einer starken Zunahme der Nicht-Myozyten-Fraktion führt. Eine Reduktion des Nicht-Kardiomyozyten-Anteils in Herzmuskelzellkulturen wird regelmäßig durch selektive Anheftungsverfahren („*Preplating*“) erreicht. Auch bei der initialen Herstellung von rEHTs wurden aufgereinigte Herzmuskelzellpopulationen eingesetzt. Bei dem „*Preplating*“-Verfahren nutzt man die unterschiedlichen Wachstumseigenschaften von Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten. Letztere haften deutlich schneller an glatten Oberflächen, wie z.B. Kulturschalen, so dass man durch eine kurze Kulturphase frisch isolierter Zellen auf oberflächenbehandelten Zellkulturschalen ein selektives Anwachsen von Nicht-Kardiomyozyten erreichen kann. Kardiomyozyten können anschließend mit dem Kulturüberstand abgenommen werden und in so angereicherter Form in getrennten Kulturschalen weiter kultiviert werden (Blondel et al. 1971). Mit dieser *Preplating*-Technik wurden Zellkulturen mit bis zu 97% Kardiomyozyten erreicht (Brooks et al. 1997). Allerdings hat die Anwesenheit von „Nicht-Kardiomyozyten“ auch einen positiven Einfluss auf die

Entwicklung von Kardiomyozyten in 2D und 3D Kultur. So wiesen Long et al. (1991) einen Wachstums-fördernden Einfluss von Fibroblasten auf Kardiomyozyten nach, wofür die Autoren parakrine Effekte der in Abhängigkeit vom Fibroblastenanteil im Kulturüberstand vorhandenen Wachstumsfaktoren (PDGF, TNF- α , aFGF, bFGF, TGF- β) verantwortlich machten. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in rEHTs gemacht (Naito et al. 2006). Dabei zeigten rEHTs aus nativen Herzzellpopulationen bessere kontraktile Eigenschaften, d. h. höhere basale Kontraktionskräfte sowie ein besseres Ansprechen auf inotrope Stimulation mit Calcium und Isoprenalin, im Vergleich zu EHTs aus aufgereinigten Herzmuskelzellen. Aufgrund dieser Beobachtungen im Rattenmodell wurde trotz der Gefahr einer Überwucherung von mEHTs durch Nicht-Kardiomyozyten auf eine Aufreinigung von Herzmuskelzellen vor EHT Herstellung verzichtet. Insgesamt müssen Folgeuntersuchungen klären, welche spezifischen Effekte Nicht-Kardiomyozyten und in mEHTs v.a. auch atriale Zellen auf die EHT-Bildung haben.

Weiterhin erwies sich die pro Konstrukt eingesetzte Zellzahl als ein entscheidender Faktor bei der Konstituierung von mEHTs. So war eine Erhöhung der Zelldichte in EHTs mit Kardiomyozyten neonataler Mäuse ($2 \times 10^6 / 450 \mu\text{l}$) im Vergleich zu EHTs mit Kardiomyozyten neonataler Ratten ($2,5 \times 10^6 / 900 \mu\text{l}$) nötig, um ein optimales Verhältnis avitaler/kontrahierender Zellen zu erreichen. Kontraktionskraftmessungen an mEHTs mit verschiedenen Zelldichten wurden im Rahmen dieser Studie allerdings nicht vorgenommen. Die Bewertung erfolgte semiquantitativ anhand mikroskopischer Begutachtung der Konstrukte. Dabei zeigte sich, dass bei 1×10^6 Zellen/mEHT nur eins von vier, bei 3×10^6 Zellen/mEHT jedoch keines der untersuchten Konstrukte kohärente Kontraktionen aufwies. Bei Zellzahlen von $1,5-2,5 \times 10^6$ Zellen/mEHT kontrahierten jeweils alle untersuchten Konstrukte kohärent. Parallel zur Erhöhung der Zelldichte nahm der Anteil avitaler Zellen/mEHT zu, während die Anzahl von Zell-Zell-Kontakten sowie Matrix-durchspannender Zellstränge bei $< 2 \times 10^6$ Zellen/mEHT sehr gering, bei 2 und $2,5 \times 10^6$ Zellen/mEHT am höchsten und schließlich bei 3×10^6 Zellen/mEHT wieder sehr gering war. Avitale Zellen fanden sich vorzugsweise zwischen den freien Rändern der mEHTs, aber auch entlang kontrahierender Zellstränge. Als Ursache für die Anhäufung avitaler Zellen kommt entweder eine bei der enzymatischen Präparation eingetretene letale Schädigung der Zellen oder Zelltod (z. B. durch Apoptose oder Nekrose) innerhalb der Collagenmatrix in Frage. Da sich der Anteil avitaler Zellen in mEHTs mit Erhöhung der Zellzahl vergrößerte, scheint eine alleinige primäre Schädigung während des Gewebeverdaus nicht die Erklärung für das beobachtete Phänomen zu sein. Dies lassen auch die Erkenntnisse aus EHTs der Ratte vermuten. Hier wurde beobachtet, dass lediglich ein Viertel der eingesetzten Kardiomyozyten die volle Kulturdauer überlebt und dieser Verlust weitestgehend apoptoseabhängig zu sein

scheint (Boy 2006). Auch in mEHTs könnte das der Fall sein. Vor allem der plötzliche Übergang optimal kontrahierender mEHTs zu mEHTs ohne jegliche kontraktile Leistung ($2,5 \times 10^6$ Zellen/mEHT vs. 3×10^6 Zellen/mEHT) bleibt auffallend und bedarf weiterer Untersuchung. Möglich wäre eine Verschlechterung der metabolischen Situation der Kardiomyozyten in der Collagenmatrix.

4.1.2 Anwendung von Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel

Ein weiterer entscheidender Faktor für die erfolgreiche dreidimensionale Rekonstitution von Kardiomyozyten neonataler Mäuse war die Supplementierung des Zell-Collagengemisches mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel. Analog zum EHT-Modell der Ratte war zunächst natives Matrigel zur mEHT Herstellung verwendet worden. Während dieses jedoch bei Ratten zur erstmaligen, erfolgreichen Konstitution von EHTs geführt hatte, wiesen mit nativem Matrigel supplementierte mEHTs lediglich mikroskopisch zu beobachtende Kontraktionen auf, ohne dass deren Kräfte messbar waren (vgl. 3.3.2). Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel im Mausmodell zur Konstruktion messbar kontrahierender mEHTs.

Matrigel ist ein kommerziell erhältliches Bioprodukt aus extrazellulärer Matrix (EM) des murinen Engelbreth-Holm-Swarm Tumors, das sich in nativer Form aus Basalmembranbestandteilen sowie einer Reihe von Wachstumsfaktoren zusammensetzt. An Basalmembranbestandteilen enthält Matrigel einen hohen Laminin-Anteil, der in Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel leicht erhöht ist (61 vs. 56%). Andere Matrixbestandteile sind dagegen in den unterschiedlichen Matrigelformulierungen unverändert (Collagen 30 vs. 31%, Entactin 7 vs. 8%). *In vivo* grenzen Basalmembranen Epithelien und verschiedene andere Zelltypen (Myozyten, Adipozyten, Schwannsche Zellen u.a.) gegen umliegendes Gewebe ab. Dabei dienen Basalmembranbestandteile wie Glykoproteine (Laminin, Entactin), Collagen IV und Proteoglykane vor allem der Verankerung von Zellen miteinander und im Interstitium. Neben der rein mechanischen Funktion der korpuskulären Bestandteile der EM wurden allerdings auch modulatorische Effekte auf biologische Funktionen von Wachstumsfaktoren beschrieben (Vlodavsky et al. 1990, Alberts et al. 1994). In den 2D Zellkultur Untersuchungen zeigten neonatale murine Kardiomyozyten auf Laminin die signifikant höchsten Zellgrößen (vgl. 3.2.1). Dies stimmt mit mehreren Untersuchungen überein, in denen Laminin auch in Rattenkardiomyozytenkulturen als optimale Beschichtungsmatrix verwendet worden war (Koch-Schneidemann et al. 1994, Bick et al. 1998, McDevitt et al. 2002). Allerdings konnte Matrigel bei der Konstruktion von mEHTs

nicht einfach durch Verwendung von reinem Laminin ersetzt werden (vgl.3.3.4), so dass von zusätzlichen supportiven Faktoren in Matrigel ausgegangen werden muss.

Auf oder in EM wurden eine Reihe zwei- und dreidimensionaler Zellkulturen etabliert. Dabei zeigte sich in den meisten Fällen ein höherer Differenzierungsgrad der kultivierten Zellen (u.a. Neuronen, Hepatozyten, Epithelzellen) im Vergleich zur Kultur auf Plastik, Glas oder organischen Substraten wie Collagen Typ I (Tonge et al. 1997, Smalley et al. 1999). Als lösliche Bestandteile der EM, für die eine Beeinflussung der Differenzierung diverser Zellspezies beschrieben wurde, kommen in erster Linie Wachstumsfaktoren in Frage. In Abhängigkeit von der untersuchten Zellpopulation zeigten einzelne Faktoren sowohl permissive als auch inhibitorische Effekte auf Zelldifferenzierung und Zellproliferation (Klagsbrun 1989, Avner 1990, Vukicevic et al. 1992, Lawrence 1996, Stewart und Rotwein 1996, Sidawy et al. 1998). Kardiomyozyten der neonatalen Ratte zeigten unter Stimulation mit IGF-1 (100 nM) beispielsweise eine Vergrößerung der Zelloberfläche und eine vermehrte Expression von *myosin light chain 2*, *α-skeletal muscle actin* und Troponin I bei unveränderten *α-cardiac muscle actin* Konzentrationen (Ito et al. 1993). Deng et al. (2000) stellten jedoch bei einer vergleichenden Untersuchung von Hypertrophiemechanismen bei Kardiomyozyten neonataler Mäuse und Ratten einige Unterschiede fest. Die murinen Kardiomyozyten zeigten unter serumfreier Kultur eine „autonome Hypertrophie“, die anhand von erhöhter Zellgröße, Proteingehalt und mRNA-Gehalt von ANF und β -MHC definiert wurde, mit einem Plateau an Kulturtag 7. Das Niveau dieser robusten „autonomen Hypertrophie“ war vergleichbar mit der Antwort, die bei Kardiomyozyten neonataler Ratten durch α_1 -Agonisten ausgelöst wird. Diese „basale Hypertrophie“ scheint Antworten muriner Kardiomyozyten auf bestimmte G-Protein und PKC-gekoppelte Wachstumsfaktoren zu verschleiern oder gar zu eliminieren. So hatte die Zugabe von Phenylephrin, Endothelin-1, PGF 2α und PMA, die in Kardiomyozyten der Ratte eine Hypertrophie hervorrufen, keinerlei Effekt auf murine Kardiomyozyten. Die in Matrigel enthaltenen Wachstumsfaktoren entfalten ihre Wirkung jedoch fast ausschließlich über Tyrosinkinaserzeptoren. Bezüglich dieses Rezeptorentyps untersuchten Deng et al. lediglich den Hypertrophieeffekt von TNF- α , der bei murinen Kardiomyozyten zwar vorhanden, aber wesentlich schwächer ausgeprägt war als bei der Ratte. Darüber hinaus wirkte sich der TNF- α Effekt auf murine Kardiomyozyten lediglich im Proteingehalt und nicht in einem veränderten mRNA Gehalt für α -MHC oder ANF aus. Eine begleitende höhere kontraktile Aktivität sowie auto- oder parakrine Effekte wurden als Ursache der beschriebenen „autonomen Hypertrophie“ ausgeschlossen. Weiterhin konnte sie durch adrenerge Antagonisierung, Angiotensin oder Endothelin-Antagonisten nicht unterdrückt werden. So könnten murine Kardiomyozyten andere Wachstumsfaktorenrezeptoren exprimieren, die in Kardiomyozyten der Ratte nicht gefunden

werden. Auch der Kulturprozess könnte bei murinen Kardiomyozyten intrazelluläre Hypertrophieinhibitoren reduzieren, bzw. -aktivatoren erhöhen. Diese Untersuchungen zeigen die großen Differenzen zwischen Ratten- und Maus-Kardiomyozyten und die Unterschiedlichkeit hypertropher Erscheinungsbilder. Hier bietet sich ein Erklärungsansatz für den unterschiedlichen Effekt von Matrigel mit oder ohne Wachstumsfaktor-Reduktion auf Ratten- und Maus-EHTs. Möglicherweise profitieren murine Kardiomyozyten auf Grund ihres veränderten Ansprechens auf Wachstumsfaktoren weniger von deren positiver Wirkung als Kardiomyozyten der Ratte und so kommt die ebenfalls beschriebene apoptotische, antiproliferative Wirkung mancher Matrigelkomponenten (v.a. TGF- β und bFGF) zum Überwiegen. Darin könnte eine Ursache für das bessere Ansprechen der mEHTs auf Wachstumsfaktor reduziertem Matrigel liegen. Dennoch wäre es interessant zu untersuchen, ob unter den jetzigen mEHT-Optimalbedingungen die positiven Effekte von T3, ITS+1 und Sauerstoff die möglichen negativen Effekte des höheren Wachstumsfaktorgehalts in „Standard-Matrigel“ überkommen könnten und dann mEHTs auch mit Matrigel mit Wachstumsfaktoren erfolgreich konstituiert werden können. Folgeuntersuchungen deuten tatsächlich darauf hin, dass „Standard-Matrigel“ unter optimalen Rekonstitutionsbedingungen eingesetzt werden kann. Es wäre jedoch ideal, die optimale Faktorenkombination in Matrigel exakt zu bestimmen, um in Zukunft auf die Zugabe dieser schlecht definierten und z. T. sehr variablen Matrix-Wachstumsfaktor-Mischung verzichten zu können. Es sei weiterhin darauf hingewiesen, dass die Unterschiede der Wachstumsfaktorkonzentrationen in nativem und reduziertem Matrigel nur marginal erscheinen: EGF, 0,7 vs. <0,5 ng/ml; PDGF, 12 vs. <5 pg/ml; IGF-1, 16 vs. 5 ng/ml; TGF- β , 2,3 vs. 1,7 ng/ml (Herstellerinformationen der Fa. Becton Dickinson). Dabei ist allerdings möglicherweise das Zusammenspiel der unterschiedlichen Faktoren von größerer Bedeutung als die Konzentration einzelner Faktoren.

Neben EM sind Mediumbestandteile wie embryonaler Hühnerextrakt und Pferdeserum weitere Quellen für Wachstumsfaktoren in EHT-Kulturen, die einen permissiven Effekt auf die Rekonstitution von Kardiomyozyten der neonatalen Maus haben könnten. Auch ist die parakrine Rolle von „Nicht-Kardiomyozyten“ innerhalb der Collagenmatrix bei der Rekonstitution von mEHT vermutlich von großer Bedeutung. Das mEHT-Modell sollte sich gezielt zur Analyse der Rolle von Wachstumsfaktoren für die Herzmuskelzellentwicklung verwenden lassen. Dass dieses prinzipiell möglich ist, konnte bereits in vorangegangenen Untersuchungen mit rEHT gezeigt werden (Zimmermann et al. 2002). Für eine weitere Optimierung des Modells wäre es wünschenswert, die Kulturbedingungen unter Ausschluss nur schwer standardisierbarer Mediumsupplemente (Seren, Extrakte, EM) zu definieren, um

gezielt Wirkungen einzelner Faktoren sowie deren Kombination für die dreidimensionale Rekonstitution von Kardiomyozyten der neonatalen Maus untersuchen zu können.

Erste Versuche zur Herstellung eines serumfreien definierten Mediums zur Kultur von Kardiomyozyten wurden bereits von Mohamed et al. (1983) beschrieben. Dabei gelang es, durch Supplementierung von chemisch definiertem Nährmedium (Ham's F12 und DMEM) mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (Insulin, Transferrin, Selen, Fetuin, Albumin, Hydrocortison, L-Thyroxin, EGF) Mediumbedingungen zu etablieren, die im Vergleich zu Kulturen mit serumhaltigen Medium eine längere Kulturdauer (30 d vs. 90 d) mit stabileren und physiologischeren Kontraktionsfrequenzen (40-200/min vs. 190-240/min) ermöglichten. Ein erster Schritt in diese Richtung im mEHT-Modell war die Mediumsupplementierung mit T3 und ITS+1, die jeweils einen Kontraktionskraft steigernden Effekt auf mEHTs aufwiesen und in simultaner Verwendung als Standard für die mEHT-Herstellung definiert wurden. Durch die Identifikation weiterer mEHT-Entwicklung und -Funktion steigernder Faktoren könnte schließlich die Etablierung von komplett serumfreien Kulturbedingungen gelingen.

4.1.3 Passagere Zellzyklusinhibition mit AraC (Kulturtag 5-7)

In Vorversuchen zur Herstellung muriner EHTs wurden bereits vereinzelt kontrahierende Areale zu Beginn der EHT-Kultur unter „Ratten-Rekonstitutionsbedingungen“ (Zimmermann et al. 2000) beobachtet. Langfristig war es jedoch nicht zur Ausbildung von synchron kontrahierenden mEHTs gekommen. Prominent war dabei eine im Vergleich zu rEHTs große Festigkeit der Konstrukte aus Mausherzzellen. So fiel auf, dass die initialen vereinzelt Kontraktionen der ersten mEHTs im Kulturverlauf mit zunehmender Festigkeit der EHTs weitgehend sistierten. Möglicherweise kam es in mEHTs in diesem Kulturzeitraum zu einer Überwucherung mit „Nicht-Kardiomyozyten“, die zu einer zunehmenden Matrixversteifung beitrugen und der Entwicklung von sich dynamisch kontrahierenden EHTs im Wege standen. Aus dieser Überlegung ergab sich der Ansatz zur transienten Zellzyklusinhibition mit AraC in mEHTs.

Durch die Zugabe Zellzyklus hemmender Substanzen kann eine Überwucherung von Herzmuskelzellen durch Nicht-Kardiomyozyten in Kultur verhindert werden. Der im Rattenmodell üblicherweise verwendete Zellzyklusinhibitor 5-Bromo-2-Desoxyuridin (BrdU) ist in Mauszellen wirkungslos (Hoshida et al. 1996, Wagner et al. 1998, Adderley et al. 1999, Karliner et al. 2000). Deshalb kam bei der vorliegenden Arbeit Cytosin-Arabinosid (AraC), ein Antimetabolit, für die Zellzyklusinhibition zur Anwendung. 2D Kulturen von Herzzellen der Maus weisen unter AraC-Behandlung 40-65% weniger Fibroblasten auf als ungehemmt

wachsende Herzzellkulturen (Ollinger und Brunmark 1994). Die Untersuchungen an 2D-Kulturen muriner Kardiomyozyten (vgl. 3.2) hatten gezeigt, dass eine kontinuierliche Supplementierung mit 25 μM AraC neben der erwünschten Reduktion von Nicht-Kardiomyozyten zu Gunsten kontrahierender Herzzellen jedoch auch die Zellmorphologie von Kardiomyozyten stark negativ beeinflusste (kleinere, weniger ausgerichtete Zellen). Außerdem sollten die Nicht-Kardiomyozyten aufgrund ihres oben beschriebenen Einflusses auf die Entwicklung von Kardiomyozyten bewusst nur begrenzt reduziert werden. Deshalb wurde bei der mEHT-Kultur lediglich vorübergehend (Kulturtag 5-7) der Zellzyklus mit AraC inhibiert. Dieser transiente Einsatz könnte die sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr teilenden Kardiomyozyten schonen und ihnen einen gewissen „Erholungszeitraum“ in Kultur nach dem Zellverbau gewährleisten. Dagegen sollte der Zellzyklus in proliferierenden Nicht-Kardiomyozyten in dieser kritischen Kulturphase möglichst selektiv gehemmt werden. Tatsächlich verhinderte die Zugabe von AraC die beschriebene „Fibrosierung“ sowie das Sistieren von Kontraktionen in mEHTs im Verlauf der Kultur und führte - vermutlich durch das günstigere Nicht-Kardiomyozyten/Kardiomyozyten-Verhältnis - zu höheren Kontraktionskräften von mEHTs. Diese Befunde deuten schließlich auf eine für die mEHT-Entwicklung wichtige Zellzyklusinhibition von Matrix-modulierenden Nicht-Kardiomyozyten. Diese Hypothese bedarf allerdings weiterer Überprüfung, z. B. durch longitudinale Zellproliferationsanalysen mittels ^3H -Thymidineinbauversuch.

4.1.4 Kultur unter 40% Sauerstoff

Weiterhin erwies sich Supplementierung mit 40% Sauerstoff als entscheidender Faktor für die Optimierung von mEHTs. Zwar entwickelten auch bei 21% Sauerstoff kultivierte mEHTs deutlich messbare Kontraktionen, deren Kontraktionskraft wurde jedoch unter Kultur mit 40% Sauerstoff fast verdreifacht (vgl. 3.4.2). Das Säugerherz ist ein obligat aerobes Organ und von allen Organen des Körpers dasjenige mit dem höchsten Energiebedarf pro Gramm. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit konstanter Sauerstoffzufuhr, um den Bedarf der Kardiomyozyten zu decken und deren Vitalität zu erhalten. Sauerstoff ist neben seiner unverzichtbaren Rolle im Energiestoffwechsel ebenfalls ein entscheidender Faktor myokardialer Genexpression. So reguliert er die Expression unterschiedlicher Gene, z.B. die Wachstumsfaktoren Erythropoietin (Übersicht bei Jelkmann 1992), VEGF (Übersicht bei Plate et al. 1994) sowie glycolytische Enzyme (Webster 1987).

In EHTs stellt zum einen die bindegewebige EHT-Matrix eine Diffusionsbarriere für Nährstoffe, Stoffwechselmetabolite und v.a. Sauerstoff dar. Darüber hinaus wird die Ausbildung dicker zusammenhängender Muskelanteile in EHTs auch dadurch begrenzt,

dass die sich ausbildenden avaskulären Muskelstränge in mEHTs selber ein Diffusionshindernis darstellen (vgl. 3.9.2). Als Konsequenz bilden sich vermutlich keine Muskelstränge mit einem Durchmesser von $>100\ \mu\text{m}$ in mEHTs aus (vgl. 3.5.1.1). Dies ist ein generelles Problem bei der Konstituierung künstlicher Gewebe *in vitro*. In Untersuchungen von Carrier et al. (2002) zeigte sich eine starke, positive Korrelation zwischen erhöhter Sauerstoffkonzentration (160 vs. 60 mmHg) und der Ausprägung aeroben Zellstoffwechsels, DNA- und Proteingehalt von 3D Herzmuskelkonstrukten aus neonatalen Rattenherzmuskelzellen und synthetischen Polymeren (PLA/PGA) sowie der Expression muskel- und herzspezifischer Marker (u.a. α -sarkomerisches Aktinin). Darüber hinaus resultierte höherer Sauerstoffgehalt in verbesserter Zellmorphologie mit besser organisierten Sarkomeren und mehr Zell-Zell-Kontakten. Im Mausmodell spielt vermutlich auch die hohe endogene Kontraktionsfrequenz und der damit verbundene hohe Sauerstoffbedarf eine zusätzliche Rolle, die den unterstützenden Effekt einer Sauerstoffsupplementierung in mEHT Kulturen erklären könnte. So kontrahieren mEHTs im Mittel mit einer Frequenz von 6,5 Hz, während EHTs der Ratte mit 1-2 Hz kontrahieren. Möglicherweise treibt eine höhere Sauerstoffkonzentration unter mEHT Kultur im Sinne eines *circulus vitiosus* auch wiederum die Kontraktionsfrequenz der Konstrukte nach oben, wie dies von Carrier et al. (2002) in künstlichem Herzmuskelgewebe der Ratte beobachtet wurde. Eine Analyse der Sauerstoffsättigung sowie des Sauerstoffverteilungsmusters innerhalb von mEHTs wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist davon auszugehen, dass die Struktur und Funktion von mEHTs durch eine weitere Optimierung der Sauerstoffversorgung, z. B. durch Anwendung von Sauerstoffträgern (Perfluorcarbon) oder eine funktionelle Vaskularisierung von EHTs *in vitro*, verbessert werden kann.

4.1.5 Mediumsupplementierung mit T3 und ITS+1

Triiodothyronin (T3) ist die „biologisch aktive“ Form der Schilddrüsenhormone und dabei viermal potenter in seiner Wirkung als Thyroxin (T4). Für T3 sind eine Vielzahl von Wirkungen auf das Herz beschrieben worden. So wirkt es positiv chronotrop und erhöht die basale Stoffwechselrate und damit den Sauerstoffverbrauch (Johansson und Thoren 1997). Parallel dazu wird eine Zunahme der Größe und Anzahl der Mitochondrien sowie eine Aktivitätserhöhung der Na^+/K^+ -ATPase beobachtet (Guernsey und Edelman 1983). In einem Ratten-Infarktmodell wurde weiterhin eine erhöhte Auswurfrate des Herzens unter T3 beschrieben (Ojamaa et al. 1999). Auf molekularer Ebene ist unter T3 ein direkter Effekt durch Hochregulation der β -Adrenorezeptordichte und damit eine größere sympathische Sensitivität der Herzens beschrieben worden (Williams und Lefkowitz 1977, Threatte et al. 1983). Die Plasmakonzentrationen von Kalium (Felzen et al. 1989) und Calcium (Segal et al.

1990) werden durch T3 erhöht und weiterhin die Calcium-Wiederaufnahme in das sarkoplasmatischen Retikulum (SR) gesteigert. Andere Gruppen beschrieben einen direkten anabolen Effekt von T3 auf isolierte Mauserzen (Crie et al. 1983). Deng et al. (2000) zeigten für T3, im Gegensatz zu anderen bei murinen Kardiomyozyten nicht hypertrophiewirksamen Wachstumsfaktoren, einen zur oben beschriebenen „autonomen Hypertrophie“ additiven Effekt. Dabei zeigte sich eine Zunahme der Zellgröße sowie eine Erhöhung der α -MHC Transkripte im Sinne einer physiologischen Hypertrophie. Zugleich erniedrigte T3 die β -MHC (fetale Isoform) Transkriptkonzentration. Dieser T3 Effekt ist möglicherweise analog zum Rattenherz *in vivo*, in dem T3 Behandlung bei Drucküberlastung Hypertrophie stimuliert und den MHC Phänotyp umdreht (Chang et al. 1997, Izumo et al. 1987). Interessant ist auch, dass für T3 ein permissiver Effekt auf die Wirkung der im Matrigel enthaltenen Faktoren IGF-1 und bFGF beschrieben wurde (Schaub et al. 1997).

Desweiteren erwies sich Mediumsupplementierung mit ITS+1 als Kontraktionskraftsteigernder Faktor in mEHTs. ITS+1 enthält Insulin, Transferrin, Selen und α -Linolensäure. Der positive Effekt dieser Mediumsupplementierung auf die mEHT-Funktion ist wohl vor allem beim enthaltenen Insulin zu suchen (vgl. Abb. 9). Insulin aktiviert in Kardiomyozyten eine Vielzahl akuter, metabolischer, v.a. anabol wirksamer Stoffwechselprozesse (ähnlich wie IGF-1). Darüber hinaus ist Insulin in der Lage Apoptose zu verhindern. Dies zeigten u.a. Aikawa et al. (2000) in Kulturen neonataler Kardiomyozyten der Ratte, in denen Insulin Sauerstoffradikal-induzierte Apoptose durch Aktivierung der PI3K entgegenwirkte. Insgesamt muss jedoch auch den anderen im ITS+1 enthaltenen Faktoren Rechnung getragen werden, da der ITS+1 Effekt auf die mEHT-Funktion den reinen Insulin Effekt übertraf (vgl. 3.7).

Das ebenfalls in ITS+1 enthaltene Selen, ein Spurenelement, erhöht in kultivierten Kardiomyozyten der Ratte die Resistenz gegenüber Hypoxie (Bordoni et al. 2005). Transferrin ist ein Eisentransportprotein der Leber, dessen Plasmaspiegel *in vivo* auch bei Mäusen (Simpson 1992) mit Hypoxie ansteigt (Rolfs et al. 1997). α -Linolensäure, eine mehrfach ungesättigte essentielle Fettsäure, ist als wichtiger Bestandteil von Strukturlipiden bekannt und könnte sich darüber hinaus als zusätzliches Substrat für die Energiegewinnung v. a. in hypoxischen bzw. mangelversorgten Kardiomyozyten eignen. Der zusätzlich Nutzen von Selen, Transferrin und α -Linolensäure in mEHT Kulturen erschien im Rahmen dieser Arbeit gering, dennoch wurde ITS+1 als Standard-Supplement der einfachen Zugabe von Insulin in mEHT-Kulturen vorgezogen. Dadurch sollten die potentiell protektiven Wirkungen dieser Faktoren v. a. unter hypoxischen bzw. hypoglykämischen Bedingungen ausgenutzt werden. Folgeuntersuchungen müssen klären, ob dieses Vorgehen tatsächlich die reproduzierbare Herstellung gut kontrahierender mEHTs unterstützt.

4.1.6 Kultur unter auxotonischer Dehnung

Weiterhin verdoppelte die Kultur unter gefederter Aufhängung, zur Unterstützung von auxotonischen Kontraktionen, die Kontraktionskraft von mEHTs (vgl. Abb. 11). Vorangegangene Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass chronische Dehnung im EHT Modell des Hühnchens und der Ratte Hypertrophie induziert und die kontraktile Eigenschaften verbessert (Fink et al. 2000). Dazu zeigten sich eine Erhöhung des RNA/DNA und des Protein/Zelle-Verhältnisses, erhöhte mRNA Werte für ANF und α -sarkomerisches Aktin sowie verbesserte Zellmorphologie und -ausrichtung. Über bislang noch nicht eindeutig identifizierte molekulare Strukturen aktiviert mechanische Dehnung an Kardiomyozyten der Ratte diverse intrazelluläre Signalkaskaden, wie z. B. Tyrosinkinasen, MAPK, PKC und PLC (Sadoshima und Izumo 1993). Mögliche Mechanorezeptoren könnten Ionenkanäle (Sachs 1989), das Zytoskelett oder Integrine (Ingber 1991) sein. Auch besteht die eher theoretische Möglichkeit der direkten Aktivierung signaltransduzierender Moleküle wie Wachstumsfaktorenrezeptoren (in Abwesenheit des Liganden), G-Proteinen oder Proteinkinasen durch mechanischen Stress. Nicht zuletzt könnte mechanische Dehnung auch zu einer Ausschüttung von Wachstumsfaktoren führen, die wiederum ihre eigenen Rezeptoren autokrin oder parakrin aktivieren könnten (Sadoshima und Izumo 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mEHTs von einer gefederten Dehnung profitieren und darunter auxotonische Kontraktionen entwickeln. Im Gegensatz zu statischen und phasisch gedehnten Kardiomyozytenkulturen ist die Auswirkung von auxotonischen Kontraktionen *in vitro* wenig untersucht. Das EHT-Modell könnte sich vor diesem Hintergrund zur Analyse der Auswirkung unterschiedlicher Belastungen auf die Herzmuskelfunktion eignen. Bei der Kultur von mEHTs auf phasischen Dehnapparaturen scheint die Beobachtung beachtenswert, dass sich mEHTs im Intervall zwischen aufeinanderfolgenden Extensionsbewegungen nicht auf ihre ungedehnte Länge zurückziehen, sondern starr im gedehnten Zustand verharren. Während in mattenförmigen EHTs des Hühnchens und der Ratte phasischer Stretch einen positiven Effekt auf die Kontraktionskraft im Vergleich zu statischem Stretch zeigte, waren diese im zirkulären rEHT Modell kaum zu beobachten. Vermutlich stellt die dreidimensionale Anordnung der Zellen in zirkulären EHTs a priori schon ein mechanisches Gefüge mit diversen Zugbelastungslinien dar. Deshalb könnte in diesen Modellen vor dem Hintergrund einer mechanisch anspruchsvolleren Ausgangslage der positive Effekt statischer und phasischer Dehnung schwächer ausfallen. Das Prinzip der auxotonischen Dehnung unterscheidet sich grundsätzlich von dem der beiden anderen Dehnmodi. Hier wird durch die Aufhängung von mEHTs auf frei beweglichen Federn mit definiertem Widerstand erreicht, dass mEHTs in

ihrer physiologischen Frequenz gegen den Widerstand der Feder kontrahieren, anschließend aber wieder durch die Rückstellkraft der Feder in eine gedehnte Länge gezwungen werden. Diese freie Kontraktibilität gegen Last ermöglicht auxotonische Kontraktionen, bei denen es gleichzeitig zur Zellverkürzung und Kraftentwicklung der Kardiomyozyten in mEHTs kommt. Somit ergibt sich durch die „Rückstellkraft“ der Feder eine Art „Vorlast“, während die „Auslenkkraft“ der Feder ins Zentrum eine der „Nachlast“ ähnliche Konstellation bedeutet. Dies entspricht dem natürlichen Ablauf in der Füllungsphase des Herzens. Vermutlich ist es der physiologische Charakter dieses Dehnungsmodus, von dem zirkuläre EHTs der Maus bezüglich ihrer Kontraktionskräfte profitieren.

4.2 Physiologische und pharmakologische Charakterisierung von mEHT

Die Entwicklung von EHTs eröffnet die Möglichkeit der *in vitro* Rekonstituierung von Kardiomyozyten zu einem dreidimensionalen Zellverband mit Charakteristika intakter Herzmuskulatur. Kontraktionsexperimente mit EHTs unterscheiden sich nicht wesentlich von denen intakter Muskelpräparate (Eschenhagen et al. 1997, Zimmermann et al. 2000), wobei die maximale Kraftentwicklung von EHTs im Vergleich zur maximalen Kraftentwicklung von Herzmuskelpräparaten nach wie vor geringer ist (s. u.). Der Vergleich zwischen kontraktilem Verhalten von mEHTs mit EHTs der Ratte macht deutlich, dass auch speziesspezifische Charakteristika (hohe Kontraktionsfrequenz) in künstlichen Herzgeweben bestehen bleiben.

EHTs beider Spezies zeigten ab Kulturtag 2-3 spontane und koordinierte Kontraktionen. Kontraktionsexperimente wurden jeweils unter stabilen Versuchsbedingungen an Kulturtag 14 durchgeführt. Spontankontraktionen von mEHTs waren meist rhythmisch und zeigten eine höhere Kontraktionsfrequenz (6-8 Hz) als rEHTs (1-2 Hz), deren Spontankontraktionen in Tyrode-Lösung zumeist arrhythmisch waren. Während die unstimulierte Kontraktionsfrequenz von mEHTs in der Regel unverändert blieb, nahm die Frequenz bei rEHTs zumeist schnell ab. Die Ursache für die bei rEHTs regelmäßig und bei mEHTs äußerst selten auftretenden „Arrhythmien“ ist vermutlich in multifokalen Erregungsbildungen innerhalb der Zellpopulation zu sehen. Möglicherweise sind diese im mEHT Modell seltener, weil bei hohen Kontraktionsfrequenzen eine Unterdrückung sekundärer Schrittmacher erfolgt. Darüber hinaus wurden in mEHTs gezielt atriale Zellen eingesetzt, die z. T. als endogene Schrittmacherzellen in mEHTs fungieren könnten. Tatsächlich haben vorläufige Versuche gezeigt, dass auch rEHTs bei Anwendung atrialer Zellen eine höhere Spontanfrequenz zeigen (Zimmermann et al., unpubliziert). Weiterhin fiel zwischen spontan kontrahierenden mEHTs bisweilen eine größere Ungleichmäßigkeit der Kraftentwicklung auf als unter Stimulation. Vermutlich ist dafür mangelnde Kohärenz der rekonstituierten Zellen

innerhalb der Matrix bei den betroffenen EHTs verantwortlich, durch die elektrische Stimulation jedoch wird dann eine Rekrutierung aller Kardiomyozyten möglich. Damit kann die Auslösung gleichförmiger und rhythmischer Kontraktionen erreicht werden.

mEHTs zeigten Kontraktionskräfte (TT) von etwa 0,12 mN bei einer Grundspannung (RT) von 0,24 mN. Das Verhältnis von RT/TT optimal vorgedehnter Papillarmuskelpräparate liegt idealerweise unter 1. Vermehrung von extrazellulärer Matrix im Sinne von fibrotischen Umbauvorgängen können *in vivo* ursächlich für eine Veränderung des RT/TT Verhältnisses zugunsten der RT sein und sind Zeichen verminderter Compliance, d. h. größerer Steifheit von Herzgewebe (Weil et al. 1998). Bei mEHTs lag das Verhältnis von RT/TT bei 2, während in rEHTs ein Verhältnis von 0,75 vorlag (Zimmermann et al. 2002). Das erhöhte RT/TT Verhältnis bei mEHTs deutet auf eine größere Steifheit der Konstrukte im Vergleich zu rEHTs und intaktem Gewebe hin. Auch makroskopisch schienen mEHTs eine festere Konsistenz aufzuweisen als rEHTs. Als mögliche Ursache kommt die in mEHTs eingebrachte höhere Zellzahl sowie die unterschiedlichen eingesetzten Zellpopulationen in Frage (2×10^6 Zellen/450 μ l mEHTs vs. $2,5 \times 10^6$ Zellen/900 μ l rEHT; ventrikuläre Zellen mit *Preplating* in rEHTs vs. atriale und ventrikuläre Zellen in mEHTs). In diesem Sinne zeigten rEHTs aus Physiologie-nahen Zellmischungen (kein *Preplating*; d.h. eine Zellpopulation mit höherem Fibroblastenanteil) eine höhere RT (Naito et al. 2006). Es ist also nahe liegend, dass mEHTs einen höheren Anteil an Nichtkardiomyozyten aufweisen, v. a. Matrix-bildende Fibroblasten, die einerseits zu einer Stabilisierung der Gewebekonstrukte beitragen und auf der anderen Seite deren Kontraktibilität einschränken. Die geringere TT bei gleichzeitig hoher RT von mEHTs könnte sich auch auf die Ausbildung weniger komplexer Muskelgewebenetzwerke in mEHT im Vergleich mit rEHTs zurückführen lassen (vgl. Abb. 17C in dieser Arbeit mit Abb. 4a in Zimmermann et al. 2002).

Bei Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration zeigten EHTs von Ratte und Maus eine Zunahme der Kontraktionskraft. Dabei entwickelten mEHTs geringere Maximalkräfte als rEHT, zeigten aber eine vergleichbare EC_{50} für Calcium (mEHT: 0,4 mM; rEHT: 0,5 mM; Zimmermann et al. 2002). Im Vergleich mit nativem Herzgewebe entwickelten mEHTs und rEHTs geringere Kontraktionskräfte: In rEHTs wurde eine absolute Kraft von 2 mN/mm² erreicht, während sich die maximale Kraft von mEHTs auf 0,5 mN/mm² belief. Für murine Papillarmuskeln werden, ähnlich wie für Papillarmuskeln der Ratte, in der Literatur Kontraktionskräfte von 5-40 mN/mm² angegeben (Meyer et al. 1999, Bluhm 2000).

Die maximale Kontraktionskraft eines Muskelgewebes hängt von der absoluten Anzahl synergistisch (parallel) kontrahierender Myofilamente ab. Papillarmuskelpräparate bestehen

aus einer kompakten und ausgerichteten Myofilamentstruktur. In EHTs bilden Kardiomyozyten Netzwerke aus, die sich in rEHTs aus multiplen Muskelsträngen zusammensetzen (Zimmermann et al. 2002). Dagegen bildeten sich in mEHTs deutlich weniger Muskelstränge aus (Abb. 17C). Insgesamt bestehen EHTs zu >60% aus Matrixanteilen. Berechnet man nun die von mEHTs entwickelte Kraft auf den tatsächlichen Durchmesser der Muskelbündel, i. d. R. ein dominanter Muskelstrang mit ~100 µm Durchmesser, ergäbe sich tatsächlich eine maximale Kraft von ca. 60 mN/mm², was im obersten Bereich der von Papillarmuskeln erreichten Kraft anzusiedeln wäre. Dies spricht auch für einen hohen myokardialen Differenzierungsgrad in mEHTs. Dafür sprechen auch die morphologischen Befunde dieser Arbeit. Vor diesem Hintergrund erscheint es für eine weitere Kraftoptimierung von mEHTs v. a. notwendig, die Muskelstranganzahl bzw. -dicke in mEHTs zu verbessern. Dieses könnte möglicherweise durch eine Optimierung der Kulturbedingungen (z. B. Zugabe von weiteren Wachstumsfaktoren), den Einsatz transgener Kardiomyozyten (z. B. durch Zellzyklusinduktion in Kardiomyozyten) oder durch eine *in vitro* Vaskularisierung zur verbesserten Bereitstellung von u.a. Sauerstoff in den EHTs gelingen.

Neben Untersuchungen muskelphysiologischer Charakteristika sollten durch pharmakologische Interventionen G-Protein gekoppelte Signaltransduktionswege auf ihre Funktion im rekonstituierten Gewebe überprüft werden. Isoprenalin und Carbachol wurden als Mustersubstanzen für die Stimulation β -adrenerger bzw. muskarinergere Rezeptoren verwendet. β -Adrenorezeptoren koppeln an stimulatorische G-Proteine (Gs) und aktivieren dadurch die Adenylylcyclase, während muskarinerge Rezeptoren die Adenylylcyclase über inhibitorische G-Proteine (Gi) hemmen. Unter Stimulation mit Isoprenalin zeigen Herzmuskelpräparate eine Steigerung ihrer Kontraktionskraft und eine Verkürzung ihrer Kontraktionsdauer. Die positiv inotrope Wirkung von Isoprenalin wird auf einen vermehrten Einstrom von Calcium über L-Typ Calciumkanäle in die Herzmuskelzellen, eine insgesamt erhöhte systolische Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und eine verminderte Hemmung der SERCA durch eine gesteigerte Phosphorylierung von Phospholamban zurückgeführt (Bers 1993). Die positiv lusitrope Wirkung von Isoprenalin wird ebenfalls mit der gesteigerten Phosphorylierung von Phospholamban und zusätzlich mit einer Verringerung der Affinität von Troponin C für Calcium in Verbindung gebracht (Katz 1992). Carbachol führt dagegen durch die Stimulation muskarinischer Rezeptoren (M2) zu einer Verminderung der Adenylylcyclaseaktivität mit daraus resultierender verminderter Bereitstellung von cAMP für die Aktivierung der Proteinkinase A.

mEHTs zeigten unter Isoprenalin eine Zunahme der Kontraktionskraft um 92% bei einer simultanen Verkürzung der Kontraktionsdauer um 27%. Carbachol führte zu einer

Reduzierung des positiv inotropen Isoprenalineffekts um 17%, während der positiv lusitrope Effekt nicht aufgehoben wurde. Unter Isoprenalinstimulation zeigte sich darüber hinaus eine Abnahme der Grundspannung von mEHTs (-21%). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in rEHTs (-16%) beobachtet. Die Absenkung der Grundspannung war klar von einem Abnutzungseffekt (run-down; ca. 20% Abnahme der Grundspannung in ca. 3 h) abzugrenzen. Unter Carbachol hingegen zeigte sich keine Veränderung der Grundspannung.

Da EHTs eine gemischte Zellpopulation enthalten, sind die für intaktes Herzmuskelgewebe uncharakteristischen relaxierenden Effekte cAMP-erhöhender Substanzen möglicherweise auf Wechselwirkungen mit anderen Zellspezies zurückzuführen. Hierfür kommen vor allem glatte Gefäßmuskelzellen in Frage. Es ist bekannt, dass glatte Gefäßmuskelzellen in Abhängigkeit von ihrer Rezeptorausstattung (α 1- oder β 2-Adrenorezeptoren) unter adrenerger Stimulation tonisch kontrahieren oder relaxieren. Die Stimulation von α 1-Adrenorezeptoren bewirkt eine cAMP unabhängige Kontraktion glatter Muskelzellen, während die Stimulation von β 2-Adrenorezeptoren eine cAMP vermittelte Relaxation bewirkt (Forth et al. 1992). Möglich wäre ein Überwiegen von β 2-Adrenorezeptoren auf kokultivierten glatten Muskelzellen und deshalb eine Relaxation von EHTs nach Stimulation mit cAMP-erhöhenden Substanzen.

Bei der zusammenfassenden Beurteilung physiologischer und pharmakologischer Parameter von mEHTs (Abb. 13) lässt sich konstatieren, dass bei der Rekonstituierung muriner Kardiomyozyten zu einem dreidimensionalen Gewebeverbund auch molekulare Mechanismen zur Regulation von Kontraktilität und adrenerger und muskarinerner Signaltransduktion im wesentlichen erhalten bleiben. Auf der Basis der bislang lediglich basalen Charakterisierung wäre jedoch die weitere systematische Untersuchung physiologischer (z. B. Frank-Starling Mechanismus, Bowditch-Phänomen) und pharmakologischer Eigenschaften von mEHTs wünschenswert. Dies sollte aufgrund der nun erfolgten Etablierung des mEHT-Modells mit Definition der Kulturstandards möglich sein.

4.3. Histologische Charakterisierung von mEHT

mEHTs zeigen neben den beschriebenen mechanischen Eigenschaften auch histologisch Charakteristika intakten Herzgewebes. Die Zellverteilung in mEHTs folgte dabei einem charakteristischen Muster. Diese konnte durch Verwendung eines transgenen Mausmodells (α MHC-nLacZ) gut dargestellt werden: Während sich Kardiomyozyten zu Kulturbeginn frei und gleichmäßig in der EHT-Matrix verteilten, bildeten sich innerhalb von 3 Tagen zunächst Kardiomyozytenaggregate (Abb. 17A). In den Folgetagen formierten sich die Zellen zunächst als lockere Zellgeflechte um den zentralen Docht der Gussform (Abb. 17B), bevor sich schliesslich daraus ein kompakter Herzmuskelstrang bildete (Abb. 17C). In Immunfluoreszenzfärbungen war erkennbar, dass sich diese randständige Zellverdichtung aus mehrschichtigen Strängen längsorientierter Kardiomyozyten mit einem ungefähren Durchmesser von 100 μ m rekrutierte (Abb. 11). Innerhalb der Kardiomyozytenstränge zeigten sich elektronenmikroskopisch Zell-Zell-Kontakte sowie differenzierte ausgerichtete Sarkomerstruktur mit deutlicher Abgrenzung von Z-, I-, A- und H-Banden sowie M-Banden (Abb. 12). Dies deutet auf einen hohen Grad der Differenzierung des kontraktiles Apparates in mEHTs hin.

Für die charakteristische Anordnung von Kardiomyozyten in mEHTs könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein. Zunächst wäre für den dominanten Muskelstrang entlang eines freien Randes ein metabolischer Versorgungsvorteil denkbar, ebenso könnten jedoch entlang der Randpartie verlaufende Gewebespannungslinien günstig auf Orientierung und Wachstum der Kardiomyozyten einwirken. Dass eine metabolische Unterversorgung der alleinige Grund für die spezifische Zellverteilung in mEHTs war, ist unwahrscheinlich, da sich in diesem Fall Herzgewebe gleichmäßig an allen EHT-Rändern ausbilden müssten. Darüber hinaus müsste metabolische Unterversorgung zu einer Kumulation nekrotischen Zellmaterials im Zentrum der mEHTs als Folge des metabolischen Mangelzustands führen. Weder das eine, noch das andere wurde beobachtet, sodass von einer wesentlichen Rolle der Kraftverhältnisse (Spannungslinien) in EHTs auszugehen ist.

Dass Dehnungsreize einen Einfluss auf Wachstum und Orientierung von Kardiomyozyten haben, konnte bereits von verschiedenen Gruppen gezeigt werden (Terracio et al. 1988, Kada et al. 1999). Im Gegensatz zu übereinstimmenden Aussagen eines Hypertrophie-fördernden Effekts, sind die Daten zur Ausrichtung von Kardiomyozyten unter Dehnung widersprüchlich. Terracio et al. (1988) beschrieben eine Zellausrichtung im rechten Winkel zu einer angelegten tonischen Zugrichtung, wohingegen Kada et al. (1999) eine rechtwinklige oder parallele, von der Dauer der zyklischen Dehnung abhängige, Ausrichtung

der Kardiomyozyten zeigten. Fink et al. (2000) wiesen in mattenförmigen EHTs ebenfalls eine durch physischen Stretch gesteigerte Längsorientierung von Kardiomyozyten nach, wie es im zirkulären rEHT Modell ebenfalls zu beobachten ist. Weiterhin spricht die bevorzugte Lokalisation längsorientierter Zellstränge an der Grenzfläche von mEHT-Inhomogenitäten für Gewebespannung als Ursache des beschriebenen Zellverteilungsmusters in mEHTs. So kam es um Matrixeinschlüsse wie Luftblasen oder dem Wannrand sowie -boden anhaftende mEHT-Ausläufer zu einer Ausbildung frühzeitig kohärent kontrahierender, längsorientierter Muskelstränge in der Kulturschale. Um den Zusammenhang zwischen Gewebespannung und Zellwachstum in mEHTs weiter aufzuklären, wäre eine genaue Berechnung der Spannungsverteilungen mEHTs wünschenswert.

4.4 Anwendung von mEHT als transgenes Modell

Ein wesentlicher Grund für die Entwicklung von mEHTs war die Überlegung, dass in diesem Modell auch Herzmuskelzellen von genetisch manipulierten Mäusen eingesetzt werden könnten. In diesem Fall ließe sich dann gezielt die Auswirkung eines Gendefekts unter gut standardisierten Bedingungen untersuchen. Zugleich böte sich durch eine Kombination mit viralen Transduktionstechniken die Möglichkeit, eine „in vitro Gentherapie“ (*Rescue-Experiment*) durchzuführen und damit die Rolle eines Gendefektes für die Herzmuskelfunktion klar zu dokumentieren. Das Prinzip eines solchen Vorgehens wurde im Rahmen dieser Arbeit durch die Anwendung von Herzmuskelzellen aus Mäusen, die unter Kontrolle des Herzmuskelzell-spezifischen α -Myosinschwereketten (α MHC)-Promotors eine kernlokalisierte Form der β -Galaktosidase exprimieren (Abb. 15), und eine adenovirale Transfektion der β -Galaktosidase (Abb. 17) demonstriert.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Herstellung von künstlichen Herzgeweben aus Herzzellen neonataler Mäuse (mEHTs) entwickelt. Dabei erwiesen sich folgende Faktoren als entscheidend: 1) Anwendung von unselektionierten atrialen und ventrikulären Herzzellen; 2) passagere Zellzyklusinhibition mit AraC; 3) Supplementierung mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel; 4) Kultur unter 40% Sauerstoff; 5) Medium-supplementierung mit T3 und ITS+1; 6) Kultur unter auxotonischer Dehnung. Der Vorteil dieser dreidimensionalen Kultur in Form von mEHTs im Gegensatz zu herkömmlichen zweidimensionalen Zellkulturen besteht in der möglichen Messung kontraktile Parameter unter standardisierten Bedingungen in traditionellen Organbädern. Neben physiologischen Parametern wie der positiv inotropen Reaktion auf Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration, zeigten mEHTs herzmuskelspezifische Effekte auf pharmakologische Interventionen mit Isoprenalin und Carbachol. Strukturell setzten sich mEHTs vornehmlich aus in einer kompakten Matrix eingebetteten Muskelstrukturen zusammen. Letztere bildeten in der Regel einen kompakten Muskelstrang aus mehrschichtig organisierten, hoch differenzierten und längsorientierten Kardiomyozyten. Die erfolgreiche Konstruktion von mEHTs aus Kardiomyozyten transgener Tiere sowie die aufgezeigte Möglichkeit zur adenoviralen Transduktion von mEHTs deutet auf die Anwendung von mEHTs als vielfältig einsetzbares transgenes Herzmuskelmodell hin.

6 Ausblick

mEHTs könnten in der Zukunft eine Anwendung in der experimentellen und klinischen Medizin sowie der pharmazeutischen Industrie finden.

Die Verwendung der für die Maus in vielfältiger Weise etablierten Tiermodelle zur mEHT-Konstituierung macht eine methodisch einfache und standardisierte Überprüfung der Rolle bestimmter Zielproteine auf Funktion und Integrität des Herzens in einem transgenen *in vitro* Modell möglich. Dabei wäre neben dem geringeren Zeit- und Materialaufwand der Ausschluss *in vivo* auftretender systemischer Kompensationsmechanismen von Vorteil. Durch Anwendung molekularbiologischer Verfahren für das mEHT-Modell ließen sich *Rescue*-Versuche etablieren, wobei eine genomische Manipulation transgen wieder kompensiert würde. So könnten ausgewählte Proteine im Rahmen kardialer Erkrankungen untersucht und möglicherweise Therapieansätze entwickelt werden.

Weiterhin sind Studien zum Gewebeersatz unter Verwendung von rEHTs bereits etabliert und vielversprechend. Allerdings bleibt hier noch Raum für weitere Optimierung von EHT als myokardiales Ersatzgewebe. So wäre beispielsweise ein vermindertes Absterben der Kardiomyozyten während der EHT-Kultur sowie eine Verbesserung der kontraktilen Kraft von EHT wünschenswert. Durch Konstruktion von mEHTs aus Kardiomyozyten transgener Mäuse, die hinsichtlich ihrer Zellfunktionen genetisch manipuliert sind, könnten die Hypothesen einer Verbesserung von EHTs durch transgene Apoptosehemmung oder Zellzyklusinduktion überprüft werden. Erste Untersuchungen zur Anwendung von mEHTs im Infarktmodell zeigten, dass es möglich ist, mEHTs auf infarzierte Herzareale aufzunähen und deren Vitalität *in vivo* für zwei Wochen zu erhalten (Abb. 18).

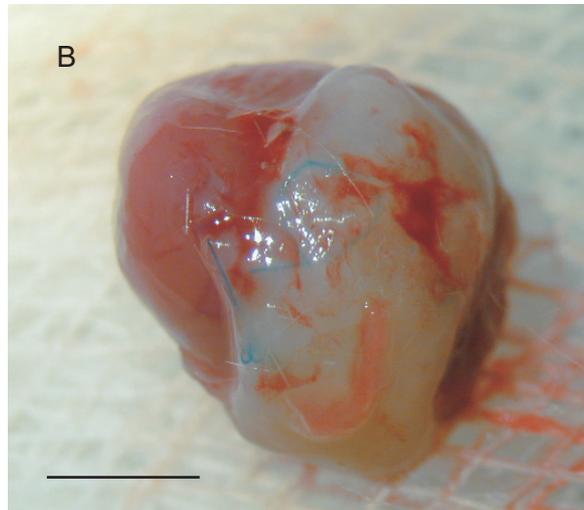
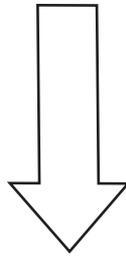
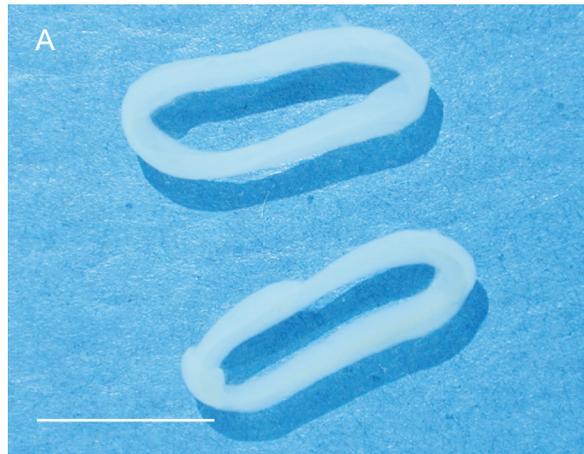


Abbildung 18 A-B: Zwei mEHTs wurden auf das (durch Koronarligatur) infarzierte Areal eines murinen Herzens mittels Einzelknopfnahnt aufgebracht. Darstellung der mEHTs vor Implantation (A) und des nach zwei Wochen explantierten Herzens (B) mit noch vitalen mEHTs. Maßstäbe 10 mm

7 Abkürzungsverzeichnis

α -MHC	α -Myosinschwerkette
Abb.	Abbildung
al.	<i>alii</i> , andere
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
β -Gal	bakterielle β -Galaktosidase
bav	biologisch aktive Viren
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
C57bl	<i>C57 black</i>
CEE	<i>chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
CLSM	<i>confocal laser scanning microscope</i>
d. h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos Minimal Essential Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>endothelial growth factor</i>
EHT	Engineered Heart Tissue
EKG	Elektrokardiogramm
EM	extrazelluläre Matrix des Engelbreth-Holm-Tumors
FKS	fetales Kälberserum
f.s.	<i>full strength</i> , nicht wachstumsfaktorenreduziert
g	Gramm oder Erdbeschleunigung ($1\text{ g}=9,80665\text{ m/s}^2$)
g.f.r.	wachstumsfaktorreduziert
Gi	inhibitorisches Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
Gs	stimulatorisches Guanin-Nucleotid-bindendes Protein
h	<i>hour</i> , Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure]
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
Hz	Hertz ($1\text{ Hz}=60/\text{min}$)
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
K	Kalium

kg	Kilogramm
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
l	Liter
M	Mol/Liter
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
mEHT	murines EHT
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol/l	Mikromol/l
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol/l
mN	Millinewton (1 mN=100 g cm/s ² =100 Dyn)
MOI	<i>multiplicity of infection</i> (biologisch aktive Viren pro Zelle)
ms	Millisekunden
N	mol/l H ₂ O
n	Anzahl
Na	Natrium
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nmol/l	Nanomol/l
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler

SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
s. o.	siehe oben
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
T3	Triiodothyronin
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
v/v	<i>volume/volume</i>
v. a.	vor allem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vgl.	vergleiche
w/w	<i>weight/weight</i>
z. B.	zum Beispiel

8 Literaturverzeichnis

Adderley SR, Fitzgerald DJ (1999) Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 274: 5038-5046

Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R, Komuro I (2000) Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3K Kinase/Akt. *Circulation* 102: 2873-2879

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994) *Molecular biology of the cell*. 3. Auflage. Garland Publishing, Inc.

Allen IS, Gaa ST, Rogers TB (1988) Changes in expression of a functional Gi protein in cultured rat heart cells. *Am J Physiol* 255:C51-C59

Aufiero TX, Reddy RC, Magovern JA, Pae WE Jr, Cooper DK (1995) Alternatives to human heart replacement. *Curr Opin Cardiol* 10:218-222

Avner ED (1990) Polypeptide growth factors and the kidney: a developmental perspective. *Pediatr Nephrol* 4:345-353

Berger HJ, Prasad SK, Davidoff AJ, Pimental D, Ellingsen O, Marsh JD, Kelly RA (1994) Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol* 266:H341-H349

Bers DM (1993) *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2. Auflage: 93-118; Bers DM (ed); Kluwer Academic Publishers Boston

Bick RJ, Snuggs MB, Poindexter BJ, Buja LM, Van Winkle WB (1998) Physical, contractile and calcium handling properties of neonatal cardiac myocytes cultured on different matrices. *Cell Adhes. Commun.* 6: 301-310

Blondel B., Roijem I, Cheneval IP (1971) Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27: 356-358

Bluhm WF, Kranias E, Dillmann WH, Meyer M (2000) Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am J Physiol* 278: 245-255

Böhm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M, Erdmann E (1990) Increase of Ca^{2+} in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 82:1249-1265

Bordoni A, Biagi PL, Angeloni C, Leoncini E, Danesi F, Hrelia S (2005) Susceptibility to hypoxia/reoxygenation of aged rat cardiomyocytes and its modulation by selenium supplementation. *J Agric Food Chem* 53: 490-494

Bowditch HP (1871) Über die Eigentümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Herzmuskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sächs Akad Wiss* 23:652-689

Boy O (2006) Morphologische und molekulare Analyse eines dreidimensionalen Herzmuskelmodells. Promotionsschrift; angenommen von der Universität Hamburg; Fachbereich Humanmedizin

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307:205-211

Brodde OE (1991) Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43:203-242

Brooks G., Poolman RA, McGill CJ, Li JM (1997) Expression and activities of cyclins and cyclin-dependend kinases in developing rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 29: 2261-2271

Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, Schoen FJ, Eisenberg SR, Carrier R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (1999) Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 277:H433-444

Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (1999) Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64: 580-589

Carrier RL, Rupnick M, Langer R, Schoen FJ, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2002) Effects of oxygen on Engineered Cardiac Muscle. *Biotechnol Bioeng* 78: 617-625

Chang KC, Figueredo VM, Schreur JHM, Kariya K, Weiner MW, Simpson PC, Camacho SA (1997) Thyroid hormone improves function and Ca handling in pressure overload hypertrophy: association with increased sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase and α -myosin heavy chain in rat hearts. *J Clin Invest* 100: 1742-1749

Colombo T, Vitali E, Lanfranconi M, Russo C, Brushi G, Marchetti C, Colucci V, Frigerio M, Oliva F, Grassi M, Gronda E, Merli M, Pellegrini A (1998) Heart transplantation 1985-1998: 13 years experience at Angelo De Gasperis Cardio Thoracic Department-Milan. *Clin Transpl*: 315-325

Crie JS, Wakeland JR, Mayhew BA, Wildenthal K (1983) Direct anabolic effects of thyroid hormone on isolated mouse heart. *Am J Physiol* 245: 328-333

Deng XF, Rokosh G, Simpson PC (2000) Autonomous and Growth Factor-induced hypertrophy in cultured neonatal mouse cardiac myocytes. Comparison with rat. *Circ. Res.* 87: 781-788

Deutsche Stiftung für Organtransplantation, Organspende und Transplantation in Deutschland 2006, www.dso.de

El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jaeckel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac cardiomyocytes. *FASEB J* 17:437-439

Eppenberger-Eberhardt M, Flamme I, Kurer V, Eppenberger HM (1990) Reexpression of α -smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes. *Dev Biol* 139:269-278

Eriksson H (1995) Heart failure: a growing public health problem. *J Intern Med* 237:135-141

Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Döring V, Kalmar P, Höppner W, Seitz HJ (1992) Increased messenger RNA level of inhibitory G-protein α -subunit $G_{i\alpha 2}$ in human end-stage heart failure. *Circ Res* 70:688-696

Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann WH, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstruction of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb* 11: 683-694

Eschenhagen T, Weil J (1998) Molekulare Grundlagen der Herzinsuffizienz. In: Ganten D, Ruckepaul K (Hrsg) *Handbuch der molekularen Medizin (Band 3): Herz-Kreislauf-Erkrankungen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: 148-221

Feldman AM, Cates AE, Veazey WB; Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL, Baumgartner WA, Dop C van (1988) Increase in the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G-protein) in the failing human heart. *J Clin Invest* 82:189-197

Felzen B, Sweed Y, Binah O (1989) Electrophysical effects of thyroid hormones in guinea-pig ventricular muscle: time course and relationships to blood levels. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1151-1161

Fink C, Ergün S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Faseb J* 14: 669-679

Fitzgerald M, Neylon CB, Marks AR, Woodcock EA (1994) Reduced ryanodine receptor content in isolated neonatal cardiomyocytes compared with intact tissue. *J Mol Cell Cardiol* 26:1261-1265

Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1992) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker – 6. völlig neubearbeitete Auflage – Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich: BI-Wissenschaftsverlag*

Frank O (1895) Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* 32:370

Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent Prog Horm Res* 51:319-351

Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ (1995) Phosphorylation and desensitization of the human β_1 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 270:17953-17961

Ganten D, Ruckepaul K (1998) *Handbuch der Molekularen Medizin, Band 3 (Herz-Kreislaferkrankungen)*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Gibson GJ, Schor SL, Grant ME (1982) Effects of matrix molecules on chondrocyte gene expression: synthesis of low molecular weight collagen species by cells cultured within collagen gels. *J Cell Biol* 93:767-774

Guernsey DL, Edelman IS (1983) *Molecular basis of thyroid hormone action*. Academic Press, London: 293-324

Harvey W (1628) *Exercitatio anatomica de moto cordis et sanguinis in animalibus*. Sumptibus Gulielmi Fitzeri, Francoforti

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 4:2881-2889

Henderson RA, Pocock SJ, Sharp SJ, Nanchahal K, Sculpher MJ, Buxton MJ, Hampton JR (1998) Long-term results of RITA-1 trial: clinical and cost comparisons of coronary angioplasty and coronary-artery bypass grafting. *Lancet* 352:1419-1425

Hoppe U, Erdmann E (2001) Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z Kardiol* 90: 218-240

Hoshida S, Nishida M, Yamashita N, Igarashi J, Aoki K, Hori M, Kuzuya T, Tada M (1996) Heme oxygenase-1 expression and its correlation to oxidative stress during primary culture of cardiomyocytes. *J Mol. Cell Cardiol.* 28: 1845-1855

Hübner N, Kreutz R (1998) *Molekular definierte Modelle der Herz-Kreislaufforschung*. *Handbuch der molekularen Medizin, Band 3 (Herz-Kreislaferkrankungen)*; Ganten D, Ruckepaul K (Hrsg), Springer-Verlag Berlin Heidelberg

- Ingber DE (1991) Integrins as mechanochemical transducers. *Curr Opin Cell Biol* 3: 841-848
- Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F (1993) Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 87: 1715-1721
- Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1987) Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoforms transitions during cardiac hypertrophy: interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest* 79: 970-977
- Jelkmann W (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.*72: 449-489
- Johansson C, Thoren P (1997) The effects of triiodothyronine (T3) on heart rate, temperature and ECG measured with telemetry in freely moving mice. *Acta Physiol. Scand.* 160: 133-138
- Jugdutt BI (1993) Prevention of ventricular remodelling post myocardial infarction: timing and duration of therapy. *Can J Cardiol.* 9: 103-114
- Kada K, Yasui K, Naruse K, Kamiya K, Kodama I, Toyama J (1999) Orientation change of cardiocytes induced by cyclic stretch stimulation: time dependency and involvement of protein kinases. *J Mol Cell Cardiol* 31:247-259
- Karliner JS, Honbo N, Epstein CJ, Xian M, Lau YC, Gray MO (2000) Neonatal mouse cardiac myocytes exhibit cardioprotection induced by hypoxic and pharmacologic preconditioning and by transgenic overexpression of human Cu/Zn superoxide dismutase. *J Mol. Cell Cardiol.* 32: 1779-1786
- Katz E, Steinhilper ME, Daud A, Delcarpio JB, Claycomb WC, Field LJ (1992) Ventricular cardiomyocyte proliferation in transgenic mice expressing α -Cardiac Myosin heavy Chain-SV 40 T antigen fusion genes. *Am J Physiol* 262: 1867-1876
- Klagsbrun M (1989) The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res* 1:207-235

Koch-Schneidemann S, Gehr P, Rutishauser B, Eppenberger HM (1994) Attachment of adult rat cardiomyocytes (ACR) on laminin and two laminin fragments. *J Struct Biol.* 113: 107-116

Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG, Field LJ (1993) Long term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngenic myocardium. *Am J Physiol* 264: 1727-1733

Kolodney MS, Wysolmerski RB (1992) Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study. *J Cell Biol* 117:73-82

Kolodney MS, Elson EL (1993) Correlation of myosin light chain phosphorylation with isometric contractions of fibroblasts. *J Biol Chem* 268:23850-23855

Lawrence DA (1996) Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 7: 363-374

Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S (2000) Bioengineered cardiac grafts: a new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102: 56-61

Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 270:13333-13340

Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA (1999a) Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 31: 513-522

Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM (1999b) Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100: 63-69

Li RK; Yau TM; Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A, Jia ZQ (2000) Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119. 368-375

Lohse MJ (1995) G-protein-coupled receptor kinases and the heart. *Trends Cardiovasc Med* 5:63-68

Long CS, Heinrich CJ, Simpson PC (1991) A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regul* 2: 1081-1095

Mauch C, Hatamochi A, Scharffetter K, Krieg T (1988) Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 178:493-503

McDevitt TC, Angello JC, Whitney ML, Reinecke H, Hauschka SD, Murry CE, Stayton PS (2002) In vitro generation of differentiated cardiac myofibers on micropatterned laminin surfaces. *J Biomed Mater Res*. 60: 472-479

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

MERIT-HF Trial Study Group (1999) Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure. *Lancet* 353:2001-2007

Meyer M, Bluhm WF, He H, Post SR, Giordano FJ, Lew WY, Dillmann WH (1999) Phospholamban-to SERCA 2 ratio controls the force-frequency relationship. *Am J Physiol* 276: 779-785

Mohamed SN, Holmes R, Hartzell CR (1983) A serum-free, chemically-defined medium for function and growth of primary neonatal rat heart cell cultures. *In Vitro* 19:471-478

Montesano R, Orci L, Vassalli P (1983) In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97:1648-1652

Most P, Remppis A, Katus HA (2002) S100A1: A regulator of myocardial contractility. *Cardiovasc Res* 56: 181-183

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. *J Mol Cell Cardiol* 34: 107-116

Murry CE, Field LJ, Menasche P (2005) Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 112: 3174-3183

Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114: 172-178

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, Meyerinck L von, Döring V, Kalmar P (1988) Increase of myocardial Gi-proteins in human heart failure. *Lancet* II:936-937

Ojamaa K, Kennessey A, Carmen D, Shenoy R, Chowdhury D, Klein I (1999) Thyroid hormone (T3) treatment following acute myocardial infarction in a rat model. 72nd annual meeting of the american thyroid association, Palm Beach, FL. A 236

Ollinger K, Brunmark A (1994) Effect of different oxygen pressures and N, N-diphenyl-p-phenylenediamine on adriamycin toxicity to cultured neonatal rat heart myocytes. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1707-1715

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Juaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and surviving. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10344-10349

Pasumarthi KB, Field LJ (2002) Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res.* 90: 1044-1054

Plate KH, Breier G, Risau W (1994) Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis. *Brain Pathol.* 4: 207-218

Reinlib L, Field LJ (2000) Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease?: A workshop of the national heart, lung and bone institute. *Circulation* 101: 182-187

RESOLVD Pilot Study Investigators (1999) Comparison of candesartan, enalapril, and their combination in congestive heart failure. *Circulation* 100:1056-1064

Ringer S (1882) Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol Lond* 3:380-393

Rocha V, Ringo DL, Read DB (1985) Casein production during differentiation of mammary cells in collagen gel culture. *Exp Cell Res* 159:201-210

Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation* 94:1996-2012

Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH (1997) Oxygen-regulated Transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible Factor-1*. *J Biol Chem* 272: 20055-20062

Ruwhof C, van der Laarse A (2000) Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res* 47:23-37

Sachs F (1989) Cell shape: determinants, regulation and regulatory role. Academic Press, New York

Sadoshima JI, Izumo S (1993) Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* 12: 1681-1692

Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM (1997) Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* 75:901-920

Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P (2000) Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119: 1169-1175

Segal J (1990) Calcium is the first messenger for the action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane: first evidence for an acute effect of thyroid on calcium uptake in the heart. *Endocrinol* 126: 2693-2702

Sidawy AN, Mitchell ME, Neville RF (1998) Peptide growth factors and signal transduction. *Semin Vasc Surg* 0,6;11/3: 149-155

Simpson RJ (1992) Effect of hypoxic exposure on iron absorption in heterozygous hypotransferrinaemic mice. *Ann Haematol* 65: 260-264

Smalley M, Leiper K, Floyd D, Mobberley M, Ryder T, Selden C, Roberts EA, Hodgson H (1999a) Behavior of a cell line derived from normal human hepatocytes on non physiological and physiological-type substrates: evidence for enhancement of secretion of liver-specific proteins by a three-dimensional growth pattern. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35:22-32

Smalley MJ, Titley J, Paterson H, Perusinghe N, Clarke C, O'Hare MJ (1999b) Differentiation of separated mouse mammary luminal epithelial and myoepithelial cells cultured on EHS matrix analyzed by indirect immunofluorescence of cytoskeletal antigens. *J Histochem Cytochem* 47:1513-1524

Soonpaa MH, Koh GJ, Klug MG, Field LJ (1994) Formation of nascent intercalated discs between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 264: 98-101

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003). Autologous bone marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-46

Starling EH (1918) *Linacre lecture on the law of the heart*. Longmans, London

Starling RC (1997) Radical alternatives to transplantation. *Curr Opin Cardiol* 12:166-171

Statistisches Bundesamt (2006) *Todesursachenstatistik*, www.destatis.de

Statistisches Bundesamt (2006) *Gesundheitsstatistiken*, www.destatis.de

Stewart CE, Rotwein P (1996) Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol Rev* 76:1005-1026

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106: 1913-1918

Terracio L, Miller B, Borg TK (1988) Effects of cyclic mechanical stimulation of the cellular components of the heart: in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* 24:53-58

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. *Nat Med* 4: 929-933

Threatte RM, Barney CC, Baker SP, Fregly MJ (1983) Dependence of μ -adrenergic responsiveness on thyroid state of male rats. *Clin Exp Pharm Phys* 10: 101-114

Tonge D, Golding JP, Edbladh M, Kroon M, Ekström PER, Edström A (1997) Effects of extracellular matrix components on axonal outgrowth from peripheral nerves of adult animals in vitro. *Exp Neurol* 146:81-90

Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ (1993) Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87:454-463

Vandenburgh HH, Karlisch P, Farr L (1988) Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol* 24:166-174

Vincan E, Neylon CB, Graham RM, Woodcock EA (1995) Isolation of neonatal cardiomyocytes reduces the expression of the GTP-binding protein G_h . *J Mol Cell Cardiol* 27:2393-2396

Vlodavsky I, Korner G, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Bar-Shavit R, Fuks Z (1990) Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 9(3):203-226

Vosberg HP, Haberbosch W (1998) Kardiomyopathien – genetische Ursachen und Pathogenese. *Handbuch der molekularen Medizin, Band 3 (Herz-Kreislaufkrankungen)*; Ganten D, Ruckepaul K (Hrsg), Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi AH (1992) Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res* 202:1-8

Wagner DR, Combes A, McTiernan CH, Sanders VJ, Lemster B, Feldman AM (1998) Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor- α . *Circ. Res.* 82: 47-56

Wang Q, Chen Q, Towbin JA (1998) Genetics, molecular mechanisms, and management of long QT syndrome. *Ann Med* 30:58-65

Wattchow J (2000) Rekonstituiertes Herzgewebe vom Huhn: Eine neue Methode zur Messung der isometrischen Kraftentwicklung in embryonalen Kardiomyozyten. Med. Dissertation. Universität Hamburg

Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Schroff SG (1987) Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 10: 37-50

Webster KA (1987) Regulation of glycolytic enzyme RNA transcriptional rates by oxygen and availability in skeletal muscle cells. *Mol. Cell Biochem.* 77: 19-28

Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH (1993) Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268:16852-16858

Weil J, Eschenhagen T, Hirt S, Magnussen O, Mittmann C, Remmers U, Scholz H (1998) Preserved Frank-Starling mechanism in human end stage heart failure. *Cardiovasc Res* 37:541-548

Williams LT, Lefkowitz RJ (1977) Thyroid hormone regulation of β -adrenergic receptor number. *J Biol Chem* 252: 2787-2789

Woodcock EA, Tanner JK, Fullerton M, Kuraja IJ (1992) Different pathways of inositol phosphate metabolism in intact neonatal rat hearts and isolated cardiomyocytes. *Biochem J* 281:683-688

Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68: 106-114

Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002a) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 90: 151-157

Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Münzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002b) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90: 223-230

Zimmermann WH, Eschenhagen T (2003) Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart Fail Rev* 8: 259-269

Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T (2004) Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 25: 1639-1647

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. *Nat Med* 12: 452-458

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas ESCHENHAGEN für die Vergabe der Promotionsarbeit, die stetige Hilfsbereitschaft auch unter großer Zeitnot, die vorbildliche und geduldige Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion sowie vor allem seine ständige Bereitschaft zur kritischen Diskussion.

Insbesondere möchte ich mich herzlichst bei Herrn Professor Dr. med. Wolfram-Hubertus ZIMMERMANN für die Überlassung meines Promotionsthemas, die immer freundschaftliche Betreuung sowie die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Dissertation bedanken. Vor allem seine ansteckende Begeisterung für die Wissenschaft, sein Optimismus, seine Anleitung zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine ständige Diskussionsfreudigkeit und -fähigkeit haben die Promotionszeit zu einer schönen und sehr gewinnbringenden Phase meiner Ausbildung gemacht.

Ebenso danke ich Dr. Thomas Rau, Dr. Ali El-Armouche sowie meinen Mitdoktoranden Dr. Michael Didie, Dr. Ivan Melnychenko, Dr. Felix Münzel und Dr. Susanne Wiechert für das immer freundschaftliche und hilfsbereite Miteinander sowie viele inspirierende Denkanstöße.

Weiterhin danke ich besonders auch Frau Beate Endress, Herrn Ingo Schubert und Herrn Sven Engmann für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die stets freundliche und fachkundige Hilfe bei allen labortechnischen Fragen.

Dem anatomischen Institut der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg unter Leitung von Prof. W. Neuhuber danke ich für die hervorragende Hilfe bei der Erstellung von Ultrastrukturanalysen ebenso wie Prof. L. Field, Indiana University Purdue University of Indianapolis, USA, für die freundliche Überlassung der transgenen Tiere.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern für ihren unerschütterlichen Glauben in mich aussprechen. Sie haben mich immer liebevoll unterstützt und motiviert und tragen nicht zuletzt dadurch einen großen Anteil an meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung. Meiner Mutter danke ich darüber hinaus von Herzen für ihre fabelhaften Lektorendienste.

Dr. Nina Sellerer danke ich für ihre mitreissende medizinische Begeisterung, ausgefeilte logistische und einzigartige moralische Unterstützung während Studium und Promotion sowie nicht zuletzt für ihr mich weiterhin begleitendes wunderbares und loyales Wesen.

10 Lebenslauf

Name Isabel Helen Alexandra Stoll, geb. Armbrüster
 Geburtsdatum 5. März 1979 in Nürnberg
 Familienstand verheiratet
 Religion evangelisch-lutherisch
 Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1985-1989 Hermann-Hedenus-Grundschule Erlangen
 1989-1998 Gymnasium Fridericianum (humanistisch) Erlangen
 1998 Abitur

Hochschulausbildung

seit 10/1998 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg
 08/2000 Ärztliche Vorprüfung, FAU Erlangen-Nürnberg
 08/2001 1. Staatsexamen, FAU Erlangen-Nürnberg
 03/2004 2. Staatsexamen, FAU Erlangen-Nürnberg
 06/2005 3. Staatsexamen, FAU Erlangen-Nürnberg

Famulaturen

03/2001 Kinderkardiologie, Charite Berlin
 09/2001 Pädiatrische Praxis, Nürnberg
 03/2003 Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie, FAU Erlangen-Nürnberg
 10/2003 Kinderkardiologie, Duke University, Durham, USA

Praktisches Jahr

04/2004-08/2004 Gynäkologie und Geburtshilfe, Kantonsspital Winterthur, Schweiz
 08/2004-11/2004 Innere Medizin, Medizinische Klinik III, FAU Erlangen
 11/2004-01/2005 Chirurgie, Prince Charles Hospital, Brisbane, Australien
 01/2005-03/2005 Chirurgie, FAU Erlangen-Nürnberg

Promotion

03/2002-10/2003 Entwicklung von künstlichem Herzgewebe aus Herzzellen der Maus
 (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Prof. Thomas Eschenhagen)

Präsentationen

W.-H. Zimmermann, **I. Armbrüster**, T. Eschenhagen 2003
 Construction of Engineered Heart Tissue from neonatal mouse cardiomyocytes.
 American Heart Association, Scientific Sessions 2003, Orlando, 9.-12.11.2003. Vortrag

I. Armbrüster, I. Melnychenko, L. J. Field, T. Eschenhagen, W.-H. Zimmermann 2004
 Konstruktion von künstlichem Herzgewebe aus Herzzellen der Maus
 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-, Herz-, und Kreislaufforschung, Mannheim, 15.-17.04.2004. Posterpräsentation

Aktuelle Tätigkeit

seit 12/2005 Assistentärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe, Prof. W. Eiermann, Frauenklinik vom Roten Kreuz, München

11 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg zur Promotion vorgelegte Dissertation mit dem Titel

Konstruktion von künstlichem Herzgewebe aus Herzzellen der Maus

selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher weder diese noch eine andere Arbeit einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

München, den

12 Ergebnistabellen

Im folgenden sind die Ergebnisse der Arbeit zur besseren Übersicht in tabellarischer Form wiedergegeben.

3.2.1 Zellgrößen von Kardiomyozyten auf biologischen Matrices ohne Zellzyklusinhibition mit AraC

Matrix:	Collagen/ Fibronectin	Collagen	Fibronectin	Gelatine	Laminin	Poly-L- Lysin
Mittelwert (μm^2):	728,53	655,53	707,93	788,61	2034,35	670,54
SEM:	79,26	90,5	80,21	69,72	151,86	57,23
Anzahl:	30	30	30	30	30	30
one way ANOVA Test (vs. Laminin):	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-	<0,001

3.2.2 Zellgrößen von Kardiomyozyten auf biologischen Matrices mit Zellzyklusinhibition mit AraC

Matrix:	Collagen/ Fibronectin	Collagen	Fibronectin	Gelatine	Laminin	Poly-L- Lysin
Mittelwert (μm^2):	562,67	539,42	518,01	576,45	1652,71	449,04
SEM:	69,34	49,97	49,56	68,04	154,01	66,15
Anzahl:	30	30	30	30	30	30
one way ANOVA Test (vs. Laminin):	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	-	<0,001

3.4.1 Effekt von transienter Zellzyklusinhibition mit AraC auf die Kontraktionskraft von mEHTs

Kontraktionskraft von mEHTs bei Kultur ohne AraC

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04	0,04
SEM:	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,61	0,11	0,08	0,05	0,05
Anzahl:	9	9	9	9	9	9

Kontraktionskraft von mEHTs bei Kultur mit AraC

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,04	0,05	0,08	0,08	0,08	0,08
SEM:	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,12	0,01	0,003	0,005	0,007
<i>two-way</i> ANOVA Test (vs. – AraC):	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Anzahl:	11	11	11	11	11	11

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs bei Kultur ohne AraC

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mM):	-	0	0,01	0,02	0,02	0,02
SEM:	-	0	0	0,01	0,01	0,01
Anzahl:	9	9	9	9	9	9

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs bei Kultur mit AraC

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mM):	-	0,02	0,05	0,05	0,05	0,04
SEM:	-	0	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>two-way</i> ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test (vs. –AraC):	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09
Anzahl:	11	11	11	11	11	11

3.4.2 Effekt des Sauerstoffgehalts unter Kultur auf die Kontraktionskraft von mEHTs

Kontraktionskraft von mEHTs unter Kultur mit 21% Sauerstoff

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,03	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05
SEM:	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,54	0,31	0,3	0,26	0,28
Anzahl:	19	19	19	19	19	19

Kontraktionskraft von mEHTs Kultur mit 40% Sauerstoff

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,05	0,09	0,13	0,14	0,14	0,14
SEM:	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,02	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
repeated ANOVA test (vs. 21% Sauerstoff):	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Anzahl:	19	19	19	19	19	19

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs unter Kultur mit 21% Sauerstoff

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mN):	-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
SEM:	-	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Anzahl:	19	19	19	19	19	19

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs Kultur mit 40% Sauerstoff

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mN):	-	0,04	0,08	0,09	0,09	0,09
SEM:	-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
two way ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test (vs. 21% Sauerstoff):	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Anzahl:	19	19	19	19	19	19

3.4.3 Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Kontraktionskraft von mEHTs

Kontraktionskraft von mEHTs bei 1 mmol/l Calcium

Supplemente:	AraC	AraC/T3	AraC/ITS+1	AraC/T3/Insulin	AraC/T3/ITS+1
Mittelwert (mN):	0,01	0,03	0,04	0,08	0,1
SEM:	0,004	0,01	0,01	0,03	0,02
ANOVA mit LSD Test (vs. AraC/T3/ITS+1):	<0,05	<0,05	<0,05	>0,05	-
Anzahl:	6	12	8	4	17

3.4.4 Effekt mechanischer Dehnung auf die Kontraktionskraft von mEHTs

Kontraktionskraft von mEHTs unter statischer Dehnung

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,08	0,12	0,13	0,13	0,13	0,13
SEM:	0,02	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
t-test (vs. 0,2 mM):	-	0,06	0,002	<0,001	<0,001	<0,001
Anzahl	14	14	14	14	14	14

Kontraktionskraft von mEHTs unter phasischer Dehnung

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,05	0,08	0,12	0,13	0,14	0,15
SEM:	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,04	0,01	0,007	0,005	0,005
Anzahl	12	12	12	12	12	12

Kontraktionskraft von mEHTs unter auxotonischer Dehnung

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,09	0,15	0,2	0,23	0,23	0,24
SEM:	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,24	0,2	0,21	0,21	0,29
Anzahl	18	18	18	18	18	18

Dehnung:	statisch	phasisch	auxotonisch
ANOVA mit Games-Howell Test (vs. statisch und phasisch):	-	-	<0,05

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs unter statischer Dehnung

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mN):	-	0,04	0,05	0,05	0,06	0,05
SEM:	-	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
Anzahl	14	14	14	14	14	14

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs unter phasischer Dehnung

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mN):	-	0,04	0,08	0,08	0,09	0,1
SEM:	-	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03
Anzahl	12	12	12	12	12	12

Änderung der Kontraktionskraft von mEHTs unter auxotonischer Dehnung

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (Δ mN):	-	0,06	0,11	0,14	0,14	0,15
SEM:	-	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
Anzahl	18	18	18	18	18	18

Dehnung:	statisch	phasisch	auxotonisch
<i>Two way</i> ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test (vs. statisch und phasisch):	-	-	0,07

3.5.2.1 Spontanfrequenz

Mittelwert (Hz):	6,5
SEM:	0,03
Anzahl:	6

3.5.2.2 Effekt von Calcium

Kontraktionskraft mEHTs

Mittelwert (mN) bei 1 mM Calcium:	0,31
SEM:	0,07
Anzahl:	6

3.5.2.3 Effekt von Isoprenalin

Kontraktionskraft mEHTs bei 0,2 mM Calcium

Isoprenalin (μM):	-	1
Mittelwert (mN):	0,12	0,23
SEM:	0,03	0,05
t-Test:	-	<0,05
Anzahl:	6	6

Kontraktionsdauer

Isoprenalin (μM):	-	1
Mittelwert (ms)	30	26
SEM:	1	1
t-Test:	-	<0,05
Anzahl:	6	6

3.5.2.4 Effekt von Carbachol

Kontraktionskraft mEHTs bei 0,2 mM Calcium und 1 μM Isoprenalin

Carbachol (μM):	-	1
Mittelwert (mN):	0,23	0,19
SEM:	0,05	0,05
t-Test (vs. 0,2 mM Calcium):	-	<0,05
t-Test (vs. 1 μM Isoprenalin):	-	<0,05
Anzahl:	6	6

Kontraktionsdauer

Carbachol (μM):	-	1
Mittelwert (ms)	26	25
SEM:	1	1
t-Test	-	<0,05
Anzahl:	6	6

3.6 Vergleich von mEHTs aus Kardiomyozyten unterschiedlicher Mausstämme

NMRI Mäuse

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,04	0,05	0,07	0,07	0,07	0,07
SEM:	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,93	0,75	0,69	0,52	0,43
<i>two-way</i> ANOVA test (vs. C57bl):	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05
Anzahl	7	7	7	7	7	7

C57bl/6 Mäuse

Calcium (mM):	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Mittelwert (mN):	0,05	0,08	0,1	0,12	0,12	0,12
SEM:	0,01	0,02	0,03	0,03	0,03	0,03
t-Test (vs. 0,2 mM):	-	0,35	0,15	0,06	0,08	0,1
Anzahl	8	8	8	8	8	8