

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle Pharmakologie und
Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Entwicklung eines Herzhypertrophie-modells *in vitro* basierend auf künstlichem Herzmuskelgewebe

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Nils Arne Sörensen
aus Gießen

Hamburg 2013

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.06.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. M. Patten-Hamel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Willems

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Klinische Bedeutung der Herzhypertrophie	1
1.2	Pathophysiologie der Herzhypertrophie.....	3
1.3	Verfügbare Modelle der Herzhypertrophie	5
1.4	Hypertrophe Signaltransduktion.....	7
1.5	Künstliches Herzmuskelgewebe	10
1.6	Fragestellung und Zielsetzung.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Materialien	13
2.2	Geräte.....	14
2.3	Chemikalien und Lösungen	15
2.3.1	Primärantikörper.....	16
2.3.2	Sekundärantikörper.....	17
2.3.3	Primerliste	18
2.4	Künstliche Herzmuskelkonstrukte (<i>Engineered Heart Tissues</i>).....	19
2.4.1	Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	19
2.4.2	Herstellung von EHTs	19
2.4.3	Silikonhalterungen.....	22
2.4.4	Kultivierung der EHTs	23
2.4.5	Optimierung der Kulturbedingungen – Verzicht auf Pferdeserum	24
2.4.6	Erhöhung der Nachlast	25
2.4.7	Positivkontrollen	26
2.4.8	Analyse der Kontraktilität von EHTs	26
2.4.9	Analyse der Stoffwechselaktivität der EHTs.....	31
2.5	Histologie	33
2.5.1	Herstellung histologischer Präparate.....	33
2.5.2	Entparaffinieren	34
2.5.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	35
2.5.4	Immunhistochemie	36
2.5.5	Immunfluoreszenz.....	40
2.5.6	Zellgrößenbestimmung	41
2.5.7	Auswertung der ANP-gefärbten Querschnitte mittels ImageJ- Software	42
2.6	Molekularbiologie	43

2.6.1	Isolation von RNA mittels Säulenextraktion	43
2.6.2	Quantitative Echtzeit-PCR	44
2.6.3	<i>Illumina</i> © <i>Chip Array</i>	46
2.7	Proteinbiochemie.....	47
2.7.1	Proteinextraktion	47
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.7.3	Western Blot Analyse.....	48
2.8	Elektronenmikroskopie	49
2.9	Statistische Auswertung.....	49
3	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Miniaturisierung des Modells	50
3.1.1	Korrelation von Auslenkung und Kraft der Silikonhalterungen.....	52
3.1.2	Unmittelbare Auswirkung der Nachlasterhöhung.....	54
3.2	Optimierung des Versuchsablaufs	55
3.2.1	Verzicht auf Pferdeserum	55
3.2.2	Evaluation der EHTs	57
3.2.3	Postivkontrollen durch chemische Stimulation	58
3.3	Aktivierung des fetalen Genprogramms	59
3.3.1	Das fetale Genprogramm auf Transkriptionsebene	59
3.3.2	Das fetale Genprogramm auf Proteinebene.....	60
3.4	Zellgrößenbestimmung	64
3.4.1	Zellgrößenbestimmung anhand Dystrophin-Querschnitte	64
3.5	Genomweite Expressionsanalyse.....	67
3.5.1	Kriterien einer „guten“ Genliste.....	67
3.5.2	Konkordanz der Transkriptome	73
3.5.3	Vergleich der akuten Nachlasterhöhung im EHT mit <i>Transverse Aortic Constriction</i> im Versuchstier.....	77
3.6	Untersuchung des Energiestoffwechsels in hypertrophierten EHTs.....	79
3.6.1	Veränderungen des Glukoseverbrauchs	79
3.6.2	Messung der Luciferaseaktivität – <i>Bioluminescence Imaging</i>	79
3.7	Zunahme des Bindegewebes – Fibrose	81
3.7.1	Fibrose im EHT auf Transkriptionsebene	81
3.7.2	Fibrose im EHT auf Proteinebene	83
3.8	Veränderungen der Kontraktilität	85

4	DISKUSSION	87
4.1	Entwicklung der Methodik	87
4.1.1	Das Grundprinzip	87
4.1.2	Künstliches Herzmuskelgewebe – EHT	87
4.1.3	Physikalische Grundlagen	88
4.1.4	Etablierung serumfreier Medienbedingungen	88
4.1.5	Kardialer Phänotyp des künstlichen Herzmuskelgewebes	89
4.1.6	Hypertrophie durch pharmakologische Stimulation.....	90
4.2	Aktivierung des fetalen Genprogramms	91
4.3	Genomweite Transkriptomanalyse	93
4.4	Zellgrößenmessung.....	95
4.5	Fibrose.....	97
4.6	Veränderung des Stoffwechsels	99
4.7	Kontraktilität.....	102
4.8	Hypertrophie im EHT – Vergleich des neuen Modells mit bereits etablierten Herzhypertrophie-Modellen.....	103
4.9	Ausblick	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	107
6	SUMMARY	109
7	LITERATURVERZEICHNIS	111
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	122
9	DANKSAGUNG	123
10	LEBENS LAUF	124
11	ANHANG	125
11.1	Austestung verschiedener interner Standards zur Bestimmung der Transkriptkonzentrationen in der qPCR.....	125
11.1.1	Methodik	125
11.1.2	Ergebnisse	126
11.2	Messung der Kontraktilität bei aufsteigendem Calcium-gradienten.....	127
11.2.1	Methodik	127
11.2.2	Ergebnisse	129
11.3	Autophagie im EHT	131
11.3.1	Methodik	131
11.3.2	Ergebnisse	132

11.4 Literaturverzeichnis für im Anhang zitierte Quellen.....	135
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	136

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
α -MHC	α - <i>myosin heavy chain</i> , α -Isoform der schweren Myosinkette
AN	Akute Nachlasterhöhung
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat

B

BDM	2,3-Butanedionmonoxim
BGA	Blutgasanalyse
BLI	<i>Bioluminescence imaging</i>
β -MHC	β - <i>myosin heavy chain</i> , β -Isoform der schweren Myosinkette
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro minute
BSA	Bovines Serumalbumin

C

Ca ²⁺	Calcium
CEE	<i>Chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
CNP	<i>C-type natriuretic peptide</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CK	Kreatinkinase
ct	<i>Cycle threshold</i>
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>

D

d	<i>Day</i> , Tag
<i>d</i>	Durchmesser
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

ECM	Extrazellulärmatrix
EHT	<i>Engineered heart tissue</i> , künstliches Herzgewebe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET-1	Endothelin-1
Erk	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
ES	Embryonale Stammzellen
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>

F

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FC	<i>Fold change</i> , das Vielfache
For	<i>Forward</i> , 5'-3' Primer
FKS	Fötale Kälberserum

G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat

H	
h	<i>Hour</i> , Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin
HS	<i>Horse serum</i> , Pferdeserum
I	
IgG	Immunglobulin G
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IP ₃	Inositoltrisphosphat
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
K	
K	Wandspannung
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
Kontr	Kontrolle
M	
M	Mol/l
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
min	Minute
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>Messenger ribonuclein acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
N	
n	Anzahl der untersuchten Proben, biologische Replikate
N	Newton, Kraft: 1 kg*m*s-2
NaOH	Natronlauge
P	
p	p-Wert, Signifikanzniveau
p	Druck
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin
PIP2	Phosphatidylbisphosphat
PPG	PCR-Produkt-Größe
PTCA	Peripherer transkutaner Angioplastie
Q	
qPCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR
R	
R	Radius
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RefSeq	<i>NCBI Reference Sequence</i>
rev	<i>Reverse</i> , 3'–5' Primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
S	
s	Sekunde
SD	<i>Standard diviation</i> , Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
Serca2a	Sarco/endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase 2, Typ P-ATPase
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i> , spontan hypertensive Ratte

T	
T1	Kontraktionszeit
T2	Relaxationszeit
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Tetraiodthyronin, Thyroxin
TAC	<i>Transverse aortic constriction</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGFβ	<i>Transforming growth factor β</i>
TRIS	Trisaminomethan

U	
U	<i>Units</i> , Enzymeinheit

V	
V	Volt

W	
WB	Western Blot

1 EINLEITUNG

1.1 Klinische Bedeutung der Herzhypertrophie

Laut statistischem Bundesamt waren Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems mit 41% aller Sterbefälle im Jahr 2010 die häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2012). Die chronisch ischämische Herzkrankheit war mit 72.734 Fällen (8,5% aller Todesfälle) die häufigste Todesursache überhaupt, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (55.541 Fälle, 6,5%) und der Herzinsuffizienz (48.306 Fälle, 5,6%; Abb. 1.1).

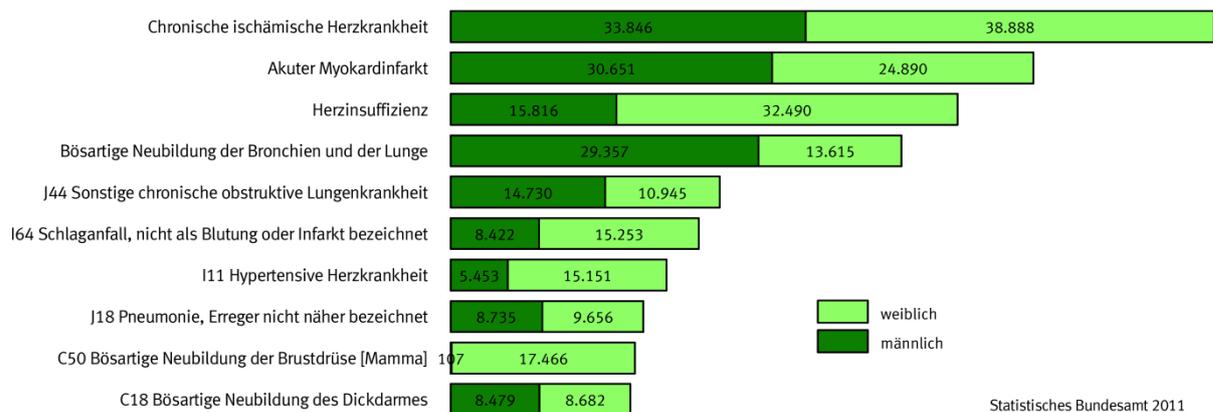


Abb. 1.1 Häufigste Todesursachen 2010. Aus „Todesursachen in Deutschland, 2010“ (Statistisches Bundesamt, 2012).

Während für erstere mit modernen Therapieverfahren wie peripherer transkutaner Angioplastie (PTCA) und Bypass-Operationen zuverlässige und lebensverlängernde Behandlungsoptionen zur Verfügung stehen, zeichnet sich die Herzinsuffizienz durch eine nach wie vor sehr schlechte Prognose aus. So sterben ca. 50% der Patienten innerhalb fünf Jahren nach Diagnosestellung (Roger et al., 2012). Der Verlauf ist dabei meist chronisch progredient und mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Da die Herzinsuffizienz vorwiegend eine Krankheit des älteren Menschen ist und häufig mit einer Pflegebedürftigkeit einhergeht, stellt sie eine immense Belastung der sozialen Systeme dar, welche durch den demographischen Wandel zu einer immer älteren Gesellschaft stetig zunimmt. Aktuell ist die Herzinsuffizienz der häufigste Grund für eine stationäre Krankenhausbehandlung und die durch die Herzinsuffizienz verursachten Krankheitskosten betragen 2006 2,9 Milliarden Euro, was 1,1% der gesamten Gesundheitskosten Deutschlands ausmachte (Neumann et al., 2009).

Definitionsgemäß spricht man von Herzinsuffizienz, wenn das Herz wegen akuter oder chronischer Schädigung nicht mehr in der Lage ist, die peripheren Organe ausreichend zu

1 Einleitung

perfundieren. Durch eine verminderte Zirkulation kommt es zu einem Rückstau vor der betroffenen Herzkammer mit klinischen Folgen wie Atemnot, Aszites, Ödemen oder Leberzirrhose, die mangelnde Versorgung peripherer Organe führt zu Symptomen wie chronischer Müdigkeit, zerebraler Beeinträchtigung, Depression und Abnahme der Nierenfunktion. Spätestens seit der *Framingham-Heart-Studie*, einer großen prospektive Kohortenstudie mit dem Ziel, Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen zu identifizieren sowie Entstehung und Verlauf dieser Erkrankungen zu verfolgen, sind vielfältige Ursachen der Herzinsuffizienz bekannt. Die häufigsten sind langjähriger arterieller Hypertonus, gefolgt von koronarer Herzkrankheit (Levy et al., 1996). Meistens geht der Herzinsuffizienz eine Phase der Herzhypertrophie voraus, in der das Herz versucht die aufgrund verschiedenartiger Schädigungen entstandene Funktionseinschränkung zu kompensieren. Dabei nimmt das Volumen der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) zu, was zu einer verbesserten Pumpfunktion und geringeren Wandspannung führt. Gleichzeitig steigt damit aber das Risiko für die Entstehung von Herzinsuffizienz, Arrhythmien und plötzlichem Herztod (Molkentin und Dorn, 2001).

Bis heute sind viele Details der Pathophysiologie der Herzhypertrophie nur unvollständig verstanden. Speziell welche Mechanismen zu einer Dekompensation des hypertrophierten Herzmuskels führen und damit eine Herzinsuffizienz einleiten ist, obgleich von großem klinischen Interesse, nach wie vor unklar. Um in Zukunft neue therapeutische Ansatzpunkte zu entdecken, muss versucht werden, die offenen Fragen zu beantworten, um so dieser „Volkskrankheit“ entgegen zu wirken.

1.2 Pathophysiologie der Herzhypertrophie

Kurz nach der Geburt sind Kardiomyozyten nicht mehr in der Lage eine Zellteilung durchzuführen (Porrello et al., 2011). Trotzdem kann das Herz seine Größe den aktuellen Anforderungen entsprechend verändern. So wächst es nach der Geburt, um dem Kreislauf des wachsenden Organismus gerecht zu werden. Dabei steigt nicht die Anzahl der Herzmuskelzellen, sondern die einzelne Zelle nimmt an Volumen zu, rekrutiert zusätzliche kontraktile Einheiten und steigert so die Kontraktilität. Diese Fähigkeit erhält sich das Herz ein Leben lang: Beispielsweise führt körperliches Training bei einer Kombination von Kraft- und Ausdauertraining (Radfahren, Rudern) zu einer Zunahme der Herzgröße auf das 1,6-fache eines „normalen“ Herzens (Pluim et al., 2000). Diese Vergrößerung wird im Allgemeinen nicht als krankhaft bezeichnet und ist vollständig reversibel, sie wird deshalb auch physiologische Hypertrophie genannt. Die Gründe für die Größenveränderung basieren auf dem Laplace'schen Gesetz: $K = p \cdot r \cdot (2d)^{-1}$. Es besagt, dass die Belastung des Gewebes – die Wandspannung (K) – direkt vom zu überwindenden transmuralen Druck (p), dem Ventrikelradius (r) und dem Kehrwert der Ventrikelwanddicke (d) abhängig ist. Höheren hämodynamischen Anforderungen (z.B. regelmäßiges körperliches Training oder Schwangerschaft) begegnet das Herz mit einer Zunahme des Kardiomyozytenvolumens, um die Ventrikelwanddicke zu erhöhen, was den biomechanischen Stress für das Gewebe deutlich reduziert. Bei der physiologischen Hypertrophie gehen die morphologischen Veränderungen neben der Größenzunahme der Kardiomyozyten mit einer erhöhten Sauerstoffkapazität durch Wachstum der Blutgefäße und Mitochondrienproliferation sowie einem erhöhten diastolischen Ventrikelvolumen und damit einer Erhöhung des Schlagvolumens einher (Shiojima et al., 2005; Abel und Doenst, 2011).

Die physiologische Hypertrophie wird, wie der Name vermuten lässt, nicht als krankhaft angesehen. Auf sie folgt kein dekompensiertes Stadium oder die Progression zur Herzinsuffizienz. Dies sind Attribute der pathologischen Hypertrophie. Die pathologische Hypertrophie ist ebenfalls assoziiert mit einer Zunahme von Kardiomyozytenvolumen und Proteinsynthese, allerdings kommt es gleichzeitig zu einer starken Produktion von extrazellulären Matrixproteinen (Fibrose), einer Reexpression fetaler Gene, einem vermehrten Glukosestoffwechsel bei gleichzeitiger Reduktion des Fettsäurestoffwechsels und gesteigerter Apoptose. Bei der pathologischen Hypertrophie entwickelt sich ein *Circulus vitiosus*, der auf lange Sicht zu einer Dekompensation des Herzens führt: Mit dem Auftreten einer hämodynamischen Belastung (z. B. Hypertonus oder Aortenstenose) erhöht sich der Stress auf die Ventrikelwand, was direkte Auswirkungen auf den Herzmuskel hat (siehe 1.3). Da das Herz bei stärkerer Belastung den Bedarf der peripheren Organe nicht mehr

1 Einleitung

ausreichend decken kann, werden neurohumorale Mechanismen aktiviert: Es kommt zu einer Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus der Nebenniere, zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und zu einer verstärkten Produktion von Endothelin-1. Der Blutdruck steigt durch Konstriktion der Widerstandsgefäße und Erhöhung der myokardialen Füllung, der Schlagkraft und der Herzfrequenz. Diese Stimulation erhöht die Arbeitslast für das Herz zusätzlich, was zu einem gesteigerten Energieverbrauch, Zelltod, Fibrose und Kardiomyozytenhypertrophie führt (Eschenhagen, 2008). Wie bei der physiologischen Hypertrophie versucht das Herz durch eine Zunahme des Ventrikelwanddurchmessers die Wandspannung zu reduzieren, allerdings geschieht dies bei der pathologischen Hypertrophie durch Zunahme nicht kontraktiles Gewebes: Es kommt zur Fibroblastenproliferation und zur Produktion von extrazellulären Matrix-Proteinen – Fibrose. Zudem scheinen die pathologisch hypertrophierten Kardiomyozyten zwar mehr kontraktile Einheiten (Sarkomere) zu besitzen, ihre Kontraktilität ist jedoch eingeschränkt (Dorn et al., 2003). Die Folge ist ein großer Herzmuskel mit schlechter Pumpfunktion, was sich in dem klinischen Bild einer Herzinsuffizienz manifestiert.

1.3 Verfügbare Modelle der Herzhypertrophie

Es gibt eine Vielzahl gut untersuchter Modelle der Herzhypertrophie, im Folgenden werden die wesentlichen aufgeführt:

In den meisten Fällen sind Modelle der Herzhypertrophie von der im Menschen zu findenden Pathologie abgeleitet und auf das Versuchstier übertragen. Der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzhypertrophie im Menschen ist der arterielle Hypertonus (Levy et al., 1996). Ein erfolgreiches Hypertonus-Modell ist die „spontan hypertensive Ratte“ (*spontaneously hypertensive rat, SHR*). Durch gezieltes Paaren von Ratten mit hypertensiven Blutdrücken wurde eine Rattenlinie geschaffen, in der alle Nachkommen eine prähypertensive Phase im Jugendalter und ab einem Alter von 15 Wochen dauerhafte Blutdrücke über 180 mmHg aufweisen (Okamoto und Aoki, 1963). Spontan hypertensive Ratten entwickeln eine Herzhypertrophie mit einer Zunahme des linksventrikulären Gewichts, einer Zunahme des Glukosestoffwechsels bei Abnahme des Fettsäurestoffwechsels und weisen eine vermehrte Expression von Vertretern des fetalen Genprogramms auf (Iemitsu et al., 2001). Zu Einschränkungen der Kontraktilität und Dekompensation des Herzmuskels kommt es allerdings erst in einem Alter von 18 - 24 Monaten (Legrice et al., 2012). Ein erhöhter arterieller Hypertonus stellt für das Herz primär eine Erhöhung der Nachlast dar. Nachlast bezeichnet den Widerstand, den das Herz überwinden muss, um ein Blutvolumen auszuwerfen. Um die Effekte einer Nachlasterhöhung schneller und dadurch mit weniger Aufwand verbunden untersuchen zu können, wurde das Modell der „*transverse aortic constriction*“ (TAC) entwickelt. Hierbei wird Versuchstieren (meistens Mäusen) operativ mittels einer Ligatur die Aorta ascendens auf einen definierten Durchmesser eingeengt. Diese Verengung führt, ähnlich einer Aortenstenose beim Menschen, zu einer starken Zunahme der Nachlast mit Ausbildung einer konzentrischen pathologischen Hypertrophie. Je nach Restdurchmesser der Aorta kommt es bereits nach wenigen Wochen zu Zeichen der Herzinsuffizienz mit systolischer Dysfunktion, eingeschränkter diastolischer Füllung und sogar pulmonalvenöser Stauung bzw. rechtsventrikulärer Hypertrophie (van Deel et al., 2011). Aufgrund der bereits nach kurzer Interventionsdauer entstehenden vollen Ausprägung der Herzhypertrophie ist TAC ein in hohem Maße etabliertes Modell der pathologischen Herzhypertrophie und der Herzinsuffizienz und wird auch in dieser Arbeit als Referenz verwendet werden (siehe 3.5.3, S. 77).

Untersuchungen am Versuchstier werden immer dadurch eingeschränkt, dass der Organismus mit der Aktivierung einer Vielzahl von Systemen auf eine Intervention reagiert. So kommt es beispielsweise bei TAC zu einer massiven Ausschüttung neurohumoraler

1 Einleitung

Faktoren, die direkte Folgen für die Herzmuskelzellen haben (siehe 1.4). Um die Zusammenhänge bei der Entstehung der Herzhypertrophie zu entschlüsseln, benötigt man jedoch Methoden, die es zulassen, einzelne Stimuli ohne Kostimulation oder Gegenregulation durch den Organismus zu applizieren. Genau diese Eigenschaft besitzen isolierte Kardiomyozyten in Zellkultur. In aller Regel werden hierzu (meistens neonatale) Kardiomyozyten mittels Trypsinverdau aus dem Organverbund herausgelöst, durch einen Zwischenschritt (*preplating*) die „Nicht-Myozyten-Zellen“ abgereichert und danach in Zellkulturschalen inkubiert. Die so isolierten Kardiomyozyten bilden Myofilamente aus, können spontan kontrahieren und lassen sich durch Veränderungen der Medium-Zusammensetzung oder Zugabe von Katecholaminen zu Hypertrophie stimulieren (Simpson et al., 1982). Es ist ein vergleichsweise einfach zu handhabendes Verfahren, das nahezu jede Form pharmakologischer, genetischer und physikalischer Manipulation zulässt und deren Folgen *in vitro* untersuchbar macht. Durch Kultivierung der Kardiomyozyten auf Silikonmembranen und anschließender Dehnung dieser Membrane lässt sich insbesondere ein entscheidender hypertropher Stimulus untersuchen – biomechanischer Stress (Frank et al., 2008).

Limitierungen ergeben sich aus der für Kardiomyozyten unnatürlichen Umgebung. Die Zellen müssen keine gerichtete Kraft entwickeln, so dass sich Myofilamente nicht parallel ausrichten. Die Zellen bilden keine physikalischen Zell-Zell-Kontakte aus, die im Herzen für die Kraftübertragung elementar sind, und eine Interaktion mit einer extrazellulären Matrix findet nur bedingt statt (sie kann jedoch simuliert werden; Ogawa et al., 2000). Grundsätzlich lässt sich nicht ausschließen, dass die Ergebnisse eines Experiments an isolierten Kardiomyozyten von der besonderen *in vitro* Situation beeinflusst sind. Nichtsdestotrotz sind die meisten der unter 1.4 aufgeführten Hypertrophie-assoziierten Signalwege an isolierten Kardiomyozyten entdeckt und untersucht worden, was den Wert dieses Modells unterstreicht.

1.4 Hypertrophe Signaltransduktion

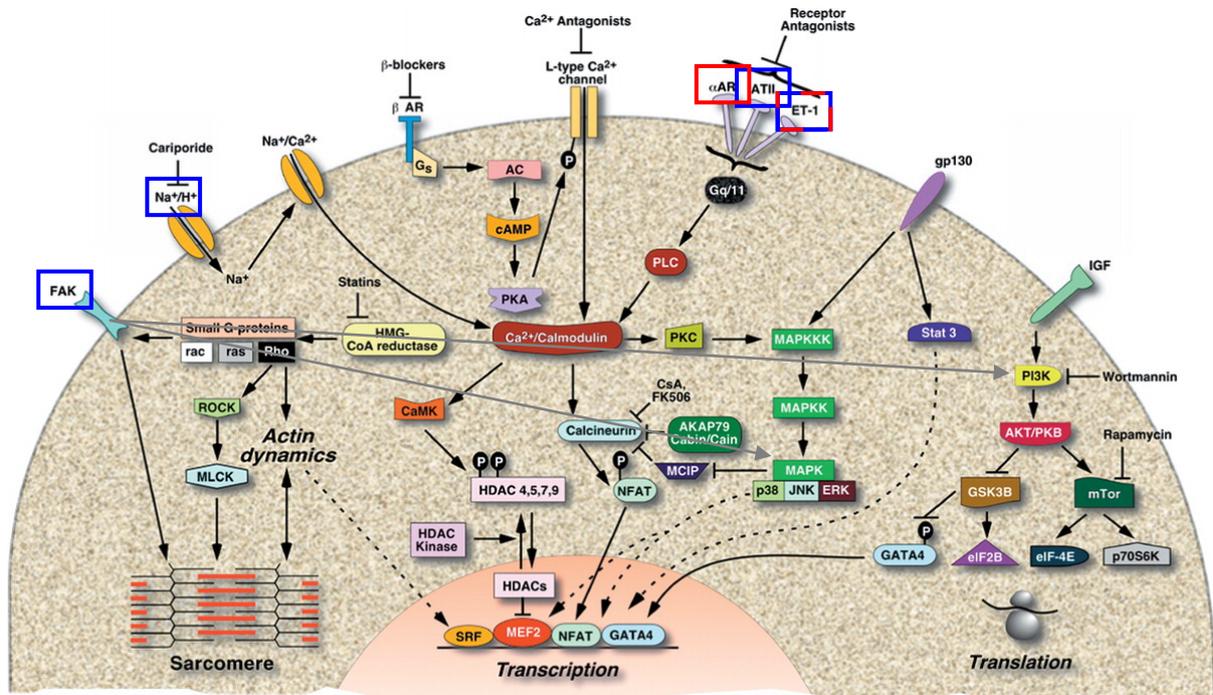


Abb. 1.2: Übersicht über hypertrophe Signaltransduktion. Abbildung aus „Cardiac hypertrophy – the good, the bad and the ugly“ (Frey und Olson, 2003). Die roten Kästen markieren zwei in dieser Arbeit durch pharmakologische Stimulation aktivierte Signalwege. Die blauen Kästen indizieren mechanosensitive Signalproteine. Die grauen Pfeile stehen für Signalwege, die in der Originalabbildung nicht abgebildet sind.

Abb. 1.2 zeigt einen Überblick über die verschiedenen Signalwege, die eine hypertrophe Reaktion in der Zelle hervorrufen. Es wird angenommen, dass das Zusammenspiel all dieser Mechanismen das Bild einer Herzhypertrophie erzeugt: Katecholamine (Adrenalin und Noradrenalin) führen über den β -Adrenozeptor zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase mit anschließender Aktivierung der Proteinkinase A, diese phosphoryliert L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle, was einen Calciumeinstrom in die Zelle zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einer Komplexierung von Ca^{2+} -Ionen und Calmodulin, was mehrere Signalkaskaden anregt, die in der Aktivierung prohypertropher Transkriptionsfaktoren enden. Die Rezeptoren für Noradrenalin, Angiotensin-II und Endothelin-1 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind in der Zellmembran verankert und weisen nach Aktivierung durch einen Liganden eine hohe Affinität für die ebenfalls in der Zellmembran verankerten heterotrimeren G-Proteine auf. Im inaktiven Zustand bestehen diese G-Proteine aus einem Komplex aus der größeren α -Untereinheit, die GDP (Guaninnukleotiddiphosphat) gebunden hat, sowie den kleineren β - und γ -Untereinheiten. Die Bindung des aktivierten Rezeptors führt zur Dissoziation von GDP von der α -Untereinheit und der Bindung von GTP (Guaninnukleotidtriphosphat). Dies wiederum hat eine Dissoziation der β - und γ -Untereinheit

1 Einleitung

vom Rezeptor zur Folge. Sowohl der Komplex aus β - und γ -Untereinheit als auch die GTP-bindende α -Untereinheit ist in der Lage, membrangebundene Zielproteine zu aktivieren, unter anderem die Phospholipase C. Die α -Untereinheit besitzt eine GTPase-Aktivität, d. h. sie hydrolysiert GTP zu $\text{GDP} + \text{P}_i$. Sobald das energiereiche Phosphat den Rezeptor verlassen hat, kann die α -Untereinheit die β - und γ -Untereinheiten erneut binden – das G-Protein ist wieder inaktiv. Die aktivierte Phospholipase C spaltet Phosphatidylbisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). IP_3 verlässt die Zellmembran und aktiviert Ca^{2+} -Ionenkanäle im Endoplasmatischen Retikulum, der Ca^{2+} -Einstrom hat die bereits für den β -Adrenozeptor beschriebenen Folgen. Die pharmakologische Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Phenylephrin (Agonist am α -Adrenozeptor), Endothelin-1 oder Angiotensin-II sind seit langem erprobte Mittel, um Kardiomyozyten zur Hypertrophie zu stimulieren.

Die Aktivierung über extrazelluläre Signale, wie bei den neurohumoralen Faktoren, scheint aber nicht die einzige Möglichkeit zu sein, hypertrophe Signalkaskaden in Gang zu setzen. Durch die Kultivierung neonataler Kardiomyozyten auf elastischen Silikonmembranen lässt sich passiver Dehnungsstress auf isolierte Kardiomyozyten ausüben. Das Auseinanderziehen der Enden der Silikonmembran führt zu einer Transkriptionsaktivierung in den Kardiomyozyten ohne humorale Stimulation (Komuro et al., 1990). Durch diese Methode konnten die Auswirkungen biomechanischen Stresses *in vitro* analysiert werden. Dieser Stress führte zu Hypertrophie der Kardiomyozyten (Komuro et al., 1991), wofür zunächst autokrine bzw. parakrine Mechanismen verantwortlich gemacht wurden: Sadoshima et al. (1993) konnten zeigen, dass es nach Dehnungsstress auf Kardiomyozyten zu einer Sezernierung von Angiotensin-II kommt und die stressinduzierte Hypertrophie durch Inhibierung der Produktion von Angiotensin-II verhindert werden kann. Gleiches konnte auch für Endothelin-1 nachgewiesen werden (Yamazaki et al., 1996). Wie das initiale mechanische Stresssignal in eine intrazelluläre Antwort übersetzt wird, blieb allerdings zunächst unklar. Heute weiß man, dass es eine Reihe von Mechanosensoren gibt, die durch mechanische Belastungen der Zellmembran eine Konformationsänderung erfahren und daraufhin ein biochemisches Signal abgeben. So kommt es bspw. zu einer Aktivierung von stresssensiblen Ionenkanälen (Stiber et al., 2009), vor allem der Na^+/H^+ -Austauscher scheint dabei eine Rolle zu spielen (Cingolani et al., 2005). Eine weitere Möglichkeit der mechanischen Signaltransduktion sind Integrine. Sie bezeichnen eine Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die extrazelluläre Matrix mit dem Zytoskelett verbinden: Bei mechanischer Belastung kommt es zu einer Annäherung mehrerer Integrine aneinander, was verschiedene hypertrophe Signalwege aktiviert (Brancaccio et al., 2006). Unter anderem kommt es zu einer Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK), einer zytosolischen

1 Einleitung

Thyrosinkinase, deren Phosphorylierung unter anderem zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs, also einer Endstrecke der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt (Tarone und Lembo, 2003; vgl. Abb. 1.1). Außerdem haben G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dank ihres transmembranösen Aufbaus die Möglichkeit, biomechanischen Stress direkt wahrzunehmen und in ein biochemisches Signal umzuwandeln. So konnte sowohl für den Angiotensin-II- als auch für den Endothelin-1_A-Rezeptor eine Stress-induzierte Aktivierung gezeigt werden (Storch et al., 2012).

Das Herz ist also in der Lage, eine hämodynamische Belastung direkt wahrzunehmen und Adaptierungsvorgänge zu aktivieren. Es ist anzunehmen, dass das klinische Bild der Herzhypertrophie durch eine Mischung aus primärer mechanosensorischer und sekundärer humoraler Stimulation der Kardiomyozyten entsteht (Ruwhof und van der Laarse, 2000). Die humorale Stimulation und ihre Folgen lassen sich in Zellkulturversuchen ohne großen technischen Aufwand untersuchen (siehe 1.3, S. 5), auch die Auswirkungen von biomechanischem Stress lassen sich, wie zuvor beschrieben, an isolierten Kardiomyozyten *in vitro* untersuchen. Allerdings verwenden sämtliche in der Literatur verfügbaren Studien passiven Dehnungsstress als mechanischen Stimulus. Für die Muskelzelle bedeutet dies eine Erhöhung der Vorlast. Vorlast bezeichnet im Herzen die bei der Füllung der Herzkammer entstehende Dehnung des Myokards. Der Dehnungsstress für isolierte Kardiomyozyten simuliert also eine Belastung, die durchaus im menschlichen Herzen vorkommt und auch bei Überlastung krankhaft ist, z. B. durch Volumenbelastung bei Aorteninsuffizienz (Grossman et al., 1975), allerdings scheint für die Dekompensation des Herzmuskels die Erhöhung der Nachlast wesentlich bedeutender zu sein (Levy et al., 1996).

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, das die Erhöhung der Nachlast für Kardiomyozyten *in vitro* ermöglicht. Es wurden zudem die Auswirkungen der Nachlasterhöhung mit den Folgen pharmakologischer Stimulation durch Endothelin-1 und Phenylephrin verglichen.

1.5 Künstliches Herzmuskelgewebe

Künstliches Herzmuskelgewebe ist ein Überbegriff für dreidimensionale funktionale Herz-ähnliche Gewebe, die durch unterschiedliche Methoden generiert werden. Ziel ist es dabei, die Limitierungen der 2D-Kultur (mangelnde Zell-Zell-Interaktion, ungerichtete Kontraktionswiderstände, etc.) zu überwinden und langfristig Gewebe zu entwickeln, die therapeutisch eingesetzt werden können, um untergegangenes Herzgewebe eines erkrankten Patienten zu ersetzen.

Es werden dabei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Eine Möglichkeit bietet die Kultivierung isolierter Kardiomyozyten auf einem thermosensitiven Kunststoff, der temperaturabhängig die Ablösung der Kardiomyozytenschicht ermöglicht. Durch Übereinanderlagern dieser Einzelzellschichten ergeben sich mehrschichtige Zellteppiche, die auf geschädigtes Myokard transplantiert werden können (Shimizu et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit bietet die Fertigung von künstlichen Matrices, in die Zellen immigrieren und so ein funktionales Gewebe bilden können (Leor et al., 2000). Neben künstlichen Matrices kann auch biologisches Material als Grundlage dienen. So konnten z. B. komplette Herzen von allen Zellen befreit, das verbleibende Gerüst als biologische Matrix verwendet und mit Kardiomyozyten besiedelt werden (Ott et al., 2008). Diese Methode hat den Vorteil, dass eine natürliche Umgebung für die Zellen geschaffen wird und die Gefäßversorgung des Ursprungsorgans eine Perfusion des künstlichen Gewebes ermöglicht. Ein weiterer Ansatz ist die direkte Einbettung von Herzzellen in eine Matrix. Die Herzzellen werden dabei mit Substanzen, wie z.B. Kollagen I (Eschenhagen et al., 1997), Kollagen I und Matrigel (Zimmermann et al. 2000), Matrigel (Morritt et al., 2007) oder Fibrin (Hansen et al., 2010) gemischt, die die Fähigkeit besitzen, zu aggregieren und ein Gel-artiges Konstrukt zu bilden. Die Gele ermöglichen die Diffusion von Nährstoffen aus dem Medium durch die Matrix zu den Zellen, sie gestatten Wachstum und Differenzierung der Zellen mit Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und sie sind ausreichend flexibel, um Kontraktionen des gesamten Konstrukts zuzulassen. Ein elementarer Zwischenschritt bei der Entwicklung zu transplantierbarem funktionalem Herzgewebe ist die Etablierung stabiler Kulturbedingungen, die eine optimale Entwicklung der künstlichen Gewebe ermöglichen. Die von Hansen et al. (2010) vorgestellte Methode bietet diesbezüglich viele Vorteile: Fibrinogen aggregiert nach der Zugabe von Thrombin innerhalb weniger Minuten zu Fibrin. Dadurch wird ein Absinken der Zellen durch die Schwerkraft während der Konsolidierungsphase (wie z.B. bei Kollagen-I- und Matrigel-Gelen) verhindert, was in einer deutlich gleichmäßigeren Verteilung der Zellen innerhalb des Konstrukts resultiert. Die Verwendung von flexiblen Silikonstäben als Aufhängung stellt einen dauerhaften gerichteten Kontraktionswiderstand dar, der zu einer Ausrichtung der Zellen

1 Einleitung

entlang der Kraftlinien innerhalb des Konstrukts führt. Durch die Anpassung auf ein mit einer Standard-24-Well-Zellkulturschale kompatibles Format wurde eine hoch standardisierte Plattform entworfen, die sich dank exakter Kontraktilitäts-Analyse durch ein videooptisches Messverfahren z. B. als Basis für Arzneimitteltestungen eignet. Selbst schwer zu untersuchende Eigenschaften einzelner Substanzen, wie das Arrhythmiepotential, lassen sich an den künstlichen Herzmuskelgeweben untersuchen (Hansen et al., 2010). Mit der Verwendung von Kardiomyozyten, die durch Differenzierung humaner embryonaler (ES) oder induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) gewonnen wurden, sind sogar menschliche Herzmuskeln in diesem Format untersuchbar. Dies gestattet neue Möglichkeiten der Toxizitätsanalyse einzelner Medikamente, aber auch gezielte Überexpression oder Knock-Out einzelner interessanter Proteine in menschlichem funktionellem Gewebe, was bis dato unmöglich war (Schaaf et al., 2011).

Da EHTs den physiologischen Zustand des Herzmuskels relativ gut nachbilden, ist davon auszugehen, dass sich das Gewebe auch bei pathologischen Verhältnissen ähnlich einem natürlichen Herzmuskel verhält. Die Kostimulation von EHTs mit dem β -Adrenozeptor-Agonisten Isoprenalin und Endothelin-1 führte beispielsweise zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten mit Einschränkungen der Kontraktilität (Münzel et al., 2005). Da EHTs in der Lage sind, deutliche Kräfte zu entwickeln und erhebliche Widerstände zu überwinden, sollte es möglich sein, einen entscheidenden Faktor in der Entstehung der Herzhypertrophie und der Progression zur Herzinsuffizienz – die erhöhte Nachlast – am EHT zu untersuchen.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Modells der Herzhypertrophie durch Erhöhung der Nachlast. Folgende Unterpunkte sollten dabei erfüllt werden:

- Das von Hansen et al. (2010) entwickelte Protokoll zur Herstellung von EHTs soll derart modifiziert werden, dass eine Erhöhung des Kontraktionswiderstands möglich ist.
- Dabei soll die Möglichkeit der Kontraktilitätsanalyse mittels videooptischer Messsysteme erhalten bleiben.
- Um undefinierte Serumeffekte zu verhindern, sollen nach Möglichkeit serumfreie Bedingungen etabliert werden.
- Zum Vergleich der Nachlast-induzierten Hypertrophie sollen zwei pharmakologisch induzierte Hypertrophie-Gruppen entwickelt werden.

Nach erfolgreicher Entwicklung des Modells sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Kommt es zu einer Zunahme der Kardiomyozytengröße?
- Lassen sich durch molekularbiologische Methoden mit Hypertrophie-assoziierte Veränderungen nachweisen?
- Gibt es Hinweise auf das Vorliegen einer pathologischen Hypertrophie, z. B. Fibrose, Veränderungen des Stoffwechsels, Kontraktilitätseinschränkungen?
- Lassen sich die Ergebnisse mit Erkenntnissen aus bereits etablierten Hypertrophie-Modellen vergleichen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
Silikonschlauch ID x AD: 0,5 x 1,3mm	Fisher Scientific	3100504
Spritzenfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt	83.1826.001
GAC Nubryte® Wire type 304 VAR steel Size 016, length: 14"	GAC	03-016-58
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368813
6 Well Suspensionskultur Multiwellplatte	Greiner	657185
24 Well Multidish	Nunc	144530
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
NucleoSpin TriPrep	Macherey-Nagel	740966.50
Omnifix®-F, Feindosierungsspritzen, 1 mL	Braun	
Filtropur S0,2	Sarstedt	83.1826.001
Remanium® Stangendraht, rund, Ø 0,8 mm	Dentaurum	527-006-00
24 Well Glasbodenzellkulturschale	IWAKI® Cell Biology	5826-024
SYLGARD® 184 Elastomer Kit	Dow Corning	

2.2 Geräte

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
Automatischer Gewebefiltrator Leica TP1020	Leica	14042230543
Basler Kamera Typ A602f	Basler	
Blot-System, Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad	170-3836
Blutgasanalysegerät, ABL90	Radiometer GmbH	
CCD-Kamera, IVIS® 200	Caliper	
Elektronenmikroskop, LEO 912AB mit Omega-Energie-Filter	Zeiss	
Elektrophoresesystem, Mini Protean 3	Bio-Rad	165-8030
Fluorescence System Interface	IonOptix	
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss	
Kamera, Zeiss AxioCam	Zeiss	
Kühlplatte, Leica EG1150C	Leica	14038838037
<i>Laser Scanning Microscope</i> LSM 510 META	Zeiss	
Lichtmikroskop, Zeiss AxioPlan	Zeiss	
MyoCam	IonOptix	
Myopacer	IonOptix	
Nanodrop™ ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.	
Paraffinausgießstation, Leica EG1150 H	Leica	14038837689
Rotationsmikrotom, Leica RM2125 RTS	Leica	14045746960
qPCR- System ABI Prism 7900 HT	Applied Biosystems	4351405

2.3 Chemikalien und Lösungen

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
30% Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Roth	
Agarose, 2% (PBS)	Invitrogen	15510-019
Ammoniumpersulfat, (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Roth	
Aprotinin, 2 mg/ml (Aqua ad injectabilia)	Sigma-Aldrich	A1153
Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	Baxter	
Ascorbinsäure	Merck	
2,3-Butanedionmonoxim, BDM	Roth	
Bovines Fibrinogen, 200 mg/ml+0,5 µg Aprotinin/mg Fibrinogen (0,9% NaCl)	Sigma-Aldrich	
Bromphenolblau	Roth	
DAB-Chromogen aus <i>Ventana® ultraView Universal DAB Detection Kit</i> , enthält 3,3- 'Diaminobenzidin (DAB)	Ventana Roche	760-500
DAB-H ₂ O ₂ aus <i>Ventana® ultraView Universal DAB Detection Kit</i> , enthält 0,04% Wasserstoffperoxid	Ventana Roche	760-500
DRAQ5 (DR50050)	Biostatus Limited	DR50200
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, mit 1 g/l D-Glukose und 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin mit Phenolrot)	Biochrom	F 0415
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; mit 1 g/l D-Glukose und 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin oder Phenolrot)	Gibco	11880028
Endothelin-1, 10 µM (Aqua ad injectabilia)	Sigma-Aldrich	E7764
Essigsäure, 100%	Roth	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dinatriumsalz	Roth	
Eukitt®	Sigma-Aldrich	03989
Fluoromount-G™	Southern Biotech	0100-01

2 Material und Methoden

Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen	
Glycerol	Roth	
<i>Hanks Buffered Salt Solution</i> , HBSS	Gibco	14025050
Hühnerembryonenextrakt	eigene Herstellung	
Insulin	Sigma-Aldrich	I9278
Kohlendioxid	Linde Gas	
Methanol	Roth	
Milchpulver	Roth	T145.2
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED	Roth	
Natriumchlorid, NaCl	Merck	
Natriumdodecylsulfat	Roth	
Natriumfluorid, NaF	Roth	
Natriumhydrogencarbonat	Merck	
Penicillin/Streptomycin (100X)	Gibco	10378-016
Pferdeserum Hitze inaktiviert	Gibco	
(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride	Sigma-Aldrich	P6126
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Gibco	
Ponceau rot S	Roth	
Proteinase K, >600 mAU/ml	Qiagen	19133
Roti-Histofix	Roth	
Roti-Histol	Roth	
Thrombin, 100 U/ml (PBS, Aqua ad injectabilia)	Sigma-Aldrich	T7513
Trijodthyronin, T ₃ , 20 µg/ml (1 ml 1 N NaOH + 49 ml DMEM)	European Commission – Joint Research Center	
Trisaminomethan, TRIS	Roth	
Trisaminomethanhydrochlorid, TRIS-HCL	Roth	

2.3.1 Primärantikörper

Protein	Antikörperbezeichnung	Firma	Verdünnung
Dystrophin	<i>mouse anti-dystrophin monoclonal antibody</i> , MAB1645	Millipore	1:200
ANP	<i>mouse anti-ANP (23/1) monoclonal antibody</i> , sc-80686	Santa Cruz	1:500

2 Material und Methoden

Kollagen I	<i>rabbit anti-collagen 1 polyclonal antibody, ab34710</i>	Abcam	1:200
β -MHC	<i>mouse anti-β-MHC monoclonal antibody, M8421</i>	Sigma Aldrich	1:2000
Erk1/2	<i>rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) polyclonal antibody, #9102</i>	Cell Signaling	1:1000
α -Actinin	<i>mouse monoclonal anti-α-actinin (sarcomeric), A7811</i>	Sigma Aldrich	1:800

2.3.2 Sekundärantikörper

Protein (Prozedur)	Antikörperbezeichnung	Firma	Verdünnung
Maus-IgG (IHC*)	<i>HRP-labeled antibody-cocktail aus Ventana© ultraView Universal DAB Detection Kit mit Ziege anti-Maus IgG, Ziege anti-Maus IgM und Ziege anti-Hase</i>	Ventana Roche	Nach Herstelleranweisung
Hase-IgG (IHC*)			
Maus-IgG (WB ⁺)	<i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), 115-035-003</i>	Jackson Immuno Research	1:20000
Hase-IgG (WB ⁺)	<i>Anti-Rabbit IgG (whole molecule)– Peroxidase antibody produced in goat, A0545</i>	Sigma Aldrich	1:5000
Maus-IgG (IF [#])	<i>anti-mouse-IgG-Alexa 488, A-11001</i>	Invitrogen	1:800

*IHC: Immunhistochemie, ⁺WB: Western Blot, [#]IF: Immunfluoreszenz

2.3.3 Primerliste

Gensymbol	Beschreibung	RefSeq Nummer	Primer	PPG*
Nppa	Atriales natriuretisches Peptid	NM_012612.2	For: CCTCGGAGCCTGCGAAGGTCA Rev: TGTGACACACCGCAAGGGCTTG	156
Nppb	<i>brain natriuretic peptide</i>	NM_031545.1	For: GACGGGCTGAGGTTGTTTTA Rev: ACTGTGGCAAGTTTGTGCTG	195
Acta1	α -skeletales Actin	NM_019212.2	For: AGGACCTGTACGCCAACAAAC Rev: ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	195
Myh7	Schwere Kette des β -Myosins	NM_017240.1	For: AGGAGGCGGAGGAACAGGCCAAC Rev: GGGCTTCACAGGCATCCTTAGGGTT	200
Myh6	Schwere Kette des α -Myosins	NM_017239.2	For: GGGGCAAGGTCACTGCCGAA Rev: GGCCGCATAGCGCTCCTTGA	167
Atp2a2	SERCA2a	NM_001110139.2	For: GGCTCGTGGGCTCCATCTGC Rev: TCCAGTATTGCAGGCTCCAGGT	199
Col1a1	Kollagen, Typ I, alpha 1	NM_053304.1	For: TGGACCTCCGGCTCCTGCTC Rev: TCGCACACAGCCGTGCCATT	172
Col3a1	Kollagen Typ III, alpha 1	NM_032085.1	For: CTGTCCC CGGAAGCACTGG Rev: ATGTTCTGGGAGGCCCGCT	178
Ctgf	<i>connective tissue growth factor</i>	NM_022266.2	For: GCGAGCCAACTGCCTGGTCC Rev: GCGTCCGGATGCACTTTTTGCC	194
Fn1	Fibronectin 1	NM_019143.2	For: CGGTGGCATGGAGAGCCAGC Rev: TCACCCGCACTCGGTAGCCA	152
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	NM_017008.3	For: CTCATGACCACAGTCCATGC Rev: TTCAGCTCTGGGATGACCTT	155
18s	18s rRNA	V01270.1	For: ATACATGCCGACGGGCGCTG Rev: TTCGAATGGGTGCTCGCCGC	181
Tfrc	Transferrin Rezeptor	NM_022712.1	For: TGCTTGGGTAGGAGGCAGCG Rev: GCCGAGCAAGGCTAAACCGGG	186
Gusb	Glucuronidase	NM_017015.1	For: CCCGCATGTCCCCAAGACGG Rev: CGGCACGGAAGCTCCACAGG	153

*PPG: PCR-Produkt-Größe

2.4 Künstliche Herzmuskelkonstrukte (*Engineered Heart Tissues*)

2.4.1 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Für die Präparation der Kardiomyozyten wurden Wistar- und Lewis-Ratten im Alter von 0-3 Tagen nach dem von der Ethik-Kommission der Universität Hamburg genehmigten Protokoll verwendet. Die Präparation erfolgte standardisiert durch die Medizinisch-technischen Assistenten/ -innen Marianne Flato, June Übeler und Thomas Schulze. Hierbei wurden die Tiere unter sterilen Bedingungen dekapitiert und ihre Herzen entnommen. Die Atrien (Vorhöfe) der neonatalen Rattenherzen wurden abgetrennt und die separierten Ventrikel einem fraktionierten Trypsin/DNAse-Auflösung unterzogen (Eschenhagen et al., 1997). Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellkonzentration der Kardiomyozytensuspension bestimmt. Die durch dieses Verfahren isolierten Rattenkardiomyozyten wurden unmittelbar für die Herstellung von *Engineered Heart Tissues* (im Folgenden EHTs) verwendet.

2.4.2 Herstellung von EHTs

Für die Herstellung von EHTs im 24-Well-Format wurde eine etablierte Methode zur Generierung von *Fibrin Based Mini EHTs* genutzt (Hansen et al., 2010). Dazu wurde eine 24-Well-Zellkulturschale mit einer 60 °C heißen 2%igen Agaroselösung befüllt. In jedes Well wurden 1,5 ml Agarose pipettiert. Mit Hilfe von Platzhaltern aus Teflon (Abb. 2.1, A) wurden Gussformen generiert (Abb. 2.1, B, C). In diese wurden nach Aushärtung der Agarose und Entfernen der Platzhalter Silikonhalterungen für die später herzustellenden EHTs (Abb. 2.1, D) platziert. Die Herstellung von EHTs im 6-Well-Format erfolgte nach dem gleichen Prinzip, es wurde lediglich eine 6-Well-Zellkulturschale mit 10 mL Agarose befüllt und entsprechende Teflonplatzhalter verwendet (Abb. 2.1, E-H).

2 Material und Methoden

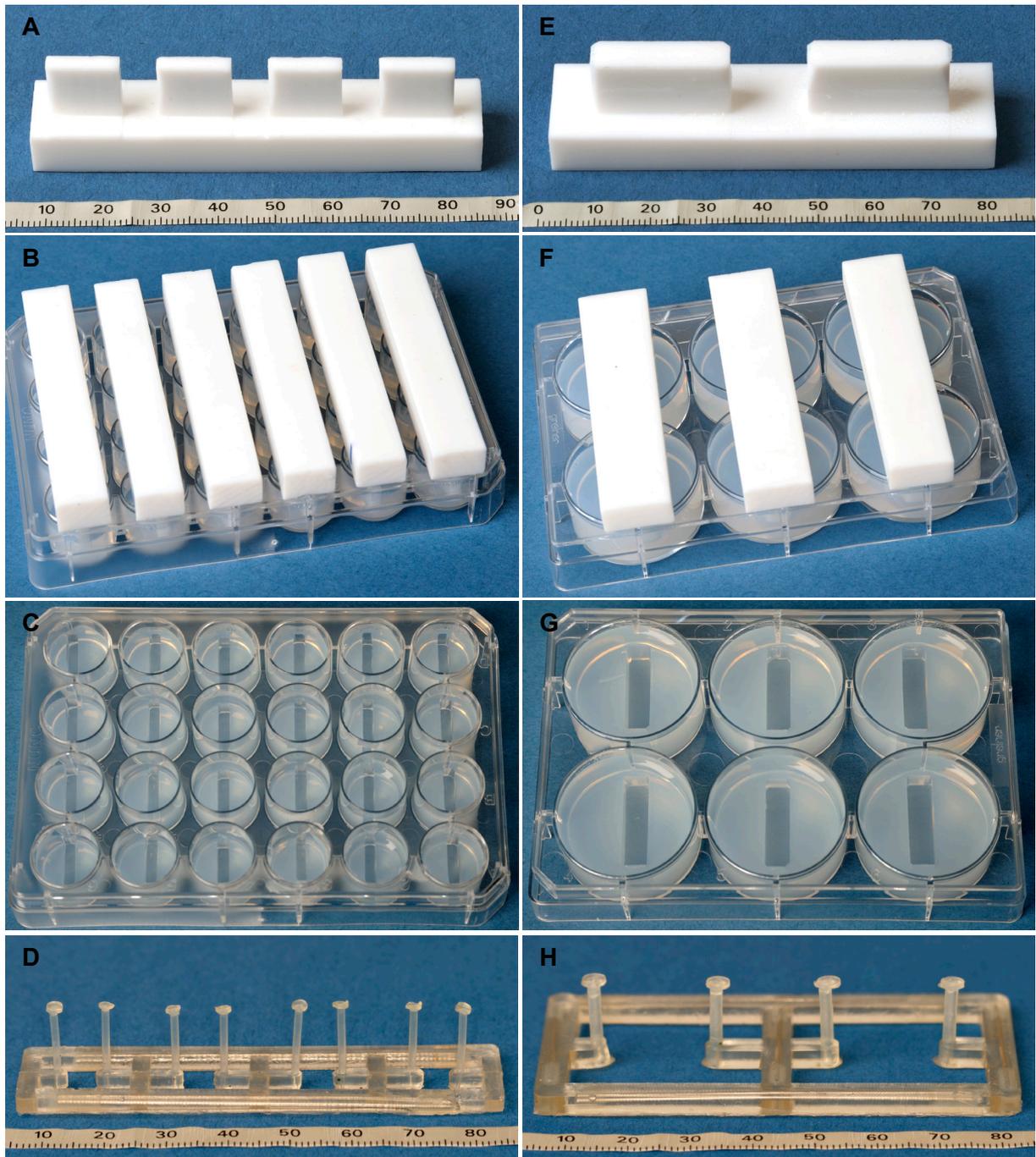


Abb. 2.1: Gussformen zur Herstellung von EHTs. 1,5 mL 60 °C heiße Agarose wurde in jedes Well einer 24-Well-Zellkulturschale gefüllt. Daraufhin wurden die Teflon-Spacer platziert (A, B). Nach Abkühlen der Agarose konnten die Platzhalter entfernt werden (C) und die Silikonhalterungen (D) in die entstandenen Mulden gesetzt werden. E-H zeigt die gleiche Prozedur für das 6-Well-Format.

2 Material und Methoden

Zur Herstellung von EHTs wurde folgender **Mastermix** angesetzt:

	<u>24-Well-EHTs</u>	<u>6-Well-EHTs</u>
Zellsuspension	16,7 x 10 ⁶ Zellen	18 x 10 ⁶ Zellen
2X DMEM*	186,7 µl	242 µl
Bovines Fibrinogen	86,7 µl	110 µl
Nicht-Kardiomyozyten-Medium**	ad 3333,3 µl	ad 4400 µl
	<i>für 24 EHTs</i>	<i>für 4 EHTs</i>

*2x DMEM

20% 10X DMEM,
20% Pferdeserum (inaktiv),
2% Penicillin/Streptomycin,
4% Hühnerembryonenextrakt
in Aqua ad injectabilia

**Nicht-Kardiomyozyten-Medium

10% fötales Kälberserum (FKS; hitzeinaktiviert)
1% Penicillin/Streptomycin
1% Glutamin in DMEM

Für das 24-Well-Format wurden nun je 3 µl einer 100 U/ml Thrombinlösung in 24 sterile 0,2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt. Diesen wurden jeweils 100 µl des zuvor sorgfältig triturierten Mastermixes hinzugefügt und das Gemisch sofort in die Agarosevertiefung um die Silikonhalterung pipettiert. Nach Zugabe des Thrombins war ein schnelles Arbeiten notwendig, um ein vorzeitiges Gerinnen des Ansatzes durch Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zu verhindern. Für EHTs des 6-Well-Formats wurden 132 µl Thrombin in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, diese mit einer 2 ml Pasteur-Pipette aufgenommen und kurz mit dem Mastermix vermischt. Daraufhin wurden zweimal 2000 µl des Gemischs mit derselben Pipette aufgenommen und zügig 900 µl in jede Gussform zwischen die Schläuche der zuvor eingesetzten Silikonhalterung pipettiert. Nach zwei Stunden Inkubationszeit in den Gussformen bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ (Zellkulturschrank) war der Fibrinogenmastermix auspolymerisiert und die Kardiomyozyten in einer dreidimensionalen Matrix eingebettet. Es wurde nun jedes Well mit vorgewärmtem DMEM überschichtet und für 10 Minuten inkubiert, um das Herauslösen der an den Silikonhalterungen hängenden EHTs (Abb. 2.2, A) aus den Agaroseformen zu erleichtern. Die 24-Well-EHTs wurden daraufhin in eine neue 24-Well-Zellkulturschale überführt, die zuvor mit jeweils 1,5 ml vorgewärmtem EHT-Medium pro Well befüllt wurde (Abb. 2.2, C). Die 6-Well-EHTs wurden in eine mit 8 ml EHT-Medium pro Well befüllte 6-Well-Zellkulturschale überführt (Abb. 2.2, B und D):

2 Material und Methoden

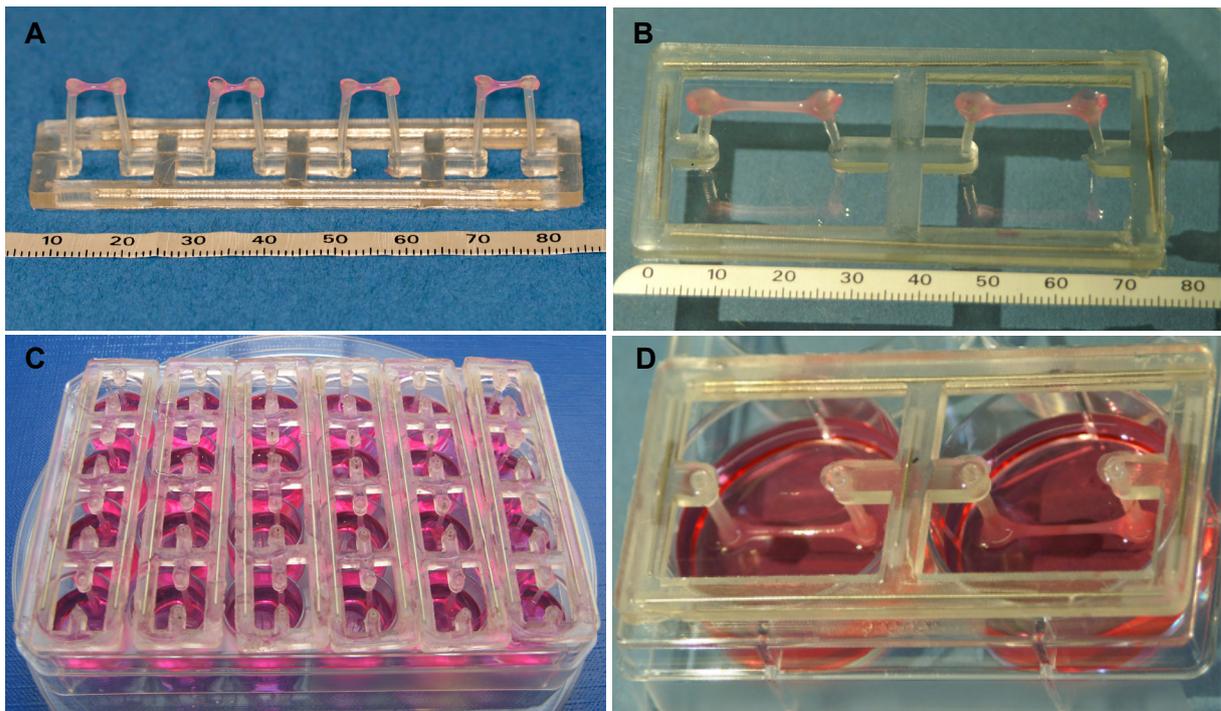


Abb. 2.2: Fertige EHTs an Silikonhalterungen. Gezeigt sind EHTs des 24-Well-Formats (A, C) und des 6-Well-Formats (B, D) an ihren Silikonhalterungen (A, B) und in mit Medium gefüllten Zellkulturschalen (C, D).

Zusammensetzung EHT-Medium

DMEM	(mit 1 g/l D-Glukose, 3,7 g/l NaHCO ₃)
Pferdeserum (inaktiviert)	10%
Hühnerembryonenextrakt	2%
Penicillin/Streptomycin	1%
Insulin	10 µg/ml
Aprotinin	33 µg/ml

Nach diesem Protokoll erhielt man 24 EHTs mit einem Volumen von 100 µl und einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen pro EHT, bzw. 4 EHTs mit einem Volumen von 900 µl und einer Zellzahl von $3,682 \times 10^6$ Zellen pro EHT.

2.4.3 Silikonhalterungen

Die Silikonhalterungen dienen als Gerüst zur Herstellung der EHTs und als Aufhängung während der gesamten Zellkulturzeit. Sie wurden von Hand in zwei Formaten vom Ingenieur und Feinmechaniker Bülent Aksehirlioglu hergestellt: Eine größere Variante passend zu 6-Well Greiner® Zellkulturschalen für 900 µl EHTs und eine kleinere passend zu 24-Well Nunc® Zellkulturschalen für 100 µl EHTs. Die größere Variante hatte einen in einer Teflonform

2 Material und Methoden

gegossenen Silikonrahmen von 80 mm x 40 mm mit einem Silikonsteg in der Mitte. Insgesamt wurden vier 15 mm lange Schläuche eingelassen, so dass 2 Paare mit einem Abstand von 19 mm entstanden. Innerhalb der Paare betrug der Abstand 20 mm. Die verwendeten Schläuche (Fisher Scientific) hatten einen Innendurchmesser von 1,0 mm und einen Außendurchmesser von 3 mm. An der Spitze der Schläuche wurden Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 4 mm aufgeklebt (Abb. 2.3).

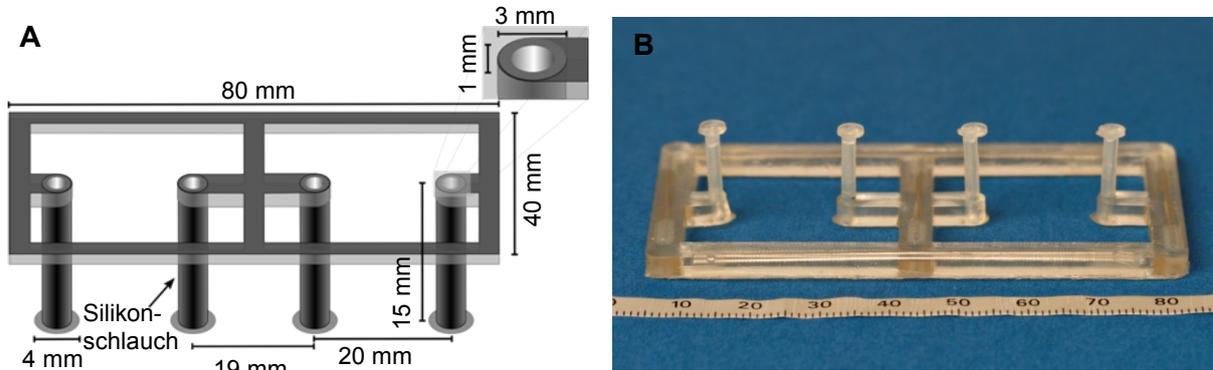


Abb. 2.3: Silikonhalterung des 6-Well-Formats. A: schematische Darstellung, B: fotografische Darstellung

Die kleinere Silikonhalterung hatte einen 80 mm x 18 mm Silikonrahmen, der durch drei Stege unterteilt wurde. Hier wurden acht 15 mm lange Schläuche so eingelassen, dass vier Paare mit jeweils 12 mm Abstand entstanden. Innerhalb der Paare betrug der Abstand der Schläuche 8 mm. Die verwendeten Schläuche (Fisher Scientific[®]) hatten einen Innendurchmesser von 0,5 mm und einen Außendurchmesser von 1,3 mm. An den Spitzen der Schläuche wurden Silikonscheiben mit einem Durchmesser von 2 mm aufgeklebt (Abb. 2.4).

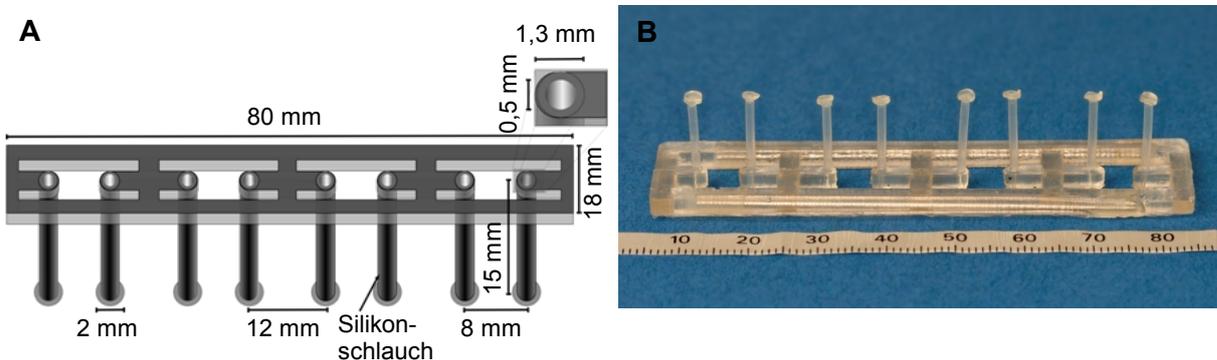


Abb. 2.4: Silikonhalterung des 24-Well-Formats. A: schematische Darstellung, B: fotografische Darstellung

2.4.4 Kultivierung der EHTs

Die Kultivierung der EHTs erfolgte im Zellkulturschrank bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂. Jeweils montags, mittwochs und freitags fand ein Medienwechsel statt, für den das EHT-Medium am jeweiligen Tag frisch angesetzt wurde. Um den dritten Tag nach Herstellung der

2 Material und Methoden

EHTs begannen die Kardiomyozyten mikroskopisch sichtbar zu kontrahieren, nach ca. sieben Tagen wurden die ersten kohärenten Muskelkontraktionen mit Auslenkung der Silikonschläuche beobachtet. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Mit Einsetzen der ersten Kontraktionen wurden die Kontraktionseigenschaften der EHTs jeweils zwei Stunden nach Medienwechsel in einer videoptischen Messapparatur gemessen (siehe 2.4.8).

2.4.5 Optimierung der Kulturbedingungen – Verzicht auf Pferdeserum

Um eine Kultivierung ohne Pferdeserum zu ermöglichen, wurde nach acht Tagen Kulturzeit das Pferdeserum im Medium auf 4% und nach weiteren fünf Tagen auf 0% reduziert und durch Trijodthyronin (T_3) ersetzt. Es wurden Konzentrationen von 0,5 ng/ml - 5,0 ng/ml T_3 getestet (siehe 3.2.1, S. 55). Zur Herstellung einer Stammlösung wurde 1 mg T_3 (European Commission - Joint Research Center) in 1 ml 1 N Natronlauge (NaOH) gelöst, mit 49 ml DMEM verdünnt und anschließend in Aliquots à 10 μ l bei -80°C gelagert. Die restlichen Bestandteile des EHT-Mediums blieben unverändert. Nach der Umstellung auf Medium ohne Pferdeserum wurde das Medium täglich gewechselt, und die EHTs konnten nach zwei weiteren Tagen für Versuche verwendet werden (Abb. 2.5).

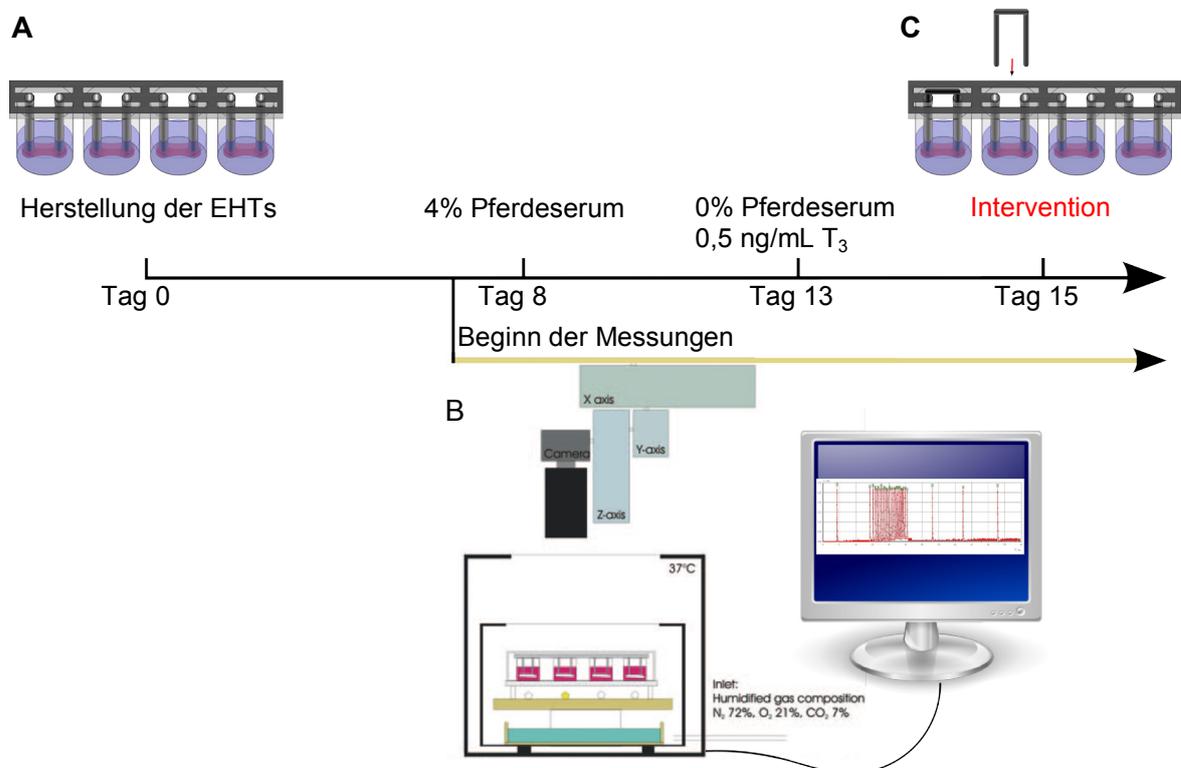


Abb. 2.5: Ablauf der Kultivierung der EHTs, schematische Darstellung. A: EHTs an Tag 0; B: Videoptische Messapparatur; C: Erhöhung der Nachlast durch Einführung der Bügel, siehe 2.4.5.1.

2.4.5.1 Laborchemische Analyse der Trijodthyronin-Konzentration in verschiedenen Mediumzusammensetzungen

Zur Einschätzung der freien Schilddrüsenhormonkonzentration in den eingesetzten Medien wurden das Standard EHT-Medium (10% Pferdeserum) und das serumfreie Medium (0% Pferdeserum, 0,5 ng/ml T₃) vom Zentrallabor für klinische Chemie des UKE auf freies T₃, Gesamt-T₃, freies Thyroxin (T₄) und Gesamt-T₄ untersucht. Da die Konzentrationen photometrisch bestimmt wurden, musste als Basis der Medien DMEM ohne Phenolrot verwendet werden. Es wurden jeweils 5 ml hergestellt und 10 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde an das Zentrallabor übergeben.

2.4.6 Erhöhung der Nachlast

Um den Widerstand der Silikonschläuche zu erhöhen wurden Edelstahlbügel passend zu Länge und Abstand der Schläuche von Hand hergestellt. Für die 6-Well-Silikonhalterungen aus 0,8 mm und für die 24-Well Silikonmatten aus 0,4 mm dickem Edelstahl.

Die Bügel wurden nach mehrmaliger Desinfektion in 70% Ethanol unter sterilen Bedingungen in die Schläuche eingeführt (Abb. 2.6). Die Erhöhung der Nachlast erfolgte, je nach Folgeversuch, über eine Dauer von 4-7 Tagen. Während dieser Zeit erfolgte ein täglicher Medienwechsel. In jeder Versuchsreihe wurden EHTs ohne Erhöhung der Nachlast als Negativkontrollgruppe mitgeführt.

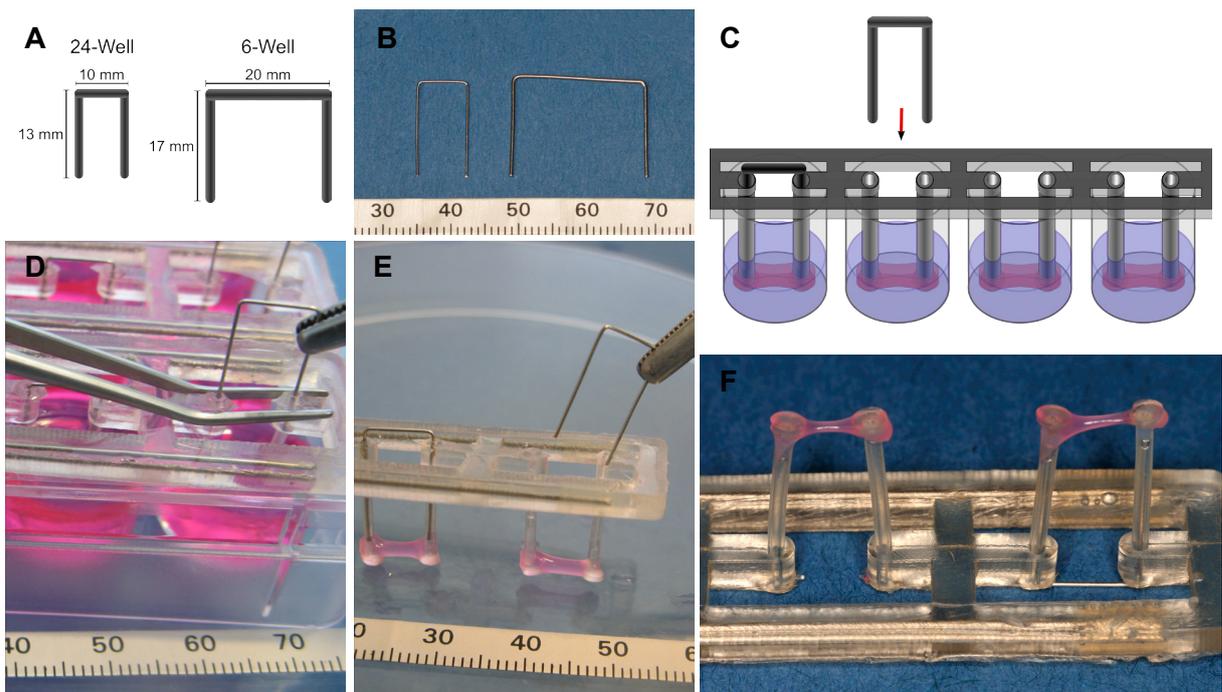


Abb. 2.6: Erhöhung der Nachlast. A und B: Metallbügel; C-E: Einführung der Edelstahlbügel in die Silikonschläuche, F: EHTs an Silikonmatte ohne (links) und mit akuter Nachlasterhöhung (rechts).

2.4.7 Positivkontrollen

Zur Einschätzung der Auswirkungen der Nachlasterhöhung wurden pro Charge EHTs, d. h. Zellen aus derselben Präparation und Kultivierung in derselben 24-Well-Schale, zwei Gruppen von pharmakologisch induzierten Positivkontrollen mitgeführt. Abb. 2.7 zeigt die typische Verteilung der Gruppen in einer 24-Well-Schale:

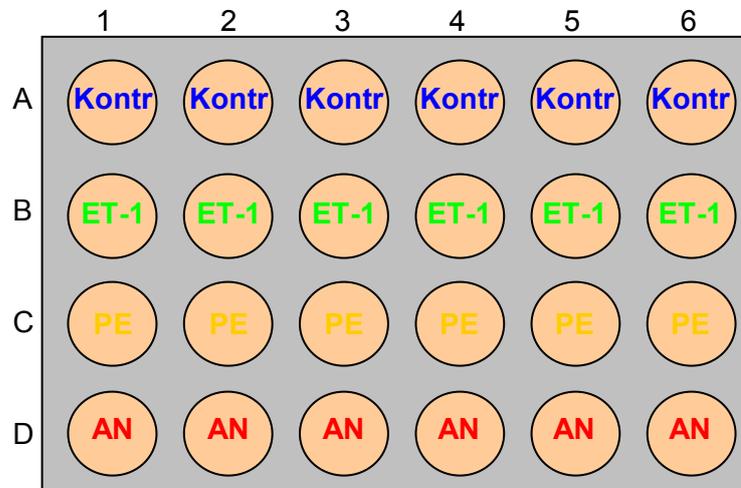


Abb. 2.7: Typische Belegung einer 24-Well-Platte, schematische Darstellung. Kontr: Kontrolle; ET-1: Endothelin-1; PE: Phenylephrin; AN: Akute Nachlasterhöhung.

2.4.7.1 Endothelin-1

Eine Gruppe EHTs wurde mit 5 nM Endothelin-1 (ET-1; Sigma-Aldrich®) behandelt. Endothelin-1 wurde nach Herstellerangaben in Aqua ad injectibilia gelöst und als Stammlösung mit einer Konzentration von 10 µM bei -80 °C aufbewahrt. Es wurde direkt in das Zellkulturmedium der zu behandelnden EHTs gegeben.

2.4.7.2 Phenylephrin

Eine Gruppe EHTs wurde mit 20 µM Phenylephrin (PE; *(R)-(-)-Phenylephrine hydrochloride*, Sigma-Aldrich®) behandelt. Phenylephrin wurde vor jeder Anwendung frisch eingewogen, in Aqua ad injectibilia gelöst und durch einen Spritzenfilter mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert. (Filtropur S 0,2, Sarstedt®). Es wurde direkt in das Zellkulturmedium gegeben.

2.4.8 Analyse der Kontraktibilität von EHTs

2.4.8.1 Automatisierte Messung unter sterilen Bedingungen

Ein wichtiger Grund für die Miniaturisierung des Modells war die Möglichkeit der objektiven Messung der EHTs bezüglich Parameter wie Kontraktionskraft und Kontraktions- bzw. Relaxationszeit im Verlauf der Kulturzeit. Dies ermöglichte ein in unserem Institut für das 24-Well-Format entwickeltes Messsystem. Diese Messapparatur bestand aus einer

2 Material und Methoden

Zellkulturschrank-ähnlichen Einheit, in der Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie die Gaszusammensetzung regulierbar waren. Der Deckel dieser Einheit bestand aus einer Glasplatte, über der sich eine Basler-Kamera befand, welche an einem x-y-z-System montiert und über einen PC ansteuerbar war. Als Lichtquelle für die einzelnen EHTs dienten LEDs, die unter jedem Well angebracht waren. Die Beleuchtung wurde mit der Aufnahme synchronisiert, um ein Erwärmen des Mediums durch dauerhafte Lichteinwirkung zu vermeiden (Abb. 2.8).

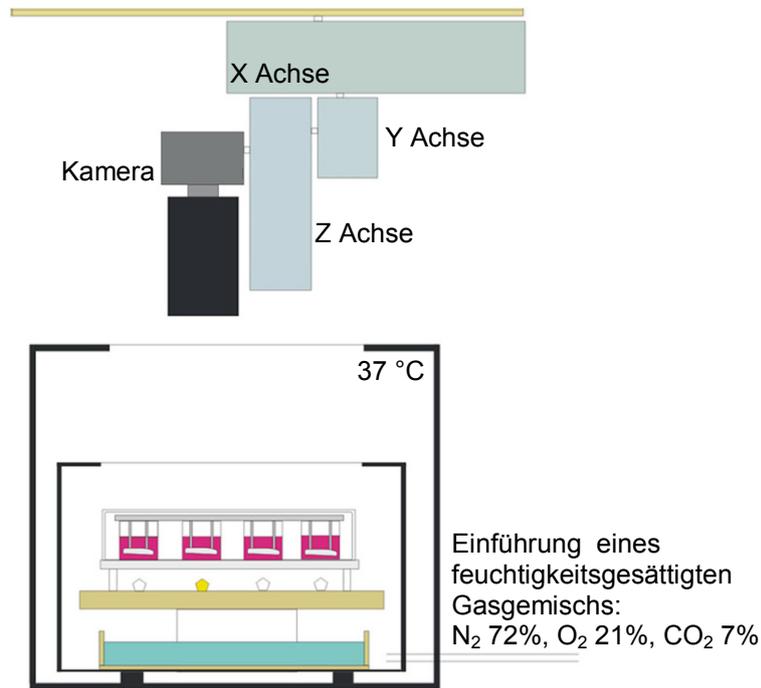


Abb. 2.8: Videooptische Messapparatur, schematische Darstellung.

Dargestellt ist das x-y-z-System mit der Kamera. Darunter befindet sich die Zellkulturschrank-ähnliche Einheit, darin die Zellkulturschale, welche von unten durch LEDs beleuchtet wird.

Die videooptischen Messungen fanden mit Hilfe einer eigens programmierten Software statt. Das Programm basierte dabei auf dem Prinzip der Figurerkennung und setzte so automatisch Messpunkte (angezeigt durch blaue Quadrate, Abb. 2.9) am oberen und unteren Ende des kontrahierenden EHTs. Der sich verändernde Abstand zwischen diesen Messpunkten wurde von der Software bestimmt und über die Aufnahmezeit festgehalten. Basierend auf der Abstandsänderung der Silikonschläuche und deren elastischen Eigenschaften wurde die Kontraktionskraft durch das Programm berechnet (siehe 2.4.8.2, S. 28). So wurden ferner Durchschnittswerte für die Kraft, die Frequenz sowie die Kontraktions- und Relaxationszeit errechnet (siehe Abb. 2.10).

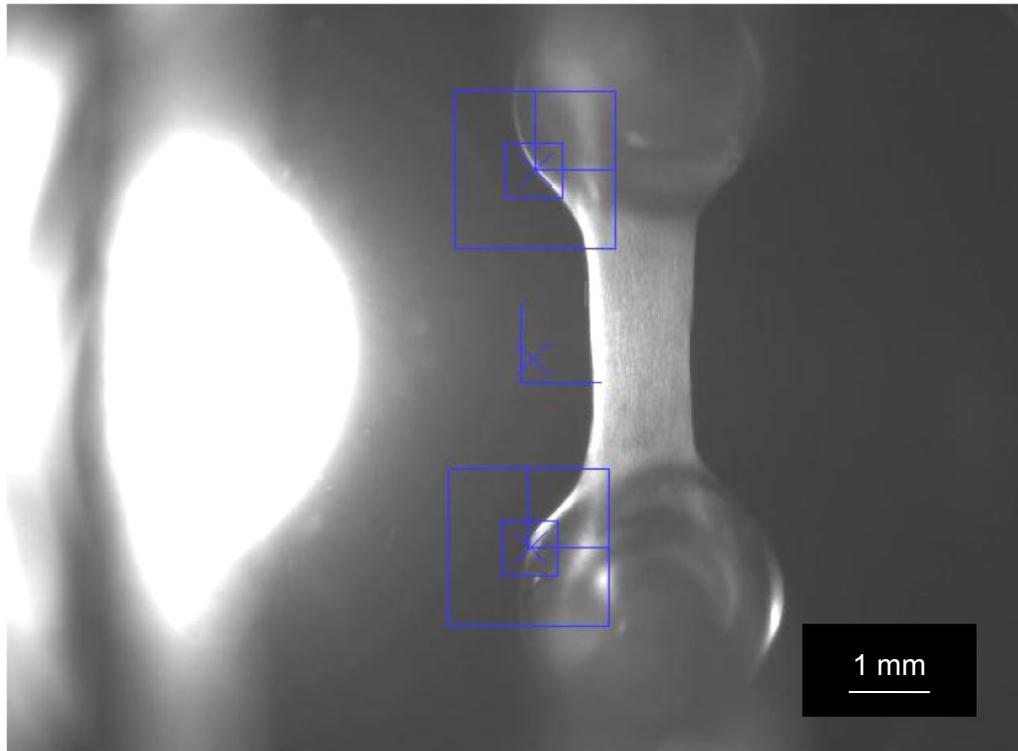


Abb. 2.9: Durch die Kamera aufgenommenes Bild zur Kontraktionsanalyse.

Gezeigt ist das durch die Kamera aufgenommene Bild eines Wells der Zellkulturschale mit einem EHT in der Aufsicht. Die blauen Quadrate kennzeichnen die Messpunkte, die durch die Software gesetzt wurden. Bei der Kontraktion des EHTs verringerte sich der Abstand der Messpunkte. Aus dieser Längenänderung wurde die Kraftentwicklung berechnet.

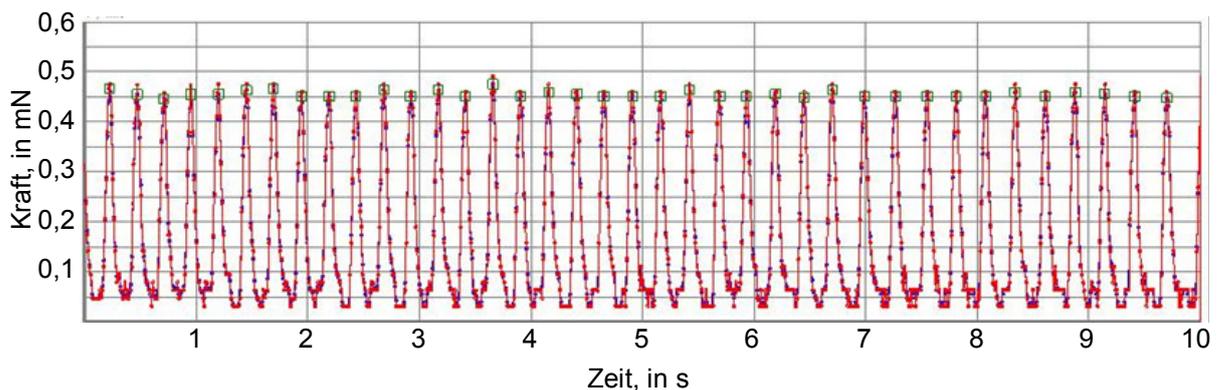


Abb. 2.10: Während der Messung aufgezeichnetes Kontraktionsmuster. Die Kraft ist gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen. Das grüne Quadrat zeigt die von der Software erkannte stärkste Kraftentwicklung an, welche in die Kalkulation der durchschnittlichen Kontraktionskraft eingeht.

2.4.8.2 Korrelation von Auslenkung der Silikonschläuche und Kraftentwicklung

Um eine Korrelation zwischen Auslenkung der Silikonschläuche und Kraftentwicklung zu ermöglichen, musste der Elastizitätsmodulus (Young Modul) experimentell ermittelt werden. Der Elastizitätsmodulus ist eine Materialkonstante, die in der von Vandenburg entwickelten Formel (Abb. 2.11), die der Berechnung der Kraft in den oben genannten Messapparaturen

2 Material und Methoden

zugrunde liegt, eine Beziehung zwischen der Kraft (F) und der Auslenkung des Silikonschlauches (δ) herstellt (Vandenburg et al., 2008):

$$F = \frac{3EI\delta}{L^3}$$

, $\delta \rightarrow$ Auslenkung des Silikonschlauches, mm

, $L \rightarrow$ Länge des Silikonschlauches, mm

, $I \rightarrow$ Flächenträgheitsmoment mit $I = 0,25\pi(R^4 - r^4) \text{ mm}^4$

dabei bezeichnet R den Außenradius und r den Innenradius des Silikonschlauches (siehe Piktogramm)

, $F \rightarrow$ Kraft, N

, $E \rightarrow$ Elastizitätsmodulus, mN/mm^2

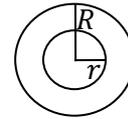


Abb. 2.11: Vandenburg'sche Formel, mit Piktogramm des Silikonschlauches im Querschnitt

Für den Versuch wurde eine Silikonhalterung vertikal in einer Plexiglasklemme fixiert. Die Klemme konnte durch eine Gewindeschraube in ihrer Höhe justiert werden und hatte an ihrem unteren Ende einen Stift, der Kontakt zu einer Feinmessuhr (1 mm) herstellte, mit der sehr feine Höhenänderungen der Klemme gemessen werden konnten. Zur Messung der Auslenkung wurde ein waagrechter Metallzeiger aufgestellt und das Zentrum eines Silikonschlauches auf diesen Zeiger ausgerichtet. Nun konnten Gewichte an den Silikonschlauch gehängt werden und erneut das Zentrum des nun gebogenen Schlauchs auf den Zeiger ausgerichtet werden. Die Differenz zwischen Startposition und Endposition, abgelesen an der Feinmessuhr, konnte als Auslenkung (δ) bei definierter Gewichtskraft (F) festgehalten werden.

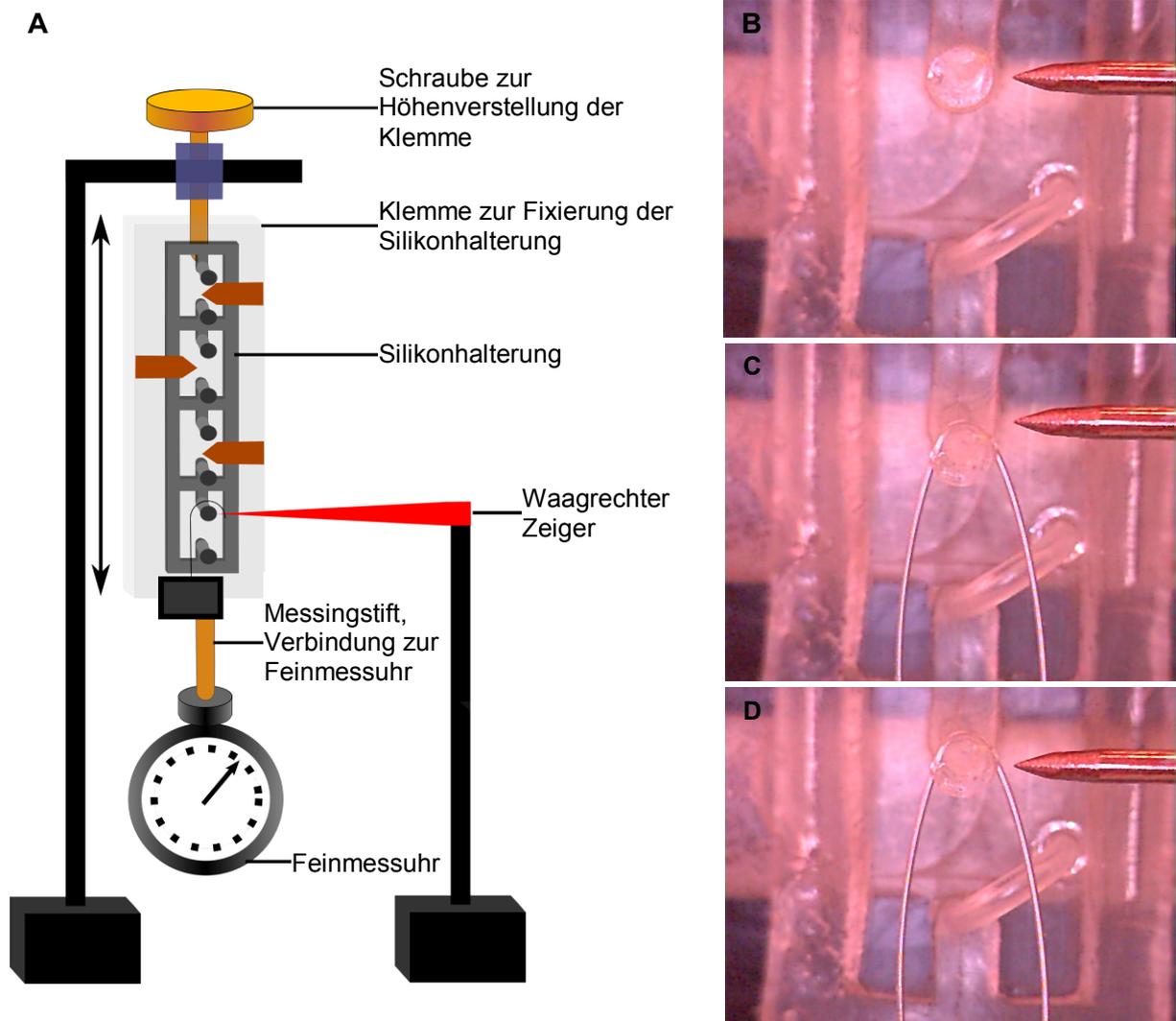


Abb. 2.12 Messung der Auslenkung der Silikonschläuche. A: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus; B: Silikonschlauch vor Beginn der Messung, zentriert auf den Messzeiger; C: Angehängtes Gewicht flektiert den Schlauch; D: Erneute Adjustierung der Klemme mit Zentrierung des Silikonschlauchs auf den Zeiger.

2.4.9 Analyse der Stoffwechselaktivität der EHTs

2.4.9.1 Blutgasanalyse

EHTs, die keine ausreichende Aktivität zeigten, sollten nach Möglichkeit nicht in die Folgeversuche eingehen. Neben den Untersuchungen zu Kontraktilität (siehe 2.4.8.1) wurde der Stoffwechsel der EHTs in Bezug auf Glukoseverbrauch untersucht. Hierzu wurden 500 µl Zellkulturmedium, dem ein EHT 24 Stunden exponiert war, mit einer sterilen Omnifix®-F 1 ml-Spritze (Braun) entnommen und in einem Blutgasanalysegerät für die klinische Routine (ABL90 FLEX, Radiometer GmbH) analysiert.

2.4.9.2 *Bioluminescence imaging* (BLI) - EHTs mit Luciferase-Aktivität

Aus einer Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie (Prof. Dr. Schrepfer) ergab sich die Möglichkeit, EHTs aus neonatalen Ratten einer mittels Genfallentechnik erzeugten transgenen Rattenlinie mit ubiquitärer Expression der Glühwürmchen-Luciferase unter der Kontrolle des ROSA 26 Promotors zu generieren (Kisseberth et al., 1999). Die Glühwürmchen-Luciferase katalysiert die Reaktion von D-Luciferin mit ATP (Adenosintriphosphat) und Magnesiumionen zu D-Luciferyl-Adenosinmonophosphat. Nach Oxigenierung und Decarboxylierung entsteht energetisch angeregtes Oxyluciferin, was diese Energie durch Abstrahlung von Photonen abgibt (Abb. 2.13).

2 Material und Methoden

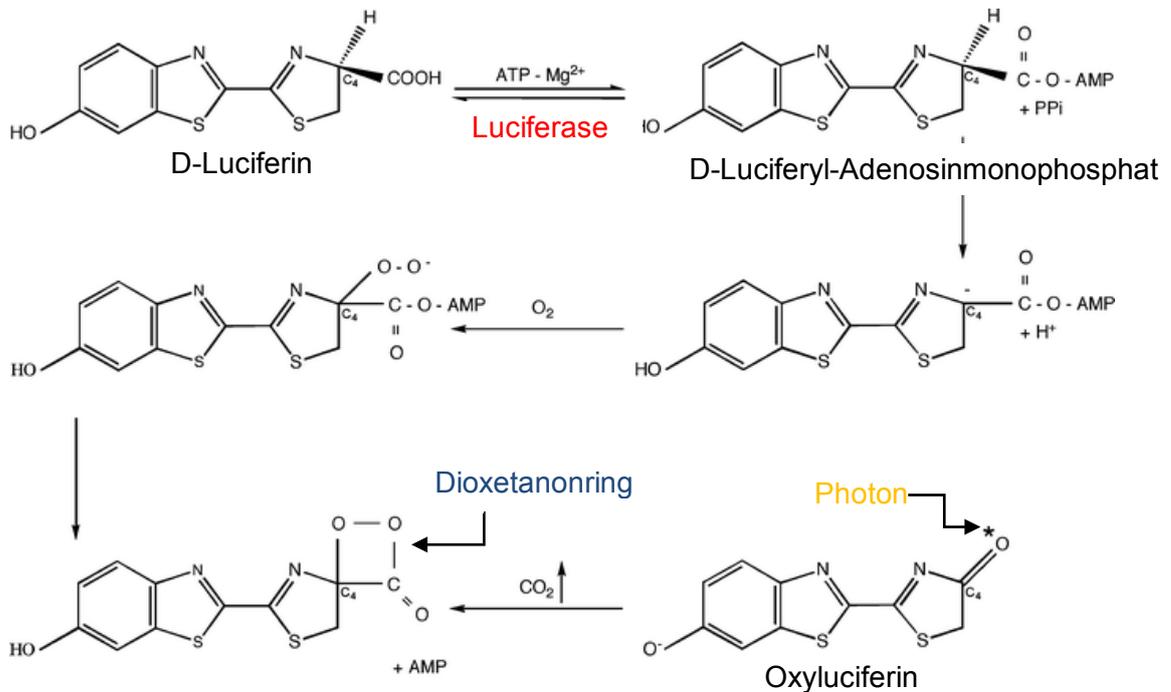


Abb. 2.13: Luciferase-Reaktion. Gezeigt ist die durch die Luciferase katalysierte Reaktion von D-Luciferin mit ATP und Magnesiumionen zu einem instabilen D-Luciferyl-AMP, welches durch Deprotonierung, Oxigenierung und Abspaltung von AMP einen Dioxetanonring bildet. Das Aufbrechen dieser instabilen Ringstruktur führt zur Decarboxylierung und der Photonemission (Fraga, 2008).

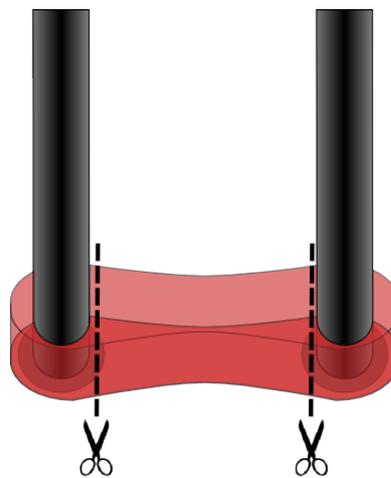
Im Verlauf des Versuchs wurden die Kontrollgruppe und die Gruppe mit akuter Nachlasterhöhung an Tag 0, Tag 2 und Tag 5 der Intervention mit 4,5 µg/ml D-Luciferin in klarem DMEM für kurze Zeit inkubiert und mit einer *Charged-Coupled-Device*-Kamera (IVIS200[®], Caliper) bis zum Erreichen der maximalen Signalintensität, ausgedrückt als Photonen pro Sekunde pro Quadratcentimeter pro Steradian (photons/s/cm²/sr), gemessen. Zur Messung mussten die Metallklammern für kurze Zeit entfernt werden, sie wurden sofort nach Abschluss der Messung wieder unter sterilen Bedingungen eingeführt. Da ATP als unbedingte Energiequelle in der Luciferasereaktion benötigt wird, D-Luciferin im Überschuss zugegeben wurde und die Luciferase dank ubiquitärer Expression ebenfalls im Überschuss vorlag, konnte über diesen Versuch indirekt eine Aussage über den Energiehaushalt bzw. die ATP-Reserven der EHTs getroffen werden.

2.5 Histologie

Im Laufe der Experimente ließen sich Kooperationen mit dem Institut für Pathologie unter Prof. Dr. Guido Sauter sowie dem Institut für Neuropathologie unter Prof. Dr. Markus Glatzel einrichten. Deren histologische Labore übernahmen viele der Arbeitsschritte. Speziell die Qualität der im Folgenden beschriebenen immunhistologischen Färbungen ist der Expertise der Mitarbeiter der genannten Institute zu verdanken.

2.5.1 Herstellung histologischer Präparate

Zur Herstellung histologischer Präparate wurden die EHTs zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und für 24 Stunden bei 4 °C in Roti-Histofix (Carl Roth®) fixiert. Anschließend konnten sie von den Silikonhalterungen geschnitten werden, so dass ausschließlich das Gewebe zwischen den Schläuchen gewonnen wurde (Abb. 2.14).



**Abb. 2.14: Probengewinnung,
schematische
Darstellung.**

Die fixierten Gewebe wurden in Einbettkassetten überführt und in einer automatischen Entwässerungsmaschine nach dem folgenden Protokoll entwässert:

Tabelle 2.1: Protokoll Entwässern

	Substanz	Zeit
1.	Formalin	1h30
2.	Formalin	1h30
3.	Alkohol 70%	1h30
4.	Alkohol 80%	1h30
5.	Alkohol 96%	1h30
6.	Alkohol 100%	1h00
7.	Alkohol 100%	1h00
8.	Alkohol 100%	2h00
9.	Xylol	1h30
10.	Xylol	1h30
11.	Paraffin (41 °C)	2h00
12.	Paraffin (41 °C)	2h00

Im letzten Schritt der Entwässerung wurden die Gewebe in 41 °C warmes Paraffin getaucht. Mithilfe einer Paraffinausgießstation (Leica® EG1150H) wurde der Boden vorgewärmter Metallformen mit flüssigem Paraffin bedeckt und die Gewebestückchen exakt darin platziert. Es wurden Gewebe senkrecht eingebettet, um Querschnitte sowie waagrecht, um Längsschnitte zu erzeugen. Nach Aufsetzen eines Einbettrings wurde die gesamte Form mit Paraffin aufgefüllt und zum Abkühlen auf eine Kühlplatte (Leica® EG1150C) gestellt. Als Paraffinblock konnten die Proben mehrere Wochen aufbewahrt werden. Um Schnitte anzufertigen, wurden die Paraffinblöcke aus ihren Formen herausgelöst, mit der Schneidefläche nach unten auf einer Kühlplatte bei -5 °C durchgekühlt und in ein Rotationsmikrotom (Leica® RM2125 RTS) eingespannt. Es wurden 4 µm dicke Schnitte erzeugt, die in ein 45 °C warmes Streckbad überführt wurden. Hier dehnte sich das Paraffin aus und es war möglich, einen faltenfreien Schnitt auf SuperFrost® Plus Objektträger aufschwimmen zu lassen.

2.5.2 Entparaffinieren

Vor Beginn der Färbungen mussten die Proben entparaffiniert werden. Dazu wurden sie für 12 Stunden bei 40 °C im Heißluftofen senkrecht stehend erwärmt, so dass überflüssiges Paraffin ablaufen konnte. Es folgte die Entparaffinierung in Roti-Histol® (96 – 98% Limonenlösung, Xylol-Ersatz) und das Wässern durch eine absteigende Ethanolreihe (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Protokoll Entparaffinieren

Substanz	Zeit
Roti-Histol I	10 min
Roti-Histol II	10 min
Roti-Histol III	10 min
100% Ethanol I	5 min
100% Ethanol II	5 min
96% Ethanol I	5 min
96% Ethanol II	5 min
75% Ethanol I	5 min
75% Ethanol II	5 min
3 x Aqua bidest	spülen

2.5.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Nach dem Entparaffinieren und Wässern der Proben wurden sie mit Hämalaun- und Eosin-Lösung gefärbt, durch eine aufsteigende Ethanolreihe und erneutem Roti-Histo[®]-I-Bad abschließend entwässert (Tabelle 2.3). Nach dem Eindeckeln mit Eukitt[®] erfolgte die mikroskopische Darstellung mit einem Zeiss[®] Axioplan Lichtmikroskop. Die Aufnahmen wurden mit einer Zeiss[®] Axiocam Kamera gemacht (Abb. 2.15).

Tabelle 2.3: Protokoll HE-Färbung

Substanz	Zeit
Hämalaunlösung*	20 min
Leitungswasser	fließend
Eosinlösung**	10 min
Aqua bidest.	spülen
96 % Ethanol I	spülen
96 % Ethanol II	spülen
100 % Ethanol I	spülen
100 % Ethanol II	spülen
Roti-Histol	3 – 5 min
Eindeckeln mit Eukitt [®]	

2 Material und Methoden

*Hämalaunlösung nach Mayer

1 g Hämatoxylin in 1000 ml aqua dest gelöst, 0,2 g NaIO_3 und 50 g $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$
50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure eingerührt

**Eosinlösung (0,1%)

0,5 g Eosin gelblich (Eosin Y)
ad. 500 ml aqua

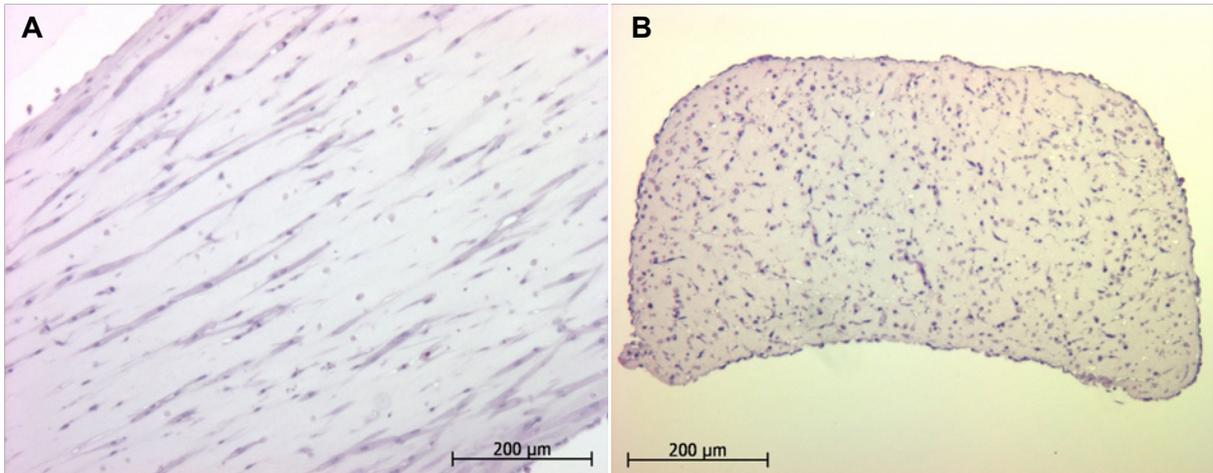


Abb. 2.15: HE-Färbung. A: EHT im Längsschnitt, 10x vergrößert. B: EHT im Querschnitt, 10x vergrößert.

2.5.4 Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie werden durch spezifische Antikörper bestimmte Proteine sichtbar gemacht. Zur Verwendung kamen Primärantikörper mit spezifischen Bindungsstellen für das Zielprotein und Sekundärantikörper, die gegen die Primärantikörper gerichtet waren. An die Sekundärkörper war eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, die nach Zugabe der Substrate 3,3'-Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid (DAB bzw. H_2O_2 , enthalten in *Ventana® ultraView Universal DAB Detection Kit*) eine Farbreaktion katalysierte. Diese Methode hatte den Vorteil, dass sie, bei gegebener Spezifität des Antikörpers, eine Aussage über Lokalität, Qualität und Quantität des untersuchten Proteins zuließ (Abb. 2.16). Bei der Fixierung von Gewebe mit Formalin kommt es zur Quervernetzung der Gewebsproteine untereinander oder der Gewebsproteine mit Nukleinsäuren über Hydroxymethylen-Brücken. Dabei können für die Erkennung durch den Primärantikörper notwendige Epitope verdeckt oder zerstört werden. Es muss deshalb meist eine Epitop-Demaskierung durchgeführt werden.

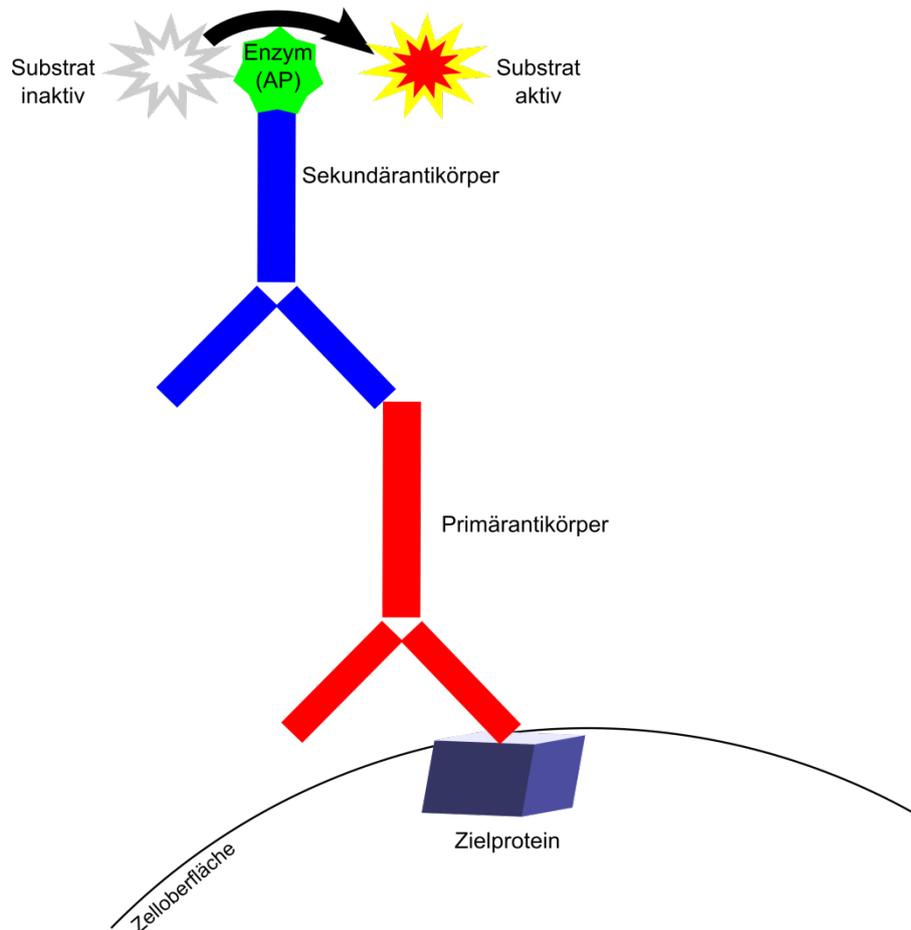


Abb. 2.16: Immunhistochemie, schematische Darstellung.

Um eine ausreichende Spezifität zu gewährleisten, wurden die im Folgenden beschriebenen Färbungen zunächst für 4 µm dicke Paraffinschnitte adulter Rattenherzen optimiert. Dazu wurden mithilfe des Ventana® BenchMark® XT (Roche) Färbeautomaten 30 verschiedene Vorbehandlungen und Antikörperverdünnungen getestet. Die Kombination aus Vorbehandlung und Antikörperverdünnung, die auf den adulten Rattenherzen zum besten Farbeergebnis führte, wurde als Standard für Färbungen der EHTs festgelegt.

2.5.4.1 Dystrophin-Färbung

Dystrophin ist ein Protein von 3685 Aminosäuren und das Produkt des längsten jemals charakterisierten Gens (2,4 Megabasen, *homo sapiens*). Es dient in Muskelzellen der Verankerung kontraktile Filamente in der Zellmembran. Dies gelingt über die Bindung Aktins einerseits und andererseits des intrazellulären Teils von beta-Dystroglycan, einem Transmembranprotein, das wiederum das extrazelluläre alpha-Dystroglykan bindet, welches mit der Basalmembran verbunden ist (Roberts, 2001). Dystrophin ist muskelspezifisch und dicht unter der Zellmembran lokalisiert, was es zu einem guten Marker für Muskelzellgrenzen macht.

2 Material und Methoden

Als Primärantikörper wurde ein „*mouse anti-dystrophin monoclonal antibody*“ (Millipore, MAB1645) nach folgendem Protokoll verwendet:

Tabelle 2.4: Protokoll Dystrophin-Färbung

Dystrophin-Färbung
Primärantikörperverdünnung: 1:200
Epitop-Demaskierung: 60 min EDTA-Puffer, pH 8,0
Sekundärantikörper: Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana Roche)

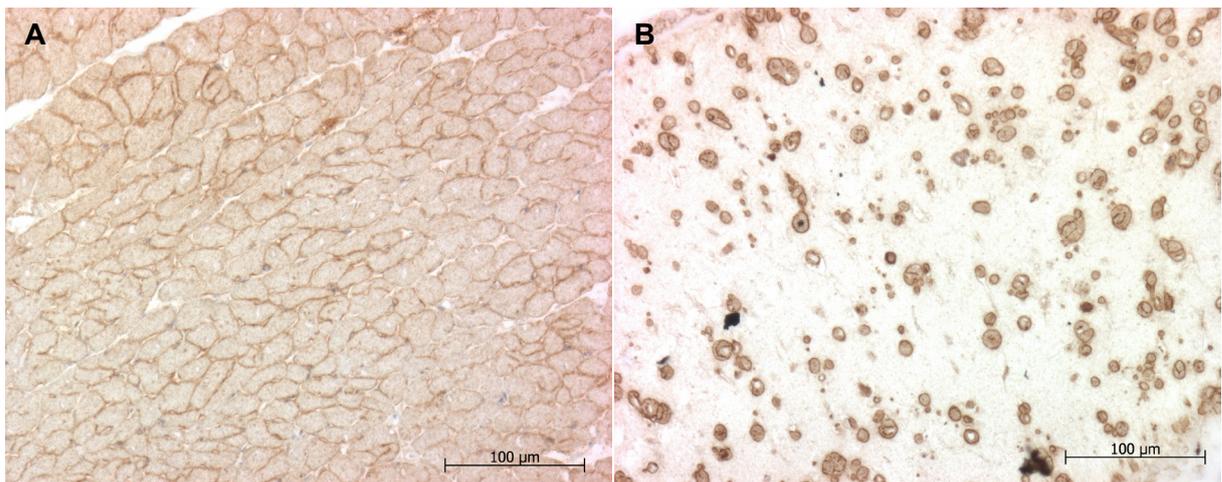


Abb. 2.17: Dystrophin-gefärbte Paraffinschnitte. A: Adultes Rattenherz, 20 x vergrößert. B: EHT im Querschnitt, 20 x vergrößert.

Die Färbungen mit dem Dystrophinantikörper sollten für eine Bestimmung der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten verwendet werden. Kardiomyozyten haben in Kontraktionen naturgemäß eine wesentlich größere Querschnittsfläche, daher wurden alle EHTs, die diesem Verfahren zugeführt wurden, vor der Fixierung 10 min in 30 mM 2,3-Butan-Dion Monoxim (BDM; in PBS) inkubiert, um zu gewährleisten, dass die Kardiomyozyten in den EHTs vor der Fixierung vollständig relaxiert waren.

2.5.4.2 ANP-Färbung

Die natriuretischen Peptide, zu denen ANP (*atrial natriuretic peptide*), BNP (*brain natriuretic peptide*) und CNP (*C-type natriuretic peptide*) gehören, sind Peptidhormone, die als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System das Herz vor zu hoher Volumenbelastung schützen. Sie erhöhen die glomeruläre Filtrationsrate und vermindern die Salzretention (Nussey und Whitehead, 2001). Bei einem Dehnungsreiz der Vorhofmuskelzellen werden ANP (vorwiegend in den beiden Vorhöfen) und BNP (vorwiegend in den Ventrikeln) sezerniert. Bei einer Herzhypertrophie führt die dauerhafte Belastung der Herzmuskelzellen zu einer starken Ausschüttung der Hormone, weshalb BNP

2 Material und Methoden

in der Diagnostik der Herzinsuffizienz verwendet wird (Falcao et al., 2004). ANP wird normalerweise von den Ventrikelkardiomyozyten nicht oder nur sehr gering exprimiert. Unter hypertrophen Bedingungen steigt die Sekretion aber auch hier, so dass es sich gut als Markerprotein für Ventrikelhypertrophie eignet. In den aktuellen Herzinsuffizienz-Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) wird die Bestimmung von MR-pro-ANP (*midregion-pro-ANP*, ein Vorläuferprotein von ANP) daher als klinischer Parameter der Herzinsuffizienz empfohlen (McMurray et al., 2012). Die Analyse der Querschnitte erfolgte mittels der Software ImageJ. Als Primärantikörper wurde „ANP (23/1): sc-80686“ (Santa Cruz®; Isotyp Maus, monoklonal) nach folgendem Protokoll verwendet:

Tabelle 2.5: Protokoll ANP-Färbung

ANP-Färbung
Primärantikörperversdünung: 1:500
Epitop-Demaskierung: 60 min Citrat-Puffer, pH 6,0
Sekundärantikörper: Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana Roche)

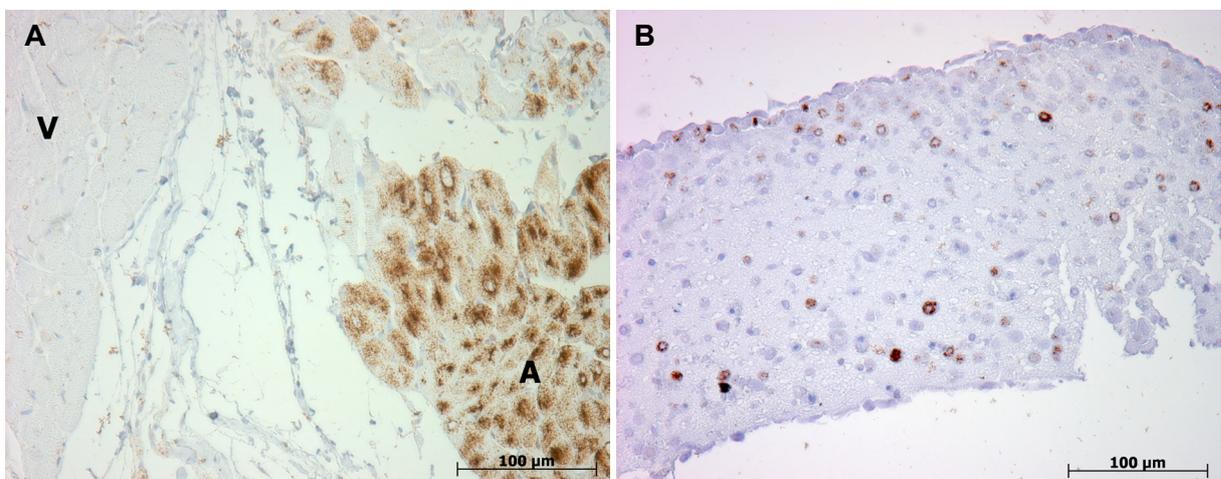


Abb. 2.18: ANP-Färbung. A: Herz einer erwachsenen Ratte. Gezeigt ist die Grenze zwischen Kammer (V) und Vorhof (A), 20x vergrößert. B: EHT im Querschnitt, 20x vergrößert.

2.5.4.3 Kollagen-Färbung

Wie in der Einleitung erwähnt, ist ein Charakteristikum der pathologischen Herzhypertrophie die Zunahme des Bindegewebes – genannt Fibrose. Der Herzmuskel versucht die mechanische Belastung durch Produktion steifer Bindegewebsfasern zu kompensieren. Er verliert dadurch zwar Kontraktilität, verhindert aber eine gefährliche Überdehnung. Der Hauptbestandteil des fibrösen Bindegewebes ist Kollagen I, das aus drei Polypeptidketten (zwei alpha1- und eine alpha2-Kette) besteht, die sich zu einer stabilen Tripelhelix umeinander legen (Hein und Schaper, 2001). Die hochreptitiven Aminosäuresequenzen aller Kollagene (ein sehr häufiges Sequenzmotiv ist beispielsweise Glycin-Prolin-Hydroxyprolin)

2 Material und Methoden

erschweren die Suche nach einem Antikörper, der ausschließlich Kollagen I erkennt. Der im Folgenden verwendete Antikörper reagiert mit der fertigen Tripelhelix. Durch die räumliche Anordnung der Polypeptidketten entstehen Epitope, die spezifisch für Kollagen I sind. Als Primärantikörper wurde „*Collagen I antibody (ab34710)*“ (Abcam®; Isotyp Hase, polyklonal) nach folgendem Protokoll verwendet:

Tabelle 2.6: Protokoll Kollagen-Färbung

Kollagen-Färbung
Primärantikörperversdünung: 1:200
Epitop-Demaskierung: 60 min Citrat-Puffer, pH 6,0
Sekundärantikörper: Ultraview Universal DAB Detection Kit (Ventana Roche)

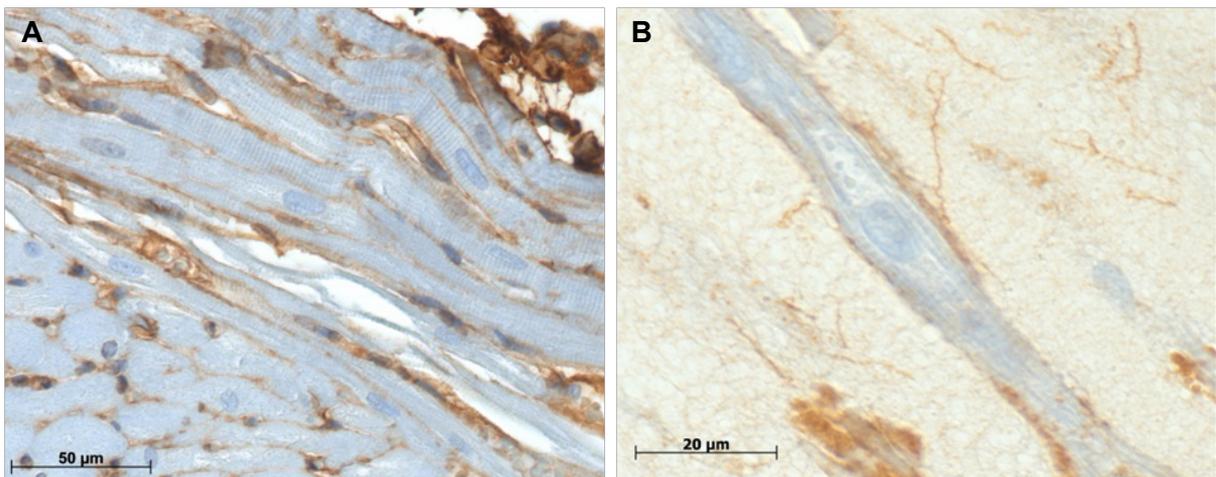


Abb. 2.19: Kollagen-Färbung. A: Adultes Rattenherz, 40x vergrößert. B: EHT im Längsschnitt, 100x vergrößert.

2.5.5 Immunfluoreszenz

Ähnlich wie bei der Immunhistochemie ist dieses Verfahren in der Lage, bestimmte Proteine mittels Antikörper in Zellen oder Geweben sichtbar zu machen. Dabei kommt es allerdings nicht zu einer enzymatischen Farbreaktion, sondern es werden Sekundärantikörper mit gekoppelten Farbstoffen verwendet, die sich durch Licht bestimmter Wellenlängen anregen lassen und einen Teil des Lichts als längerwellige Strahlung wieder abgeben. Durch den Einsatz verschiedener Filter lässt sich diese längerwellige Strahlung als spezifisches Signal einfangen.

Für die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden die EHTs im Ganzen (*whole mount*) gefärbt. Nachdem sie über Nacht bei 4 °C mit Histofix fixiert wurden, erfolgte ein Waschschrift in TBS (15 min). Anschließend wurden die Präparate 24 Stunden in einer Blocklösung (TBS 0,05 M, pH 7,4, 10% FCS, 1% BSA, 0,5% Triton X-100) bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert,

2 Material und Methoden

um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern. Nach dem Blocken wurde der erste Antikörper (2.3.1, S.16) in einer entsprechenden Lösung (TBS 0,05 M, pH 7,4, 1% BSA, 0,5% Triton X-100) zu den EHTs gegeben und ebenfalls 24 Stunden bei 4 °C unter Bewegung inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBS über Nacht konnte der zweite Antikörper (2.3.2, S. 17) sowie DRAQ5™ (DR50050; *Biostatus Limited*; 1:1000) zur Kernfärbung analog zum ersten Antikörper inkubiert werden. Nach einem letzten Waschschrift über Nacht wurden die Präparate mit dem wasserlöslichen, nicht fluoreszierenden Eindeckmedium Fluoromount-G auf Objektträgern mit Vertiefungen eingedeckt und am konfokalen LASER-Mikroskop untersucht (vgl. Abb. 3.14, S. 64).

2.5.6 Zellgrößenbestimmung

Um eine Aussage über eine mögliche Zellgrößenzunahme machen zu können, wurden EHT-Querschnitte, wie unter 2.5.4.1 beschrieben, Dystrophin-gefärbt. Mit der Axiovision Software (Zeiss®) und dem Modul Autmess (Zeiss®) wurde eine halbautomatische Segmentierung durchgeführt. Der Untersucher war dabei vollständig verblindet: Nach Einrichtung eines 200 µm x 300 µm Messrahmens parallel zum Rand des Objekts wurde eine Kantenverbesserung und ein Sigmafilter angewandt, um die automatische Segmentierung zu präzisieren. Zuletzt mussten fehlerhafte Segmentierungen aufgrund unvollständiger Färbung der Zellmembran oder Artefakten von Hand korrigiert werden. Für jedes segmentierte Objekt wurde automatisch die Fläche berechnet. Man erhielt also die Querschnittsfläche jedes Kardiomyozyten innerhalb des Messrahmens (Abb. 2.20). In die Auswertung gingen ausschließlich Zellen mit einer Fläche $\geq 40 \mu\text{m}^2$ ein. Es wurde ausgewertet bis zu einer Gesamtzellzahl von 150 pro Gruppe.

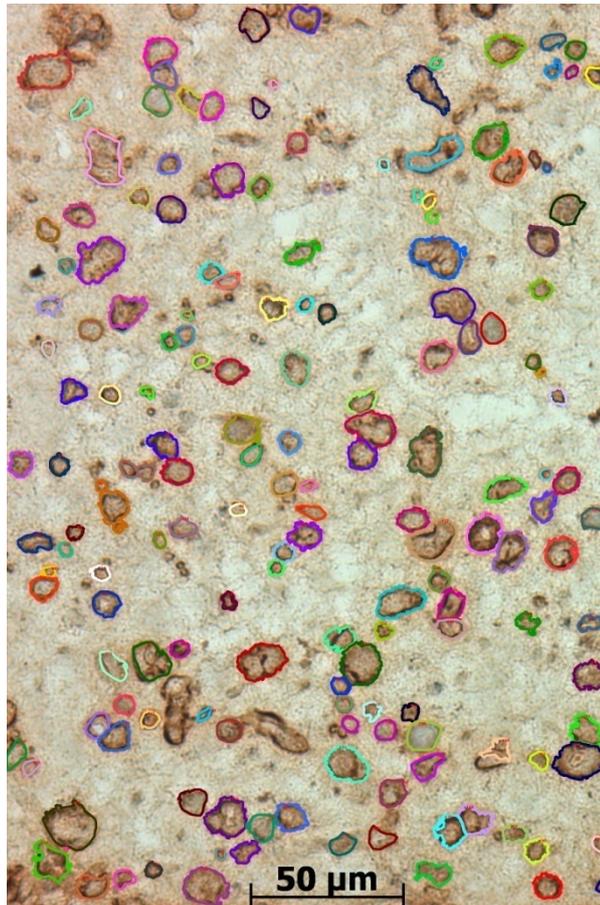


Abb. 2.20: Ergebnis der Segmentierung eines Dystrophin gefärbten EHT-Querschnitts. Die farbigen Umrandungen markieren die erkannten Querschnittsflächen der Kardiomyozyten.

2.5.7 Auswertung der ANP-gefärbten Querschnitte mittels ImageJ-Software

Zur Quantifizierung des Signals der immunhistochemischen ANP-Färbung, wurden Aufnahmen von EHT-Querschnitten (Abb. 3.12, A und B) mithilfe der ImageJ-Software (Schneider et al., 2012) mit einem Farbfiler versehen, der ausschließlich das braune Farbsignal der ANP-Färbung als gültiges Signal erkannte. So entstanden bipolare Bilder mit weißen Pixeln (ANP-Signal) vor schwarzem Hintergrund. Die durch die Software ermittelte Anzahl der weißen Pixel wurde zwischen Kontrollen und AN-EHTs verglichen (Abb. 3.12, C).

2.6 Molekularbiologie

2.6.1 Isolation von RNA mittels Säulenextraktion

Die Aufreinigung der RNA erfolgte mithilfe des Qiagen RNeasy[®] Mini Kits. Das Verfahren basiert auf Zentrifugationssäulen, die eine Siliciumdioxidmembran enthalten. Diese Membran ist in der Lage, RNA-Moleküle mit einer Länge >200 Nucleotiden zu binden. Die RNA kann anschließend mit Wasser aus den Säulen eluiert werden.

Das Gewebe wurde, wie oben beschrieben, so von den Silikonhalterungen geschnitten, dass ausschließlich das Gewebe zwischen den Schläuchen gewonnen wurde (Abb. 2.14, S. 33). Es wurde zunächst in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, aus RNeasy[®] Mini) und 20 µl Proteinase K (Qiagen) aufgenommen und bei 56 °C für 20 min bei Bewegung (350 rpm) inkubiert. Der Proteinase K-Verdau war für eine saubere Extraktion obligatorisch, da die erheblichen Proteinmengen (Fibrin) sonst die Säule verstopfen hätten. Anschließend wurde das Homogenat mit einer 100 µl Pipettenspitze durchpipettiert und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden weitere 10 µl Proteinase K hinzugefügt und die Proben bei 56 °C und Bewegung (350 rpm) für 10 min verdaut. Im Anschluss wurde jede Probe durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 2 µl Spritze durch eine sterile 23 G (0,6 mm) Kanüle homogenisiert. Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden an einer Arbeitsbank durchgeführt, die ausschließlich für RNA-Arbeiten genutzt wird und es wurden ausschließlich originalverpackte Verbrauchsmaterialien verwendet. Dadurch sollte einer Verunreinigung durch ubiquitär vorkommende RNAsen verhindert werden. Zu jeder Probe wurden nun 350 µl Ethanol hinzu gegeben und solange durchmischt, bis die Schlieren verschwunden waren. Danach wurde der gesamte Inhalt auf die Zentrifugationssäulen (RNeasy[®] Mini Spin Column, Qiagen, aus RNeasy[®] Mini) gegeben und bei 16200 g für 30 s zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer (Qiagen, aus RNeasy[®] Mini) auf die Säule pipettiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 16200 g für 30 s zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Nun wurden zwei mal 500 µl RPE-Puffer (Qiagen, aus RNeasy[®] Mini) auf die Säulen gegeben und für 30 s zentrifugiert. Anschließend wurden die Säulen in neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt bei 16200 g für 1 min zentrifugiert. Zuletzt wurden die Säulen in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 2 mal mit 20 µl RNase-freiem H₂O für 10 min inkubiert, danach 1 min mit 16200 g zentrifugiert. Das Eluat enthielt die Gesamt-RNA des eingesetzten Gewebes und konnte bei -80 °C gelagert werden.

2.6.2 Quantitative Echtzeit-PCR

2.6.2.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch mit dem NanodropTM ND-1000 (Thermo Fisher Scientific® Inc.) Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entsprach eine optische Dichte (OD) von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Als Reinheitskontrolle für die RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) sowie 230 nm (Absorptionsmaximum von organischen Salzen und Phenolaten, etc.) bestimmt und die Quotienten OD 260/OD 280 bzw. OD 260/OD 230 gebildet. Ein Wert um 2 sprach jeweils für geringe Kontamination der RNA.

2.6.2.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA (siehe 2.6.1) wurde in einer reversen Transkription in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) verwendet. Alle Schritte wurden gemäß Herstellerangaben vollzogen, wobei 100 ng bis 250 ng RNA eingesetzt wurden. Als Primer für die reverse Transkription wurden *random* RT-Primer (Applied Biosystems®, aus High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) verwendet. Am Ende der Reaktion lag die cDNA in 25 µl Reaktionsgemisch gelöst vor (Tabelle 2.7).

Reaktionsansatz Reverse Transkription

2,5 µl 10x RT Puffer
1,0 µl 25x dNTP Mix
2,5 µl 10x *random* RT-Primer
1,0 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix
0,25 µg Gesamt-RNA
ad 25 µl Nuklease-freies Wasser

Tabelle 2.7: Ablauf der reversen Transkription

Zeit	Temperatur	Beschreibung
10 Minuten	25 °C	Initiation
120 Minuten	37 °C	Reverse Transkription
5 Minuten	85 °C	Denaturierung

2.6.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die anschließende quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qPCR) wurde mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems®) laut Herstellerhandbuch durchgeführt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruhte auf der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes (*SYBR Green*®, Applied Biosystems; verwendet nach Herstellerempfehlung), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Durch die Amplifikation der cDNA mittels spezifischer Primer (vgl. 0, S. 18) erhöhte sich das abgegebene und detektierte Fluoreszenzsignal des Farbstoffs mit jedem PCR-Zyklus. Bei der Austestung von Genen, die sich als mögliche interne Standards eignen könnten, zeigte die ribosomale Untereinheit 18s die geringsten Expressionsschwankungen (siehe Anhang, S. 125) und wurde bei den folgenden qPCRs als interner Standard verwendet. Die cDNA aus der RT-PCR (siehe 2.6.2.2) wurde 1:10 mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt. Die für alle Proben gleiche eingesetzte Menge cDNA und 18s-rRNA als interner Standard ermöglichten eine sichere Quantifizierung der Expressionssignale. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software* (Applied Biosystems®) analysiert. Die Transkript-Menge wurde über den Vergleich der Ct-Werte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Die Ct-Werte des internen Standards (18s-rRNA) wurden von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert (ΔCt). Der Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen ΔCt -Wert der Interventionsgruppe abgezogen, wodurch die $\Delta\Delta Ct$ -Werte berechnet werden konnten. Die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel zeigte nun den relativen Transkript-Gehalt bezogen auf die Kontrolle an. Die beiden Normalisierungsschritte, gleiche Menge cDNA für alle Proben und 18s-rRNA als interner Standard, ermöglichten dabei eine zuverlässige Quantifizierung der Transkriptkonzentrationen.

Reaktionsansatz qPCR

5,0 µl *SYBR Green*® Master Mix

0,5 µl *forward / reverse* Primer-Pool

2,5 µl cDNA

ad 10 µl Nuclease-freies Wasser

Tabelle 2.8: Ablauf der qPCR

Zyklen	Zeit	Temperatur	Beschreibung
1	2 Minuten	50 °C	Initiatialisierung der Polymerase
	10 Minuten	95 °C	
40	15 Sekunden	95 °C	Denaturierung
	1 Minute	60 °C	Primeranlagerung, Elongation
1	5 Minuten	85 °C	Dissoziationsphase

2.6.3 Illumina© Chip Array

Für die genomweite Expressionsanalyse der EHTs wurde die Gesamt-RNA, wie unter 2.6.1 beschrieben, isoliert und die Menge und Reinheit photometrisch bestimmt. Daraufhin wurden die Proben nach Münster an das Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung übermittelt, wo die RNA in cRNA umgeschrieben wurde und auf einem *Illumina*® *RatRef-12 Expression BeadChip* die Expression von 21.519 Genen untersucht wurde. Die Datensätze wurden nach den Kriterien für eine „gute Genliste“ nach Huang da et al. (2009) kontrolliert. Die Anreicherung der Gene in bestimmten Signalwegen wurde mithilfe der Onlinedatenbank KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) analysiert (Kanehisa und Goto, 2000).

2.7 Proteinbiochemie

2.7.1 Proteinextraktion

Die Gewebestückchen wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit einem in Flüssigstickstoff gekühlten Mörser zermahlen. Nach Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer und einer TissueLyzer-Edelstahlkugel (Qiagen®) wurde die Probe mithilfe des TissueLyzers (Qiagen®) 3 x 1 min bei 20 Hz homogenisiert. Nach Entfernen der Edelstahlkugel konnten die Proben bei -80 °C gelagert werden.

Lysis-Puffer

Tris HCl (1,5 mol/l, pH 8,8)	2 ml
EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0)	1 ml
NaF (1 mol/l)	3 ml
SDS (20%)	15 ml
Glycerol	10 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml

Bei Raumtemperatur lagern. Vor Benutzung 2 µg/ml Aprotinin frisch zugeben.

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde nach der Lämmli-Methode durchgeführt. Die Proben wurden in 6 x Probenpuffer 6:1 aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einem 5% Sammelgel und einem 10% Trenngel bei 80 V für 10 min und anschließend bei 120 V in dem Mini Protean 3 Elektrophoresesystem (Bio-Rad®) in einem Laufpuffer. Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Precision Plus Protein Standard™, Dual Color, Bio-Rad).

Probenpuffer nach Lämmli (1970)

SDS	1,2 g
Glycerol	6,0 g
DTT	0,93 g
Bromphenol	6 mg
Tris HCl (0,5 M pH 6,8)	1,2 ml
Aqua bidest.	ad. 10 ml

2 Material und Methoden

Sammelgel (5%)

Acrylamid/Bisacrylamid (30%, Mix 37,5:1)	0,85 ml
Aqua bidest.	2,8 ml
Tris HCl (0,5 M, pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10%)	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,05 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamid (TEMED)	5,0 µl

Trenngel (10%)

Acrylamid/Bisacrylamid (30%, Mix 37,5:1)	3,3 ml
Aqua bidest.	4,0 ml
Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	0,1 ml
TEMED	4,0 µl

Laufpuffer

Tris	3,02 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
Aqua bidest.	ad. 1000 ml

2.7.3 Western Blot Analyse

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in dem *Mini Trans-Blot Cell System* (Bio-Rad®) im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (Protan® BA 85, Schleicher und Schuell) übertragen. Der Transfer wurde stromkonstant bei 400 mA für 120 min in Transferpuffer durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung angefärbt, um den Transfer zu kontrollieren. Die Membranen wurden vollständig in TBS-T Puffer entfärbt und anschließend zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen in einer 5%igen Milchpulver-Lösung (5% Milchpulver in TBS-T Puffer) für 1 h bei RT inkubiert. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C wurde die Membran viermal mit TBS-T für jeweils 5 min gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen mit TBST-T für jeweils 10 min entfernt und die Membran mit dem ECL-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence*, Pierce®) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde durch Fotofilme (Super X-Ray, Fuji Medical X-Ray

2 Material und Methoden

Films, Fuji Photo Film Co.) visualisiert. Die Filme wurden mit einem Flachbrettscanner eingescannt und mittels *Gene Tool software* quantifiziert.

<u>Transferpuffer</u>		<u>Ponceaurot S Lösung</u>	
Tris	3,025 g	Ponceaurot S	0,5 g
Glycin	14,4 g	Essigsäure (100%)	1 ml
Methanol	200 ml	Aqua bidest.	ad 100 ml
Aqua bidest.	ad 1000 ml		
<u>10x TBS</u>		<u>TBST</u>	
Tris	242,3 g	10x TBS	100 ml
NaCl	175,3 g	Tween 20	1 ml
Aqua bidest.	ad 2000 ml	Aqua bidest.	ad 1000 ml

2.8 Elektronenmikroskopie

Die EHTs wurden an den Silikonhalterungen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend 10 min in 30 mM 2,3-Butan-Dion Monoxim (BDM; in PBS) inkubiert. BDM verringert die intrazelluläre Kalziumkonzentration und führt so zu einer Relaxation. Anschließend erfolgte die Fixierung in 2,5%-Glutaraldehyd in PBS für 24 Stunden bei 4 °C. Die nachfolgende Anfertigung von Ultradünnschnitten und die Aufnahmen am Elektronenmikroskop wurden in Kooperation mit der HEXT Core Facility für Mauspathologie am Universitätsklinikum Eppendorf durchgeführt.

2.9 Statistische Auswertung

Die Daten werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM). Mit n wurde die Anzahl der EHTs bzw. Einzelversuche/-proben bezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels Students t-Test für ungepaarte Messungen oder, bei mehr als zwei Versuchsgruppen, mittels *One-Way-ANOVA* mit anschließendem *Dunnett's-Multiple-Comparison-Test* ermittelt. Wurden Versuchsgruppen über einen längeren Zeitraum beobachtet, erfolgte die Anwendung eines *Two-Way-ANOVA* mit anschließendem Bonferroni Nachtest. Die Analysen wurden mit der GraphPad Prism 5 Software durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant bewertet. In den Abbildungen wird das Signifikanzniveau in Form von Sternchen angezeigt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3 ERGEBNISSE

3.1 Miniaturisierung des Modells

Der ursprüngliche Grund für die Entwicklung des 6-Well Formats war die bessere manuelle Handhabbarkeit. Vor allem das Einführen der Bügel zur Nachlasterhöhung war durch die größeren Dimensionen technisch weniger aufwendig. Mit diesem frühen Modell konnten bereits Hinweise auf Hypertrophie im EHT beobachtet werden (Abb. 3.1).

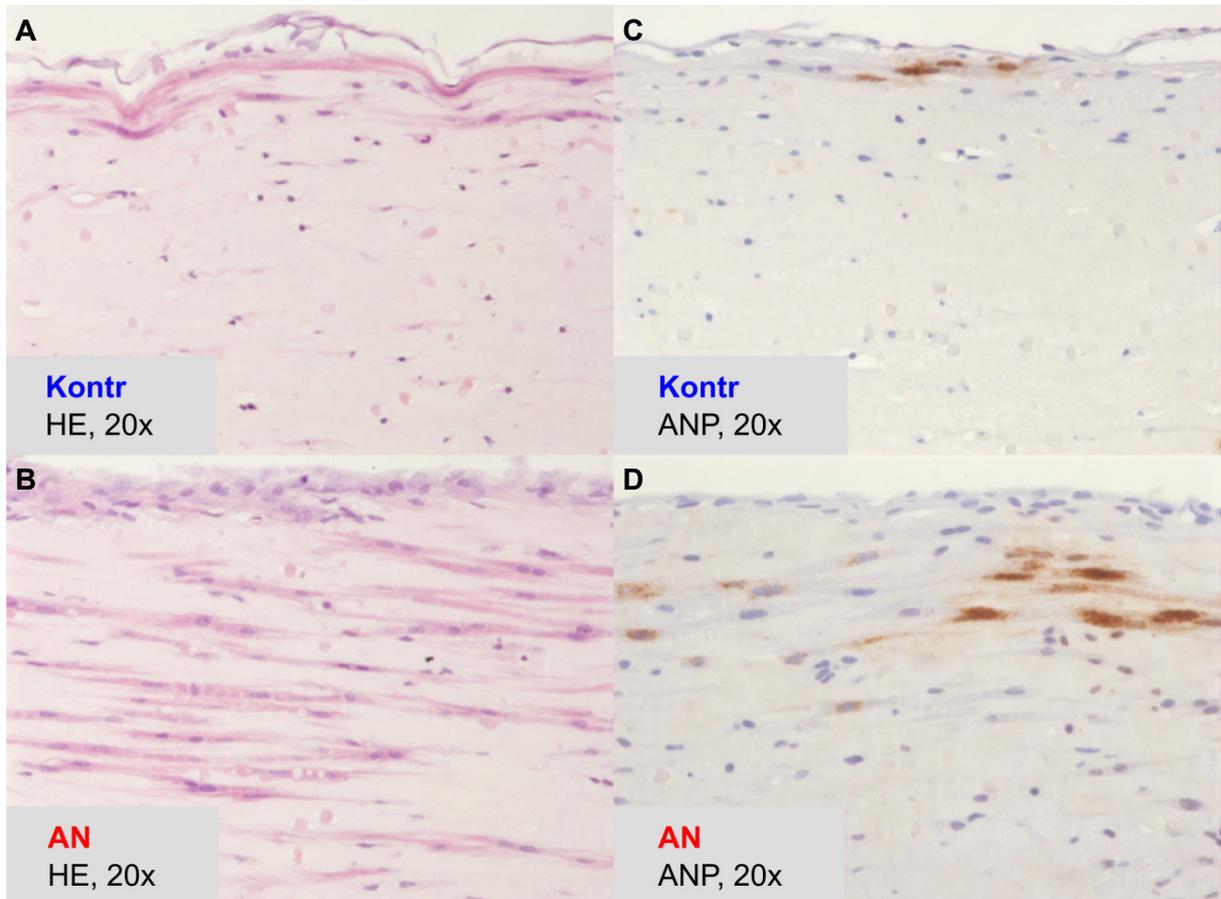


Abb. 3.1: 6-Well-EHTs im Längsschnitt, 20x vergrößert. Im Vergleich von Kontroll-EHTs (Kontr) und EHTs mit akuter Nachlasterhöhung (AN) zeigt sich eine deutliche Zunahme der Zellgrößen (A+B, HE-gefärbt) sowie eine Zunahme des ANP-Signals (C+D, ANP-gefärbt). Die Bilder wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Dr. Konrad Kölbe, Institut für Pathologie, UKE, Hamburg.

Ansonsten waren mit dem großen Modell jedoch viele Nachteile verbunden. Der Ressourcenverbrauch war wesentlich höher (siehe S. 19), was die Stückzahl und damit auch die statistische Aussagekraft limitierte. Außerdem führte die schlechte Sauer- und Nährstoffversorgung durch den großen Durchmesser zu einem Absterben der Zellen im Zentrum des EHTs (siehe Abb. 3.2). Die mit Abb. 2.15 (S. 36) verglichen relativ geringe Zelldichte im 24-Well-Format (Abb. 3.2, B und D), lässt sich am Ehesten mit der zum

3 Ergebnisse

Zeitpunkt des Versuchs üblichen Kultivierung bei 21% O₂ erklären (für alle folgenden Versuche wurden die EHTs bei 40% O₂ kultiviert).

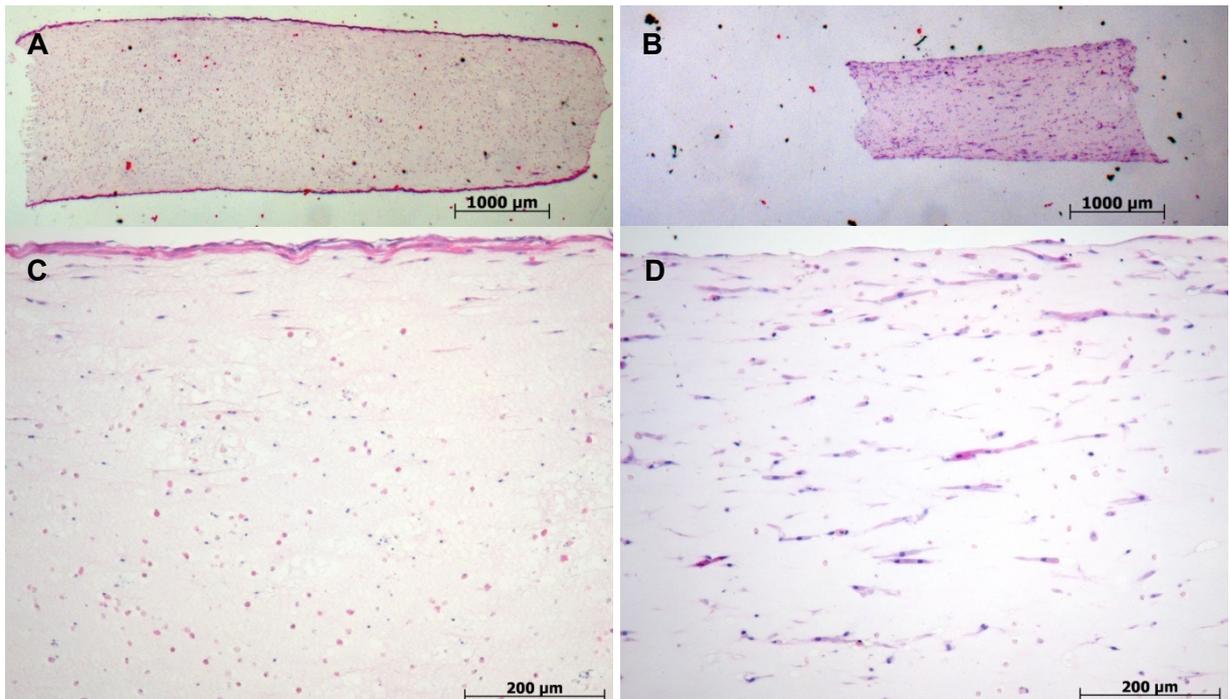


Abb. 3.2: HE-gefärbte Paraffinschnitte von 6-Well-EHTs und 24-Well-EHTs, A: Übersichtsaufnahme eines 6-Well EHTs, 1,25x vergrößert. B: Übersichtsaufnahme eines 24-Well-EHTs, 1,25x vergrößert; C: 10x vergrößerter Ausschnitt von A. D: 10x vergrößerter Ausschnitt von B. Beim Vergleich von C und D fällt auf, dass im Zentrum der 6-Well-Variante kaum typische längsausgerichtete Kardiomyozyten zu finden sind, dafür viele kreisrunde amorphe Zellen, während in der 24-Well-Variante auch im Zentrum gleichmäßig ausgerichtete längliche Kardiomyozyten zu sehen sind. Kulturbedingungen 10% HS, 21% O₂.

Ein dritter, rein praktischer Grund waren die bereits im Institut etablierten Kontraktilitätsmessverfahren (siehe 2.4.8, S. 26), die für das 24-Well-Format entworfen worden waren. Um diese verwenden zu können, musste das Widerstandsverhalten der unter 2.4.3 beschriebenen neu entwickelten Silikonhalterungen mit den Standard-Silikonhalterungen (Hansen et al., 2010) verglichen werden. Bei den Standardhalterungen waren die EHTs nicht zwischen zwei Schläuchen aufgehängt, sondern zwischen soliden Silikonstäben mit einem Durchmesser von 1 mm. Dieser Unterschied hatte erhebliche Auswirkungen auf den Widerstand, den ein EHT bei einer Kontraktion überwinden musste (vgl. 3.1.1, S. 52).

3.1.1 Korrelation von Auslenkung und Kraft der Silikonhalterungen

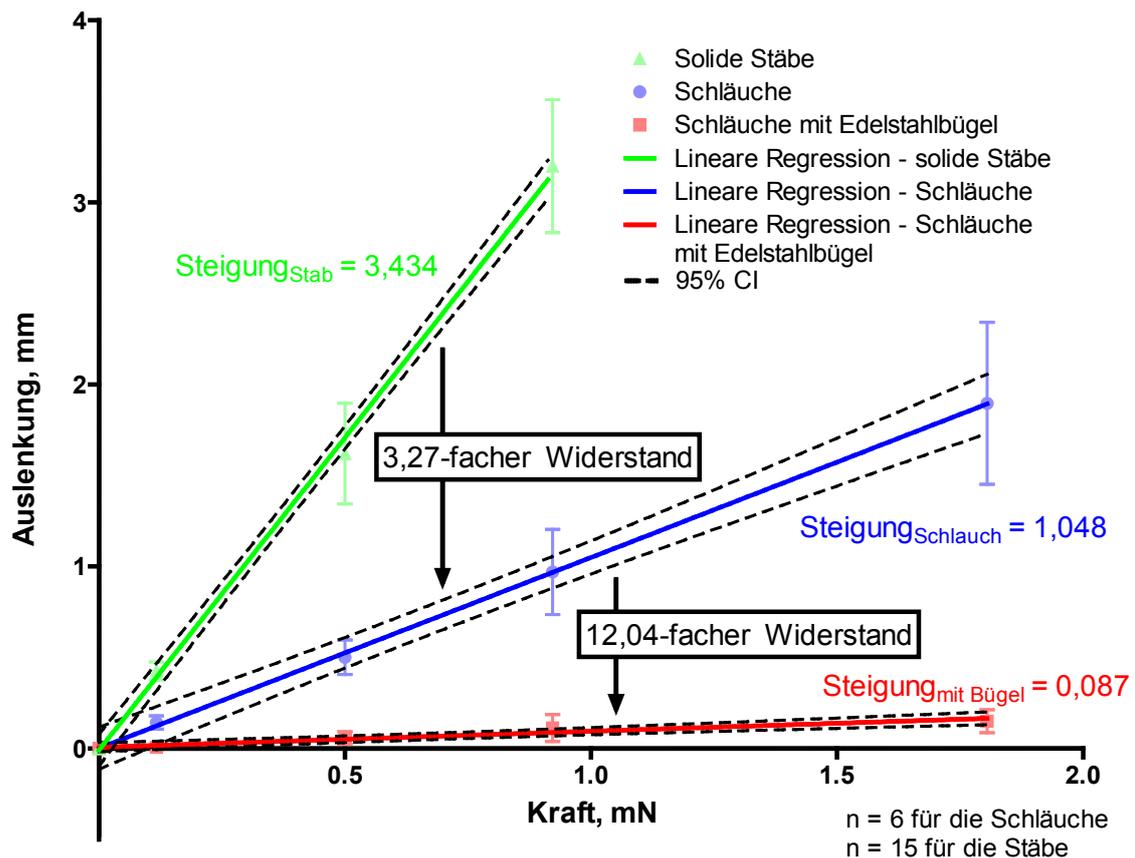


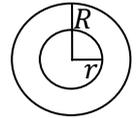
Abb. 3.3: Korrelation von Auslenkung und Kraft der Silikonhalterungen. Gezeigt wird die Auslenkung der Silikonhalterungen (Stäbe bzw. Schläuche) in Abhängigkeit einer angelegten Kraft. Anhand der Messwerte (Symbole) wurde für jede Gruppe eine Regressionsgerade ermittelt (durchgezogene Linien). Die Steigung der Geraden konnte als Maß für den Widerstand der Halterungen genommen werden. Der Widerstand der neuen Silikonhalterungen (Schläuche) war 3,27-mal höher als der der herkömmlichen Halterungen. Durch das Einsetzen der Metallbügel ließ sich dieser Widerstand um das 12,04-fache erhöhen. Die Messwerte der soliden Stäbe wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Alexandra Eder (unveröffentlichte Daten).

Abb. 3.3 zeigt, dass der Widerstand der Silikonschläuche deutlich höher war als der der Standardhalterungen. Durch Einsetzen dieser Daten in die Vandenburg'sche Formel (siehe 2.4.8.2, S.28) ließ sich der Elastizitätsmodulus für die Schläuche berechnen (Abb. 3.4).

3 Ergebnisse

$$F = \frac{3EI\delta}{L^3}$$

, δ → Auslenkung des Silikonschlauchs, mm



, L → Länge des Silikonschlauchs, mm

$$\rightarrow E = \frac{FL^3}{3I\delta}$$

, I → Flächenträgheitsmoment mit $I = 0,25\pi(R^4 - r^4) mm^4$

dabei bezeichnet R den Außenradius und r den Innenradius des Silikonschlauchs (siehe Piktogramm)

, F → Kraft, N

, E → Elastizitätsmodulus, mN/mm^2

$$\begin{aligned}\rightarrow E &= \frac{0,001 N \cdot 15^3 mm^3}{3 \cdot 0,25 \pi (1,3^4 mm^4 - 0,5^4 mm^4) \cdot 1,048 mm} \\ &= \underline{\underline{489,25 mN/mm^2}}\end{aligned}$$

Abb. 3.4 Ermitteln des Elastizitätsmoduls

Durch Einsetzen des Elastizitätsmodulus und den anderen bekannten Variablen in die Vandenburgh'sche Formel ließ sich nun für die Auslenkung des Schlauchs (δ) eine Kraft (F) berechnen: $F = 0,954 \cdot \delta mN/mm$. Die videooptischen Messsysteme waren nun auch für die Halterungen mit Silikonschläuchen nutzbar.

3.1.2 Unmittelbare Auswirkung der Nachlasterhöhung

Die Nachlasterhöhung mittels der Edelstahlbügel machte den EHTs die Flexion des Silikonschlauchs nahezu unmöglich. In dem videoptischen Messsystem erschien die geringere Flexion als stark reduzierte Kraft. Die Schlagfrequenz änderte sich nicht (Abb. 3.5).

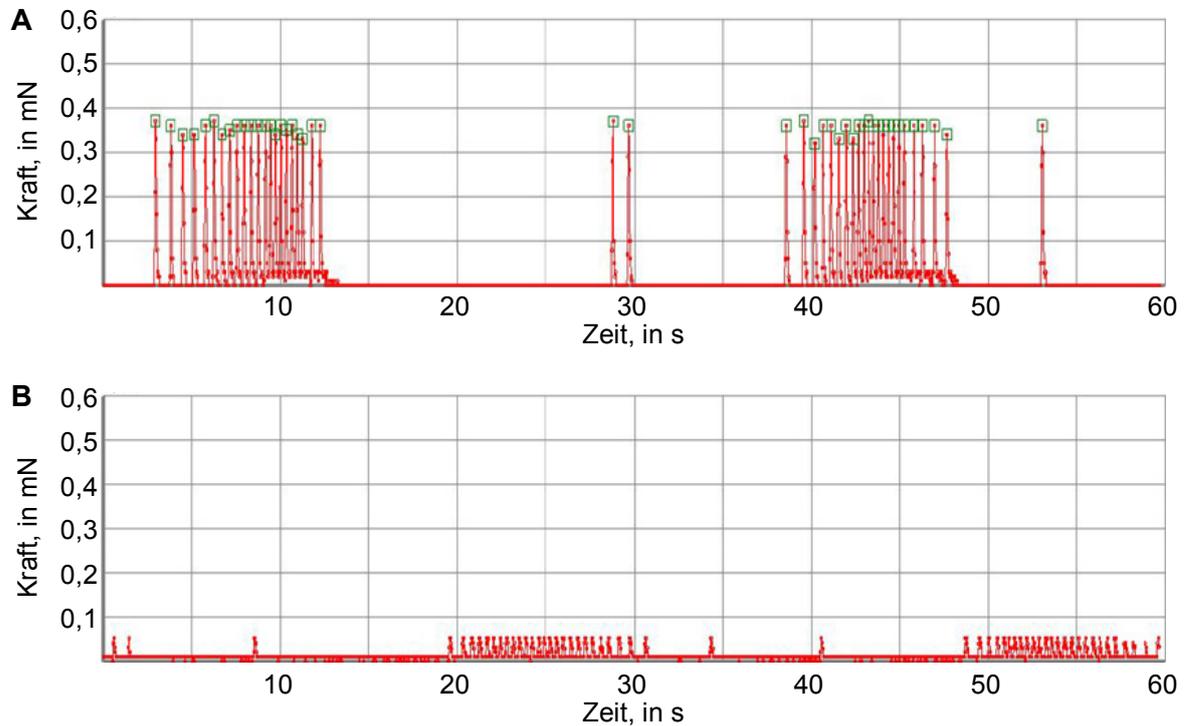


Abb. 3.5 Effekt der Edelstahlbügel. Gezeigt sind die Kontraktionsabläufe eines EHTs vor (A) und nach (B) Einführung der Edelstahlbügel. Mit Stahlbügel kann das EHT die Silikonschläuche kaum flektieren, was in der automatischen Messapparatur wie eine stark reduzierte Kraft erscheint.

3.2 Optimierung des Versuchsablaufs

3.2.1 Verzicht auf Pferdeserum

Unter den Standardkulturbedingungen war es zunächst nicht möglich, stabil reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, was unter Umständen an der starken hypertrophen Stimulation durch das Pferdeserum im Zellkulturmedium lag. Möglicherweise waren die Kardiomyozyten bereits maximal hypertrophiert, bevor sie der Nachlasterhöhung zugeführt wurden. Paul Simpson beobachtete bereits 1982 eine bis zu vierfache Größenzunahme bei Kardiomyozyten in Zellkultur durch die Behandlung mit 10% Pferdeserum (Simpson et al., 1982). Es erschien daher erstrebenswert, auf die Zugabe von Pferdeserum zu verzichten. Ohne Pferdeserum jedoch verloren die EHTs ihre Spontanaktivität. Die schrittweise Reduktion des Pferdeserums (4% ab Tag 8, 0% ab Tag 13) und die Supplementierung von Trijodthyronin (T_3) ab Tag 13 ermöglichten den Verzicht auf Pferdeserum bei erhaltener Spontanaktivität. Um eine optimale Dosierung des T_3 zu ermitteln, wurden Konzentrationen von 0,5 – 5,0 ng/ml getestet (Abb. 3.6).

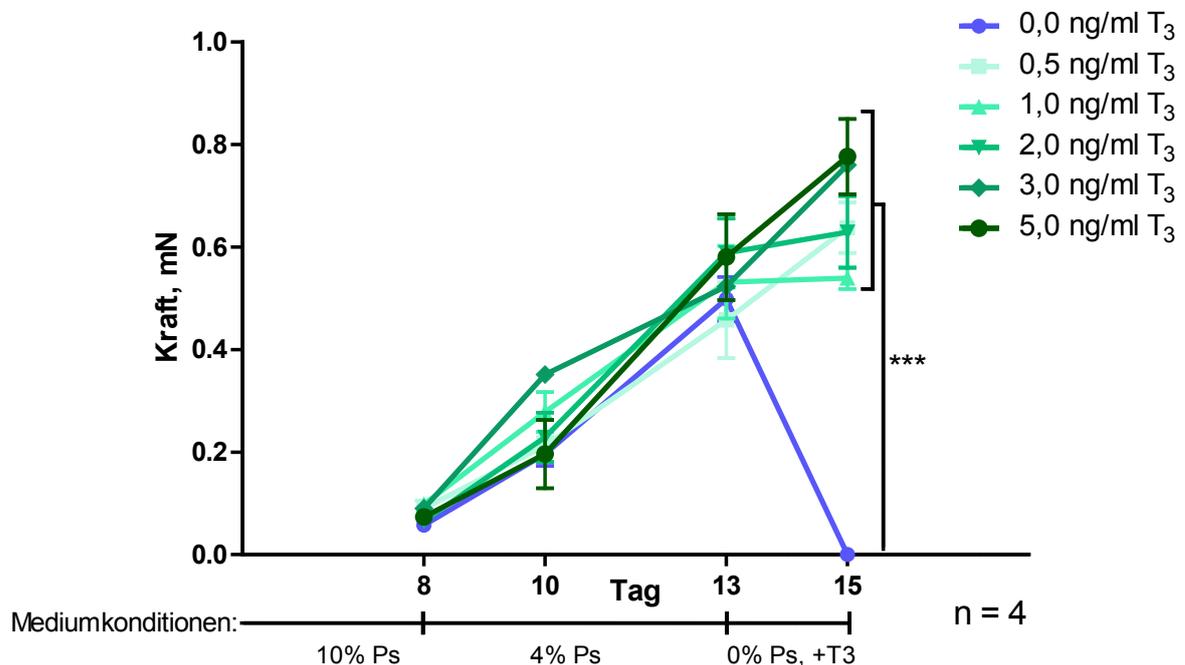


Abb. 3.6: T_3 - Supplementierung. Gezeigt ist die Kraft gemessen an Tag 8 bis Tag 15. Bis Tag 13 waren alle Gruppen den gleichen Medienbedingungen ausgesetzt, danach wurden sie mit T_3 von 0,0 ng/ml bis 5,0 ng/ml behandelt. EHTs mit 0,0 ng/ml T_3 zeigten bereits nach zwei Tagen keine Kontraktilität mehr. ($p < 0,001$, für 0,0 ng/ml T_3 gegen alle anderen Gruppen).

Abb. 3.6 zeigt, dass, bezogen auf die Kontraktionskraft, es nicht entscheidend war, wie hoch die T_3 Konzentration im Medium war, sondern nur, ob überhaupt welches zugegeben wurde. Auch auf die Vitalität des Gewebes hatte die Gegenwart von T_3 einen Einfluss (Abb. 3.7). Da ein Überangebot an Trijodthyronin ebenfalls zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten

3 Ergebnisse

führen kann, wurde die geringste der getesteten T_3 -Konzentrationen in den folgenden Versuchen als Ersatz für das Pferdeserum verwendet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von EHTs, die 8 Tage mit 0,5 ng/ml T_3 kultiviert wurden zeigten, dass auch ohne Pferdeserum eine gut entwickelte Herz-ähnliche Ultrastruktur erreicht wurde.

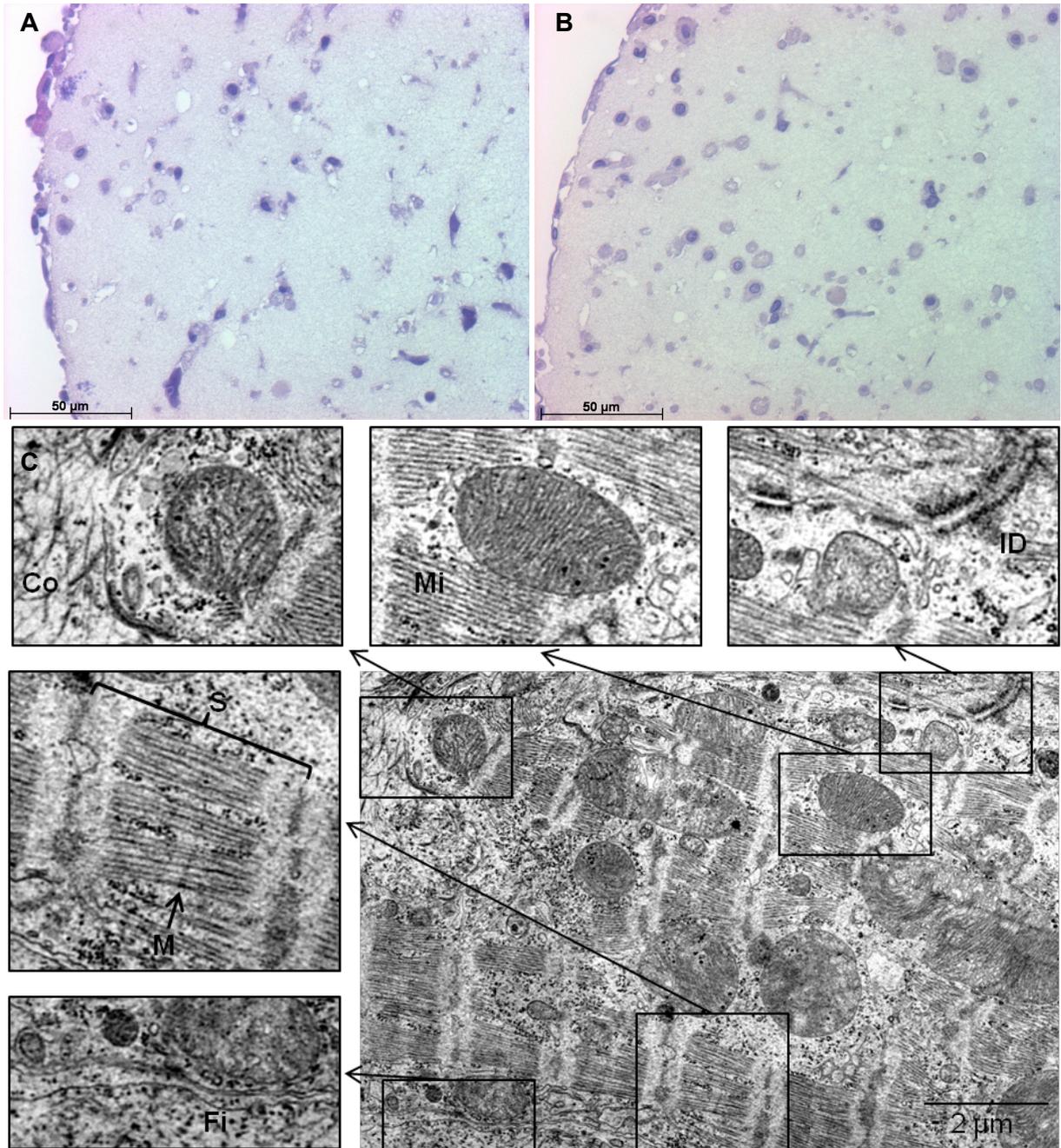


Abb. 3.7: Effekt der T_3 Supplementierung. A: HE-gefärbter Querschnitt eines EHTs ohne T_3 -Supplementierung. B: HE-gefärbter Querschnitt eines EHTs mit T_3 -Supplementierung, beide 40x vergrößert. Die EHTs wurden bis Tag 13 gleich behandelt (bis Tag 8: 10% Pferdeserum; Tag 8 – Tag 13: 4% Pferdeserum). Von Tag 13 – Tag 18 wurde A kein T_3 zugesetzt und B mit 0,5 ng/ml T_3 supplementiert. Im direkten Vergleich lässt sich erkennen, dass bei B deutlich mehr runde Zellen zu sehen sind, viele mit angeschnittenem Kern, während bei A loses Zellmaterial das Bild dominiert. C: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines EHTs, das acht Tage ohne Pferdeserum und mit 0,5 ng/ml T_3 kultiviert wurde, 5000x vergrößert. Man erkennt eine gut ausgebildete Herz-ähnliche Gewebsstruktur

3 Ergebnisse

mit Längsausrichtung der Zellen und ausgeprägter Ultrastruktur der Sarkomere mit Z-, I-, A-, H-, und unregelmäßigen M-Banden (M). Co = Kollagen, Mi = Mitochondrium, ID = Teil eines Glanzstreifens (Discus intercalares) mit Desmosomen, S = Sarkomer, Fi = Fibrin.

Tabelle 3.1 zeigt, dass die freie T_3 -Konzentration in Medium mit Zugabe von 0,5 ng/ml T_3 sogar noch unter der in Medium mit 10% Pferdeserum lag. In beiden Medien lag die Konzentration deutlich unter den physiologischen (humanen) Grenzwerten, so dass nicht mit einer „thyreogenen“ Hypertrophie zu rechnen war.

Tabelle 3.1: Laborchemische Analyse verschiedener Mediumzusammensetzungen

	10% Pferdeserum	0% Pferdeserum, 0,5 ng/ml T_3	Referenzbereich (Mensch)
Gesamt T_3	0,7 $\mu\text{g/l}$	0,7 $\mu\text{g/l}$	0,8 – 2,0 $\mu\text{g/l}$
Freies T_3 (fT_3)	1,0 pmol/l	0,7 pmol/l	3,1 – 6,8 pmol/l
Gesamt T_4	8,9 $\mu\text{g/l}$	6,8 $\mu\text{g/l}^*$	51 – 141 $\mu\text{g/l}$
Freies T_4 (fT_4)	3,4 pmol/l	<0,3 pmol/l**	12 – 25 pmol/l

* Die gezeigten T_4 -Spiegel lassen sich durch den allen Medien zugegebenen Hühnerembryonenextrakt erklären. ** Die vollständige Depletion von fT_4 lässt vermuten, dass das Gewebe zur Konversion von T_4 zu T_3 in der Lage war.

3.2.2 Evaluation der EHTs

Die Kultur in T_3 -angereichertem serumfreiem Medium führte zu einem Abfall der Schlagfrequenz (Abb. 3.8, A). Für einen hypertrophen Effekt der Nachlasterhöhung war das selbstständige Schlagen der EHTs obligat. Daher wurde neben den regelmäßigen Kontraktilitätsmessungen am Ende der Kulturzeit der Glukoseverbrauch durch Analyse des Mediumüberstands in einem Blutgasanalysator festgestellt. Je häufiger ein EHT schlug, desto größer war auch sein Glukoseverbrauch (Abb. 3.8, B). Der Beobachtungszeitraum der EHTs wuchs somit von 60 Sekunden (videoptische Messung) auf 24 Stunden (Zeit, die das EHT dem Medium ausgesetzt war). EHTs, die keine oder nur sehr wenig Glukose verbraucht hatten, wurden aus weiteren Versuchen ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

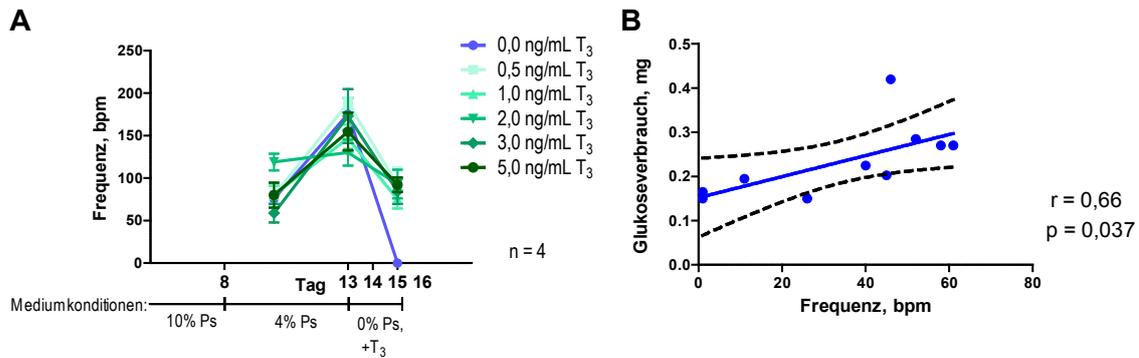


Abb. 3.8 Evaluation der EHTs. A: Gezeigt ist die Frequenz gemessen im Verlauf der Medienumstellung und unter der Behandlung mit unterschiedlichen T₃-Konzentrationen. Man erkennt, dass nach einem Anstieg der Schlagfrequenz während der Behandlung mit Pferdeserum bereits nach zwei Tagen mit T₃-Supplementierung alle Gruppen mit geringerer Frequenz schlugen. B: Zu sehen ist eine Korrelation von Glukoseverbrauch (in mg) und Schlagfrequenz (in bpm). Jeder Punkt entspricht einem EHT, die blaue Linie zeigt die Regressionsgerade (mit 95% Konfidenzintervall; gestrichelte Linie), gemessen nach einer Inkubation von 24 Stunden. Die EHTs wurden zum Messzeitpunkt bereits 5 Tage unter serumfreien Bedingungen gehalten. Es zeigte sich eine signifikante positive Korrelation von Frequenz und Glukoseverbrauch.

3.2.3 Postivkontrollen durch chemische Stimulation

Die Stimulation durch 5 nM Endothelin-1 oder 20 μ M Phenylephrin, zwei bekannten Aktivatoren des Phospholipase C Signalwegs, führte zu den erwarteten Effekten auf Kraft und Frequenz. Beide Substanzen zeigten eine positive Chronotropie, bei Phenylephrin etwas stärker ausgebildet, und eine leichte positive Inotropie, die sich vor allem in den erhaltenen höheren Kräften gegen Ende der Versuchszeit offenbarte, während die Kontroll-EHTs einen Kraftabfall aufwiesen.

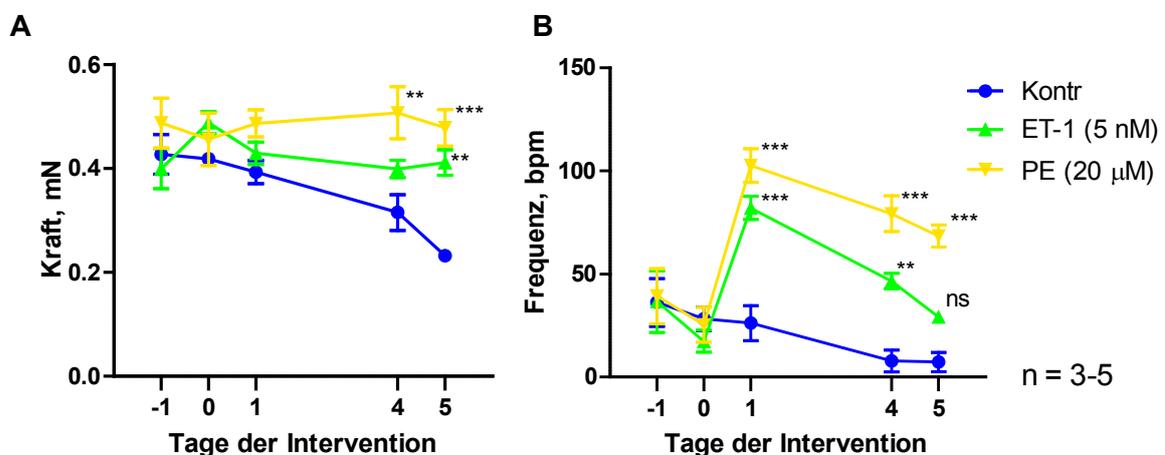


Abb. 3.9 Auswirkungen der chemischen Stimulation auf die Kontraktilität. A: Aufgetragen ist die Kraft gegen den Zeitraum der Stimulation. Während die Kontrollgruppe einen steten Kraftabfall über die Interventionszeit aufwies, blieben die chemisch stimulierten EHTs auf gutem Kraftniveau. B: Gezeigt ist die Frequenz im Verlauf der Intervention. Das Hinzufügen von Phenylephrin bzw. Endothelin-1 führte zu einem sofortigen Anstieg der Schlagfrequenz, der Effekt nimmt im Verlauf des Versuchs ab, die Aktivität blieb aber oberhalb der Kontrollgruppe. Statistik: $n = 3-5$, Two-Way-ANOVA mit Bonferroni Nachtest.

3.3 Aktivierung des fetalen Genprogramms

3.3.1 Das fetale Genprogramm auf Transkriptionsebene

In vielen Fällen reagieren Kardiomyozyten auf Änderungen ihrer Umgebung (Abfall des Sauerstoffpartialdrucks, biomechanischer Stress) mit einer Reaktivierung des fetalen Stoffwechsels. Dies führt dazu, dass bei pathologischen Zuständen des Herzens – wie Hypoxie, Ischämie, Atrophie und Hypertrophie – die Gene der am fetalen Stoffwechsel beteiligten Proteine vermehrt exprimiert werden. Folgende Gene wurden in EHTs mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative real-time-PCR*, qPCR) auf Expressionsveränderungen untersucht: Atriales natriuretisches Peptid (ANP), *brain natriuretic peptide* (BNP), α -skeletales Aktin, die β -Isoform der schweren Myosinkette (*β -myosin-heavy-chain*, β -MHC) und α -Isoform der schweren Myosinkette (*α -myosin-heavy-chain*, α -MHC) sowie SERCA2a (Sarco/endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2, Typ P-ATPase). Die Ergebnisse wurden normalisiert auf die Expression der 18s rRNA. (vgl. 0

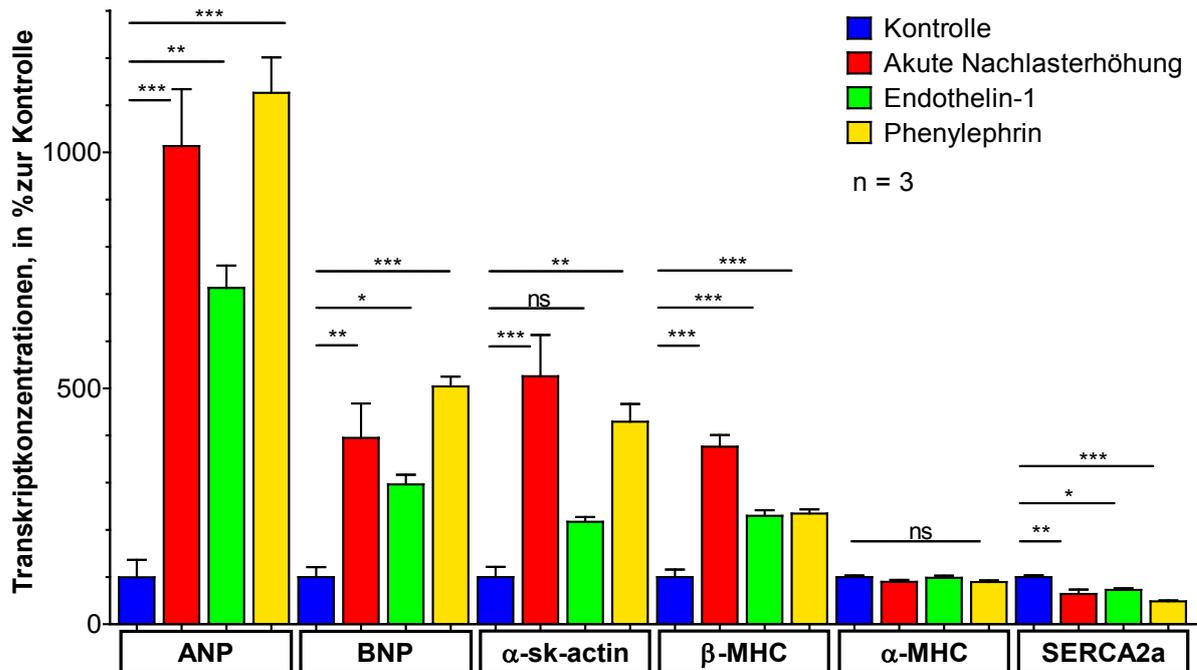


Abb. 3.10: Untersuchung der Transkriptkonzentrationen des fetalen Genprogramms.

Vergleich der Interventionsgruppen Akute Nachlasterhöhung (rot), Endothelin-1 (grün) und Phenylephrin (gelb) mit einer Kontrollgruppe (blau) nach vier Tagen Intervention. Die Säulen stehen für relative mRNA-Konzentrationen in % bezogen auf die Kontrollgruppe. Die Vertreter des fetalen Genprogramms waren in allen Interventionsgruppen signifikant hochreguliert. α -MHC war nicht signifikant verändert. SERCA2a wurde signifikant herunter reguliert. Gezeigt ist Mittelwert + SEM, $n = 3$ mit je 3 technischen Replikaten, One-Way ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Interventionsgruppe vs. Kontrollgruppe.

Es ließ sich eine deutliche Hochregulierung der Vertreter des fetalen Genprogramms in allen Interventionsgruppen beobachten. Die akute Nachlasterhöhung zeigte sich in diesem Vergleich als potenter Aktivator. Für α -skeletal-Actin und β -MHC wiesen diese EHTs sogar den stärksten Anstieg auf. Die starke Expressionssteigerung der natriuretischen Peptide (ANP bis zu 10-fache mRNA Konzentration) lässt auf eine starke Stresssituation der Kardiomyozyten schließen. Die Herabregulation von SERCA2a könnte zudem für Veränderungen der Kontraktilität verantwortlich sein.

3.3.2 Das fetale Genprogramm auf Proteinebene

Um zu untersuchen, in wieweit die oben beschriebenen Änderungen im Expressionsverhalten Auswirkungen auf die Proteinzusammensetzung der Zelle hatte, wurden ANP und β -MHC mittels antikörperbasierter Verfahren in den EHTs nachgewiesen:

3 Ergebnisse

3.3.2.1 Western Blot – β -MHC

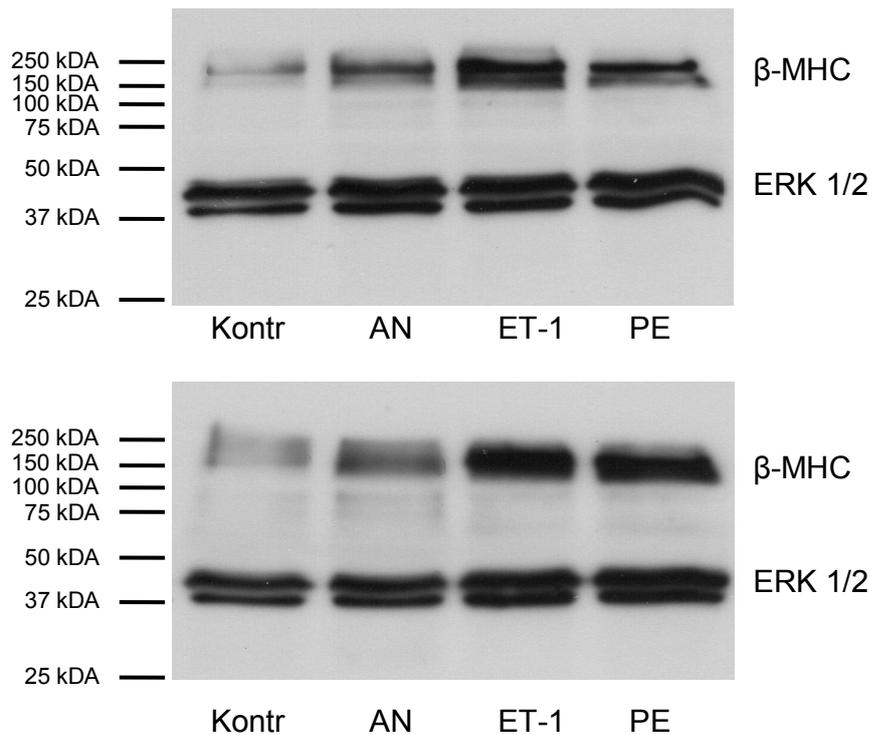


Abb. 3.11: Western Blot – β -MHC. Dargestellt sind zwei unabhängige Western Blots, die mit den Primärantikörpern Anti-ERK 1/2 (Cell Signaling, *rabbit*) als Ladekontrolle und Anti- β -MHC (Sigma Aldrich, *mouse*) inkubiert und entwickelt wurden (Belichtung: 1 Minute). Im Vergleich zu den Kontrollen nahm die Intensität des β -MHC Signals in allen Interventionsgruppen zu. Dabei zeigte die mit Endothelin-1 behandelte Gruppe das stärkste Signal.

Wie in Abb. 3.11 zu erkennen ist, konnte auch eine Zunahme des β -MHC-Proteins gezeigt werden. Inwieweit die Veränderungen im Myosin-Isotyp Einfluss auf die Kontraktilität der EHTs hatte, wird weiter unten besprochen werden.

3.3.2.2 ANP-Immunhistochemie

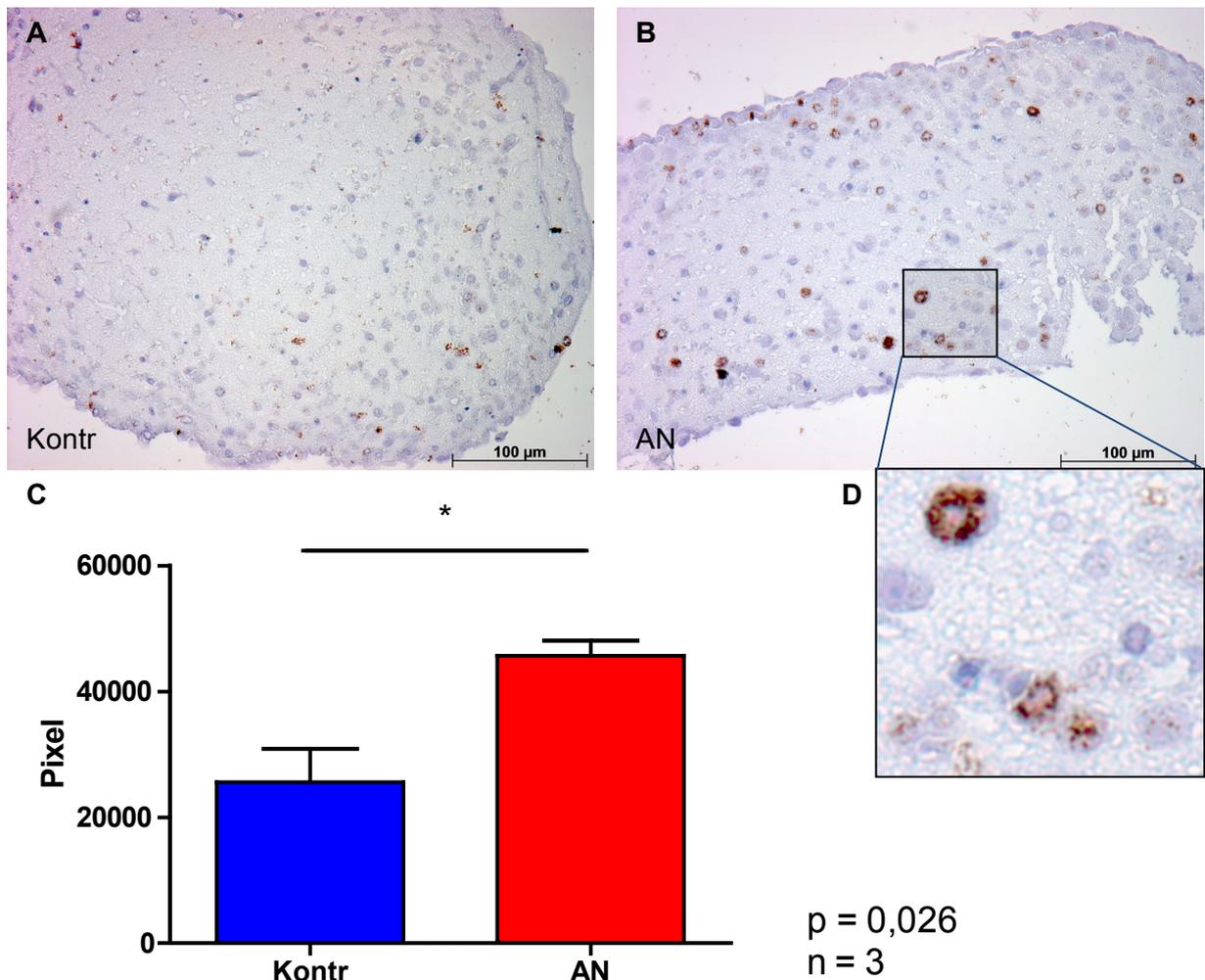


Abb. 3.12: ANP-gefärbte EHT-Querschnitte, 20x vergrößert. Im Vergleich zwischen A: Kontrolle (Kontr) und B: Akute Nachlasterhöhung (AN) fällt auf, dass in B deutlich mehr ANP-positive Zellen zu sehen sind. Das braune Farbsignal zeigt eine für ANP typische perinukleäre Verteilung (D). C zeigt eine automatische Quantifizierung mittels eines Farbfilters für das braune ANP-Signal. Gemessen wurde die Anzahl der gefärbten Pixel eines kompletten Querschnitts pro EHT. Es ließ sich eine signifikante Zunahme des ANP-Signals durch Akute Nachlasterhöhung feststellen. Die Auswertung erfolgte mit der ImageJ-Software. Statistik: Mittelwert + SEM, n=3, Students t-Test für ungepaarte Messungen, * $p < 0,05$, Akute Nachlasterhöhung vs. Kontrollen.

Wie in Abb. 3.12 zu sehen ist, wurde ANP in der Gruppe Akute Nachlasterhöhung signifikant erhöht gefunden. Um die Verteilung der ANP-Granula in der ganzen Zelle nachzuvollziehen, wurden Längsschnitte angefertigt, die ebenfalls das klassische perinukleäre Signal aufwiesen (Abb. 3.13).

3 Ergebnisse

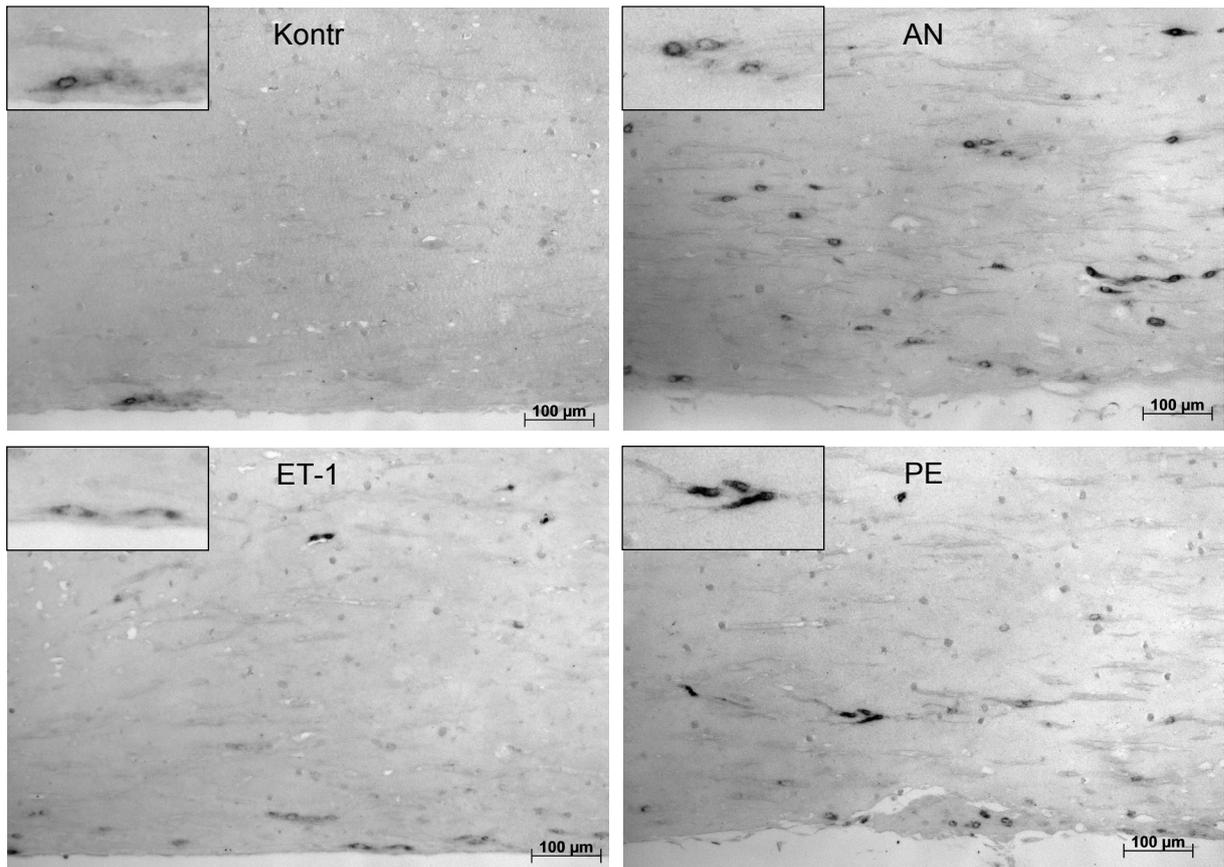


Abb. 3.13: ANP-gefärbte EHT-Längsschnitte, 10x vergrößert. Zur besseren Kontrastierung wurden die Schnitte ohne Gegenfärbung gefärbt und in Graustufen aufgenommen. Es ließ sich eine deutliche Zunahme der ANP-positiven Zellen in den Interventionen Akute Nachlasterhöhung (AN), Endothelin-1 (ET-1) und Phenylephrin (PE) im Vergleich zur Kontrolle (Kontr) erkennen. Auch in den Längsschnitten konnte die ANP-typische perinukleäre Verteilung der Granula beobachtet werden (siehe Vergrößerungen im jeweils linken oberen Bereich).

Die Untersuchungen von ANP und β -MHC zeigten, dass hypertrophe Stimulation durch akute Nachlasterhöhung ähnlich starke Genexpressionsveränderungen nach sich zieht, wie die pharmakologische Stimulation durch Endothelin-1 und Phenylephrin. Der Stress, sei er nun pharmakologisch oder mechanisch, schien ausreichend zu sein, um die Proteinzusammensetzung der Kardiomyozyten zu beeinflussen. Als Nächstes sollte nun versucht werden, die Zellgröße als maßgebliches Kriterium für kardiale Hypertrophie zu messen und auf eine mögliche Größenveränderung unter den Interventionsbedingungen zu untersuchen.

3.4 Zellgrößenbestimmung

Anfängliche Versuche, Zellgrößen mittels konfokaler Lasermikroskopaufnahmen von EHTs, die mit einem α -Actinin-Antikörper (Strukturprotein des Zytoskeletts, das Aktinfilamente in den Z-Streifen verankert) gefärbt worden sind, zu bestimmen, erwiesen sich als schlecht standardisierbar (Abb. 3.14), woraufhin die immunhistochemische Färbung von Dystrophin-Querschnitten als Verfahren der Wahl etabliert wurde.

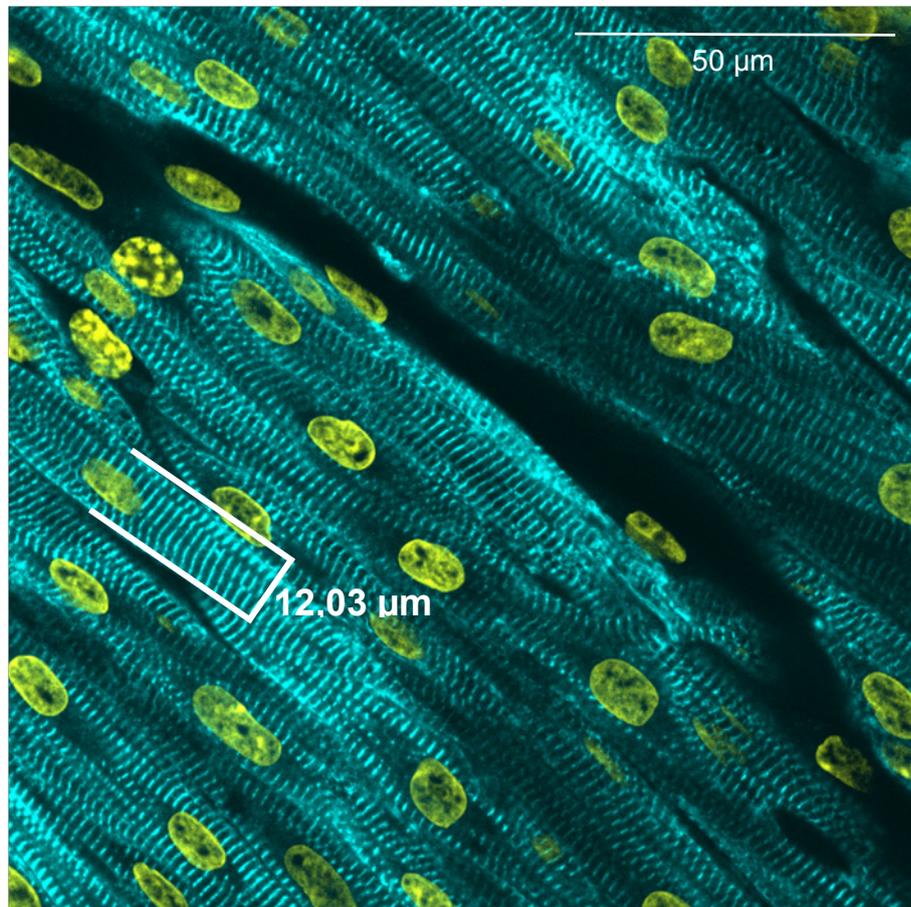


Abb. 3.14: Konfokale Lasermikroskopaufnahme eines EHTs, 63x vergrößert, gefärbt mit einem α -Actinin-Antikörper (cyan) und DRAQ5 (gelb) als Kernfarbstoff. Man erkennt die charakteristische Querstreifung von Kardiomyozyten und ein dichtes Zellnetzwerk. Gezeigt ist der Versuch einer Zellgrößenbestimmung durch Messung des Durchmessers einer Zelle auf Kernhöhe. Nachteile dieser Methode waren, dass die Grenzen der Zellen in der α -Actinin-Färbung nicht immer eindeutig waren und dass die Färbung des ganzen EHTs (*whole mount*) aufgrund mangelnder Eindringtiefe der Antikörper oder des Lasers nur eine Untersuchung der Zellen in der äußeren Schicht des EHTs zuließ.

3.4.1 Zellgrößenbestimmung anhand Dystrophin-Querschnitte

Für die folgenden Ergebnisse wurden pro Gruppe drei Querschnitte aus der Mitte der EHTs Dystrophin-gefärbt und einer semiautomatischen Flächensegmentierung zugeführt. Dabei

3 Ergebnisse

war der Untersucher vollständig verblindet. (Als Beispiel für die dieser Messung zugrunde liegenden Dystrophin-gefärbten Querschnitte siehe Abb. 2.17, S. 38; zur Darstellung der Segmentierung siehe Abb. 2.20, S. 42).

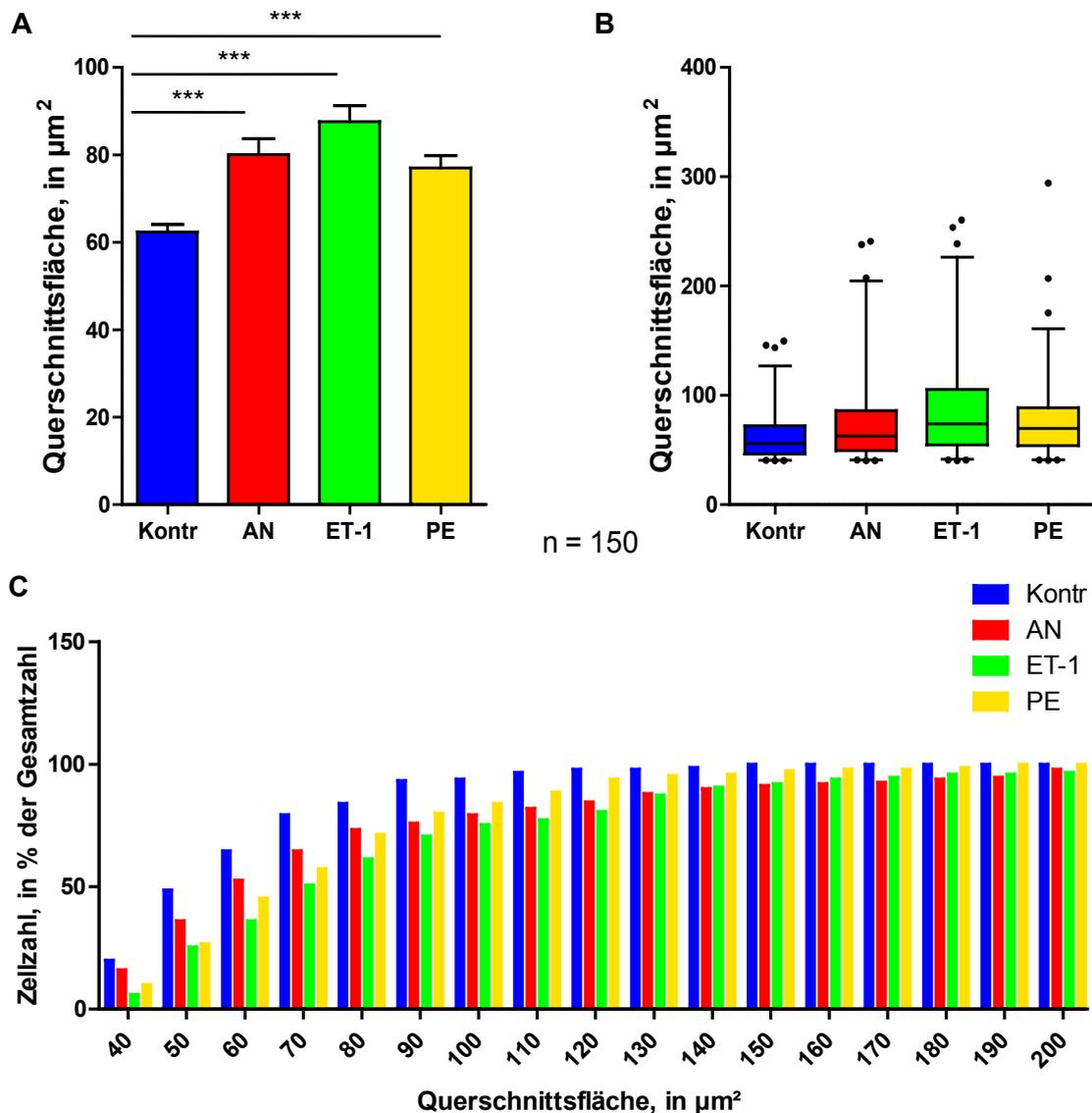


Abb. 3.15: Flächenauswertung der Dystrophin-gefärbten EHT-Querschnitte, n = 150 (3 EHTs pro Gruppe, 40-60 Zellen pro EHT; Kontr: Kontrolle, AN: Akute Nachlasterhöhung, ET-1: Endothelin-1, PE: Phenylephrin). A: Mittelwert + SEM der Querschnittsflächen der Kardiomyozyten, *One-Way ANOVA*, $***p < 0,001$, Intervention vs. Kontrolle. Es lässt sich eine Zunahme der durchschnittlichen Zellgröße für alle Interventionen beobachten (AN: +28,4%, ET-1: +40,5%, PE: +23,4%). B: Box-Plot der Querschnittsflächen (Box: Median, 25. und 75. Perzentile; Linie: 95% Konfidenzintervall; Punkte: Minima und Maxima). Hier wird deutlich, dass nicht nur die Maxima der Interventionen deutlich über den der Kontrollen liegen (Punkte), sondern auch die mittelgroßen Zellen größer werden, erkennbar durch die größeren Werte der 25., 50. und 75. Perzentile in den Interventionsgruppen (Box). C: Kumulierte Häufigkeitsverteilung, jede Säule steht für den Anteil der Zellen, deren Querschnittsfläche in dem Bereich $\pm 5 \mu\text{m}^2$ um den auf der Abszisse genannten Wert oder darunter liegt. Beispielsweise wurden 93,33% der Kontrollzellen mit einer Fläche $\leq 95 \mu\text{m}^2$ gemessen (blaue Säule bei x = 90), während 93% der Zellen mit akuter Nachlasterhöhung erst bei einer Fläche $\leq 185 \mu\text{m}^2$ erreicht wurden (rote Säule bei x = 180).

3 Ergebnisse

Die Auswertung der Dystrophin-Querschnitte ließ eine deutliche Zunahme der durchschnittlichen Zellquerschnittsfläche unter Interventionsbedingungen beobachten (Abb. 3.15, A). Wie Abb. 3.15, B und C zeigen, waren zwar vor allem die sehr großen Zellen vermehrt in den Interventionsgruppen zu finden, allerdings ließ sich auch bei den mittleren und kleinen Zellen eine Größenzunahme durch die Interventionen feststellen. Dies erklärt auch die nur geringe Änderung des Medians in Abb. 3.15, B (+12,8% für akute Nachlasterhöhung).

3.5 Genomweite Expressionsanalyse

Mithilfe des *Illumina*[®] *RatRef-12 Expression BeadChip* konnte die Expression von 21.519 Genen untersucht werden. Dies lieferte eine Bestätigung der oben beschriebenen Veränderungen der Genexpression und ließ weitreichende Analysen der Expressionsveränderungen zu. Besonders auffallend waren Veränderungen des Metabolismus und der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen.

3.5.1 Kriterien einer „guten“ Genliste

Nach Huang da et al. (2009) lässt sich eine große Genliste, wie die Ergebnisliste des *Illumina*[®] *Chips*, mithilfe des Online-Dienstes *DAVID – functional annotation tool* analysieren und nach sieben Kriterien bezüglich Qualität und Aussagekraft beurteilen. So sollte die Liste viele der für die Studie erwarteten Gene beinhalten, sog. „Marker-Gene“ (**Kriterium 1**). Des Weiteren sei entscheidend, dass sie eine angemessene Anzahl regulierter Gene enthält, ca. 100 – 2.000 (**Kriterium 2**), und diese die Kriterien statistischer Signifikanz erfüllen (**Kriterium 3**). Außerdem sollte ein Teil der regulierten Gene in interessante biologische Prozesse involviert sein (**Kriterium 4**) und die Anzahl und Signifikanz dieser biologischen Prozesse höher sein, als bei einer vollkommen zufällig zusammengestellten Genliste (**Kriterium 5**). Abschließend sei eine hohe Reproduzierbarkeit zu erstreben, z. B. durch unabhängige Versuche unter den gleichen Bedingungen (**Kriterium 6**) sowie die Bestätigung der Ergebnisse durch andere Laborversuche (**Kriterium 7**). Im Folgenden wurden die Ergebnisse des *Illumina*[®] *RatRef-12 Expression BeadChip* auf diese Kriterien überprüft.

3.5.1.1 Enthält die Liste für die Studie erwartete „Marker-Gene“?

Hierzu wurden die Expressionsveränderungen der unter 3.3 vorgestellten Vertreter des fetalen Genprogramms in den Daten der Chipanalyse nachvollzogen (Abb. 3.16). Für die Akute Nachlastserhöhung fanden sich drei dieser Gene unter den zehn am stärksten regulierten Genen (Tabelle 3.2).

3 Ergebnisse

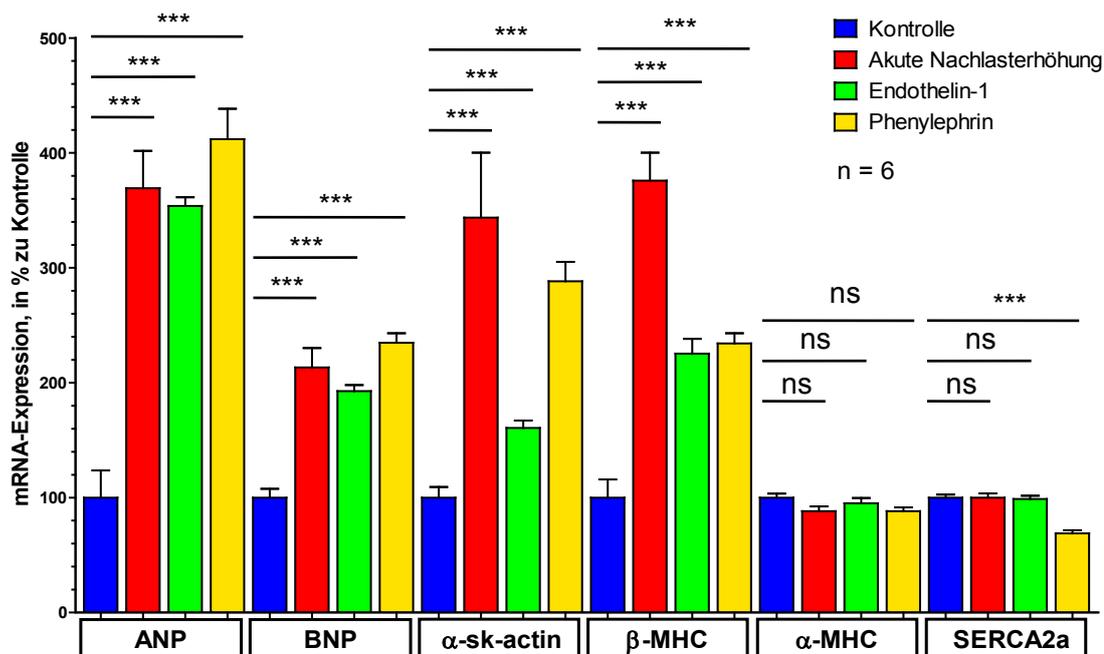


Abb. 3.16: Aktivierung des fetalen Genprogramm gemessen durch genomweite Expressionsanalyse. Dargestellt sind die Expressionsveränderungen der unter 3.3.1 vorgestellten Vertreter des fetalen Genprogramms ermittelt durch die Chip-Analyse im Verhältnis zur Kontrollgruppe. (n = 6, ***p<0,001, ns: p>0,05).

Tabelle 3.2: Die zehn am stärksten hochregulierten Gene – Akute Nachlasterhöhung

Akute Nachlasterhöhung gegen Kontrolle			
Rang	Gensymbol	Beschreibung	FC
1	Scn3b	Spannungsabhängiger Natrium-Kanal, Typ III, β-Untereinheit	4,55
2	Myh7	β-Isoform der schweren Myosinkette	3,96
3	Acta1	Skeletales Alpha-Actin	3,62
4	Slc16a3	Monocarboxylsäure Transporter 4	3,32
5	Nppa	Atriales natriuretisches Peptid	3,31
6	S100g	S100 Calciumbindendes Protein G	3,25
7	Scd1	Stearoyl-Coenzym A Desaturase 1	3,18
8	Enah	<i>Enabled Homolog (Drosophila)</i>	3,05
9	Usmg5	<i>Up-regulated during skeletal muscle growth 5 homolog (Maus)</i>	3,01
10	Tbx15	T-box Transkriptionsfaktor 15	2,96

Unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen (FC: *fold change*, vielfache Expression) fanden sich für die Akute Nachlasterhöhung die β-Isoform der schweren Myosinkette (Myh7, FC: 3,96), Skeletales alpha-Aktin (Acta1, FC: 3,62) und das atriale natriuretische Peptid (Nppa, FC: 3,31). Vgl.: 3.3.1, S.59.

3.5.1.2 Enthält die Liste eine angemessene Anzahl regulierter Gene (z. B. 100-2000)?

Von den 21.519 untersuchten Genen wurden im Vergleich zur Kontrolle für Endothelin-1 572 Gene, für Phenylephrin 1.405 Gene und für Akute Nachlasterhöhung 1.036 Gene signifikant unterschiedlich exprimiert gemessen, also zwischen 2,6% und 6,5% der analysierten Gene (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Anzahl veränderter Gene in den einzelnen Gruppen

	Akute Nachlasterhöhung	Endothelin-1	Phenylephrin
Hochregulierte Gene (>1,5-fach exprimiert, p<0,05)	648	385	776
Herunter-regulierte Gene (<0,66-fach exprimiert, p<0,05)	388	187	629
Regulierte Gene insgesamt	1.036	572	1.405

Gezeigt ist die Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene der Interventionsgruppen (AN: Akute Nachlasterhöhung, ET-1: Endothelin-1, PE: Phenylephrin). Die Anzahl der Gene lag in einem vernünftigen und zwischen den Gruppen vergleichbaren Rahmen.

3.5.1.3 Erfüllen die ausgewählten Gene die Richtlinien statistischer Signifikanz?

Es wurden ausschließlich Gene in die weiteren Analysen aufgenommen, deren Expression sich signifikant vom Hintergrund unterschied, sich signifikant zur Expression der Kontrollen unterschied sowie >1,5-fach bzw. <0,66-fach reguliert wurde.

3.5.1.4 Sind die regulierten Gene in interessante biologische Prozesse involviert?

Hierzu wurden die hochregulierten Gene der drei Interventionsgruppen in die Onlinedatenbank KEGG (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*) eingespeist (Kanehisa und Goto, 2000), um sie in einen biologisch funktionellen Zusammenhang zu stellen und die Überexpression einzelner Signalwege zu untersuchen. Drei Signalwege ließen sich in allen drei Interventionsgruppen wiederfinden:

- 1) *ECM-receptor interaction* (Extrazelluläre-Matrix-Rezeptor Interaktion) enthält verschiedene transmembranöse Makromoleküle, vorwiegend Integrine, die die Interaktion von Proteinen der Extrazellulärmatrix (Kollagene, Laminine, Fibronectin, etc.) mit der Zelloberfläche ermöglichen. Über diese Interaktion werden verschiedene Zellfunktionen, wie Adhäsion, Migration, Differenzierung, Proliferation und Apoptose, gesteuert. Außerdem dienen sie als Mechanorezeptoren und übertragen physikalische Kräfte zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix (Kim et al., 2011).
- 2) *Glycolysis / Gluconeogenesis* (Glykolyse / Gluconeogenese) ist ein zentraler Stoffwechselweg zur Gewinnung von ATP aus Glukose (Kolwicz und Tian, 2011).
- 3) *Ribosome* (Ribosom) enthält ribosomale Proteine, die elementar für die Translation der mRNA in Proteine sind.

3 Ergebnisse

Die Überexpression der Signalwege *ECM-receptor-interaction* und *Glycolysis / Gluconeogenesis* wurden als Hinweise auf funktionelle Veränderungen in diesen Prozessen gesehen und unter 3.6, S. 79 und 3.7, S. 81 näher untersucht.

Tabelle 3.4: KEGG-Signalweg-Analyse der hochregulierten Gene von Akute Nachlasterhöhung gegen Kontrolle

Akute Nachlasterhöhung gegen Kontrolle		
KEGG-ID	Bezeichnung	p-Wert
rno04110:	<i>Cell cycle</i>	0,0004
rno04114:	<i>Oocyte meiosis</i>	0,0005
rno04914:	<i>Progesterone-mediated oocyte maturation</i>	0,0047
rno04120:	<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	0,0048
rno03010:	<i>Ribosome</i>	0,0127
rno03030:	<i>DNA replication</i>	0,0207
rno03040:	<i>Spliceosome</i>	0,0304
rno04512:	<i>ECM-receptor interaction</i>	0,0360
rno03420:	<i>Nucleotide excision repair</i>	0,0406
rno04115:	<i>p53 signaling pathway</i>	0,0494
rno00020:	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	0,0616
rno00480:	<i>Glutathione metabolism</i>	0,0645
rno00900:	<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	0,0659
rno03018:	<i>RNA degradation</i>	0,0942
rno04540:	<i>Gap junction</i>	0,0994
rno00010:	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	0,1116
rno03430:	<i>Mismatch repair</i>	0,1431

Ergebnis nach Einspeisung der hochregulierten Gene in die KEGG-Datenbank. Die verändert exprimierte Gene ließen sich den aufgelisteten Signalwegen zuordnen. Die farbig hinterlegten Signalwege waren in allen Interventionsgruppen verändert exprimiert (vgl. Tabelle 3.5 und Tabelle 3.6). Test: *EASE-Score* (Modifizierter *Fisher Exact Score*).

Tabelle 3.5: KEGG-Signalweg-Analyse der hochregulierten Gene von Endothelin-1 gegen Kontrolle

Endothelin-1 gegen Kontrolle		
KEGG-ID	Bezeichnung	p-Wert
rno04512:	<i>ECM-receptor interaction</i>	$1,34 \cdot 10^{-7}$
rno04510:	<i>Focal adhesion</i>	0,0003
rno00010:	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	0,0004
rno00051:	<i>Fructose and mannose metabolism</i>	0,0048
rno04621:	<i>NOD-like receptor signaling pathway</i>	0,0109
rno04914:	<i>Progesterone-mediated oocyte maturation</i>	0,0114
rno00030:	<i>Pentose phosphate pathway</i>	0,0147
rno03010:	<i>Ribosome</i>	0,0343
rno05222:	<i>Small cell lung cancer</i>	0,0343
rno00900:	<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	0,0362
rno00500:	<i>Starch and sucrose metabolism</i>	0,0460
rno00052:	<i>Galactose metabolism</i>	0,0955
rno04350:	<i>TGF-beta signaling pathway</i>	0,1178
rno04110:	<i>Cell cycle</i>	0,1403

Tabelle 3.6: KEGG-Signalweg-Analyse der hochregulierten Gene von Phenylephrin gegen Kontrolle

Phenylephrin gegen Kontrolle		
KEGG-ID	Bezeichnung	p-Wert
rno03010:	<i>Ribosome</i>	$4,35 \cdot 10^{-7}$
rno00010:	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	$5,34 \cdot 10^{-7}$
rno00330:	<i>Arginine and proline metabolism</i>	$2,72 \cdot 10^{-7}$
rno00030:	<i>Pentose phosphate pathway</i>	0,0026
rno04512:	<i>ECM-receptor interaction</i>	0,0059
rno05222:	<i>Small cell lung cancer</i>	0,0069
rno00051:	<i>Fructose and mannose metabolism</i>	0,0093
rno00052:	<i>Galactose metabolism</i>	0,0157
rno00500:	<i>Starch and sucrose metabolism</i>	0,0171
rno03320:	<i>PPAR signaling pathway</i>	0,0264
rno04510:	<i>Focal adhesion</i>	0,0302
rno00100:	<i>Steroid biosynthesis</i>	0,0308
rno00380:	<i>Tryptophan metabolism</i>	0,0309
rno00480:	<i>Glutathione metabolism</i>	0,0541
rno00790:	<i>Folate biosynthesis</i>	0,0615
rno05200:	<i>Pathways in cancer</i>	0,0641
rno05211:	<i>Renal cell carcinoma</i>	0,0644
rno04150:	<i>mTOR signaling pathway</i>	0,0664
rno00910:	<i>Nitrogen metabolism</i>	0,0671
rno00620:	<i>Pyruvate metabolism</i>	0,0756
rno00310:	<i>Lysine degradation</i>	0,0875
rno04910:	<i>Insulin signaling pathway</i>	0,0948
rno00520:	<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	0,1001
rno00900:	<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	0,1117
rno04012:	<i>ErbB signaling pathway</i>	0,1383

3.5.1.5 Sind in der Genliste mehr biologische Prozesse überrepräsentiert, als in einer zufällig zusammengestellten Liste?

Zur Anwendung dieses Kriteriums wurden drei Genlisten erstellt, jeweils mit 1036 Genen (Anzahl der regulierten Gene in der Gruppe der akuten Nachlasterhöhung). Für die Erstellung dieser Listen wurden die 21.519 auf dem *Illumina*[®]-*Chip* vertretenen Gene auf die Internet-Seite <http://www.textmechanic.com> hochgeladen und mit dem Werkzeug *Randomize List* drei zufällig zusammengestellte Listen angefertigt. Von jeder dieser Listen wurden die oberen 1.036 Gene in die Online Datenbank *DAVID-Bioinformatics* eingespeist und auf Anreicherungen von biologischen Prozessen untersucht. Mit der Liste der regulierten Gene in der Gruppe mit akuter Nachlasterhöhung wurde identisch verfahren.

Für die EHTs mit Nachlasterhöhung ergaben sich 514, für die zufälligen Listen 174, 144, bzw. 108 Überrepräsentationen von biologischen Prozessen. Wie von Huang da et al. (2009) empfohlen, wurde ein Vergleich der p-Werte dieser Anreicherungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Tendenz zu niedrigeren p-Werten in der Gruppe der akuten Nachlasterhöhung (Abb. 3.17). Es fanden sich also mehr angereicherte biologische Prozesse in der Gruppe der Nachlasterhöhung als in den zufälligen Genlisten und das bei einem viel höheren Signifikanzniveau.

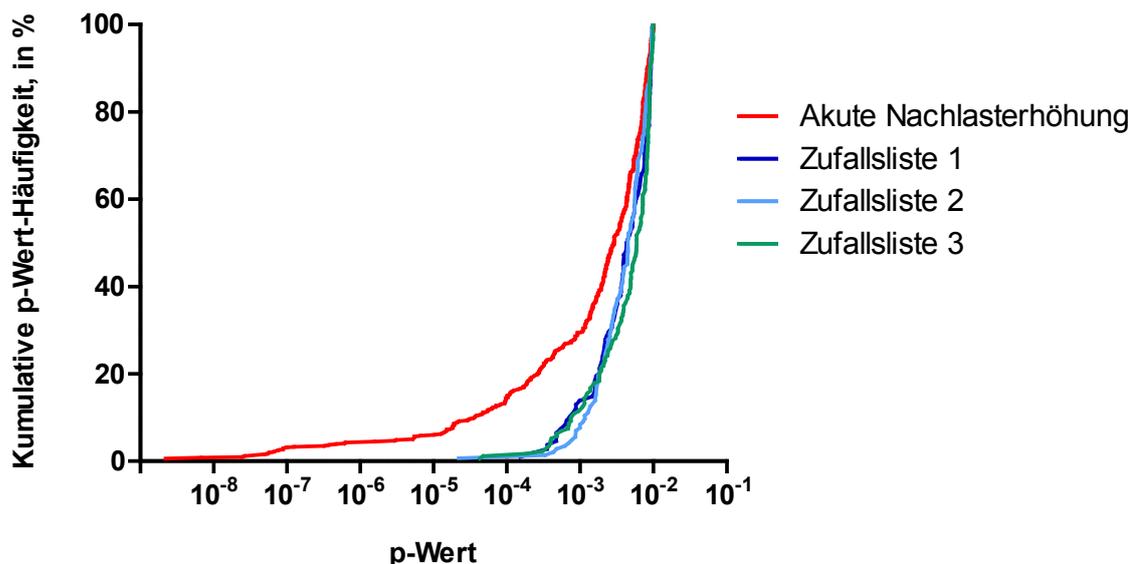


Abb. 3.17: Vergleich der p-Wert-Häufigkeitsverteilung der Anreicherung biologischer Prozesse in der Gruppe der Nachlasterhöhung mit zufällig zusammengestellten Genlisten. Die Anreicherungen in der Genliste der akuten Nachlasterhöhung tendierten deutlich zu signifikanteren p-Werten. Innerhalb der zufällig zusammengestellten Listen zeigten die Anreicherungen eine sehr ähnliche Verteilung der p-Werte.

3 Ergebnisse

3.5.1.6 Sind die Ergebnisse reproduzierbar, z. B. durch unabhängige Versuche unter den gleichen Bedingungen?

In jeder der vier aufgetragenen Gruppen wurde eine Probe doppelt aufgetragen, um als technische Kontrolle die Standardisierung des Verfahrens zu überprüfen (Abb. 3.18). Dass die geringe Streuung für die technischen Replikate nicht nur für β -MHC galt, beweist die Cluster-Analyse (siehe 3.5.2) bei der die wiederholt aufgetragenen Proben sehr ähnliche Werte erzielten.

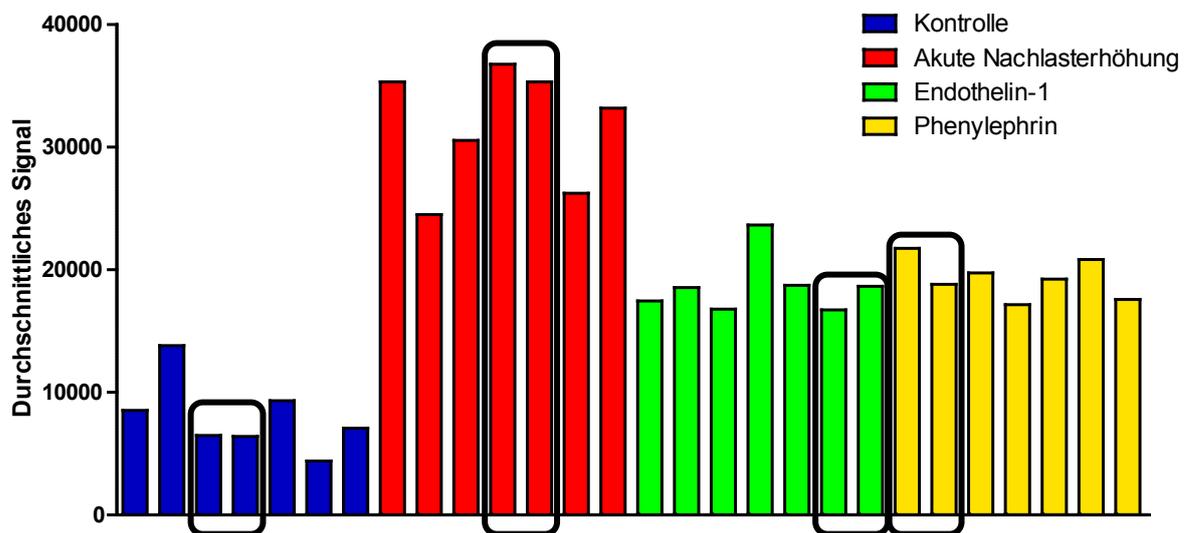


Abb. 3.18: Rohdaten der Chip-Analyse für β -MHC. Gezeigt sind alle auf den Chip aufgetragenen Proben mit dem Durchschnittssignal für β -MHC. In jeder Gruppe wurde eine Probe doppelt aufgetragen (schwarze Umrandung). Neben der geringen Streuung dieser technischen Replikate, fällt auf, dass auch die biologischen Replikate eine hohe Gleichmäßigkeit aufwiesen.

3.5.1.7 Lassen sich die Ergebnisse durch andere Laborversuche bestätigen?

Beim Vergleich der durch den Illumina[®]-Chip ermittelten Expressionsveränderungen der Vertreter des fetalen Genprogramms (siehe Abb. 3.16, S. 60) mit den Ergebnissen der qPCR (siehe Abb. 3.10, S. 60) lassen sich in beiden Fällen eine Aktivierung des fetalen Genprogramms feststellen. Für ANP und β -MHC ließen sich diese Ergebnisse auch auf Proteinebene nachvollziehen (siehe 3.3.2, S. 60).

3.5.2 Konkordanz der Transkriptome

Es sollte untersucht werden, inwieweit sich die Transkriptome der untersuchten Gruppen ähneln oder unterscheiden. Dazu wurde eine Clusteranalyse der gesamten Transkriptome angefertigt. Die Venn-Diagramme beinhalten hingegen ausschließlich die signifikant regulierten Gene.

3.5.2.1 Cluster-Analyse

Bei der Cluster-Analyse wurden die Transkriptome der einzelnen EHTs auf Ähnlichkeit in ihrer Genexpression untersucht:

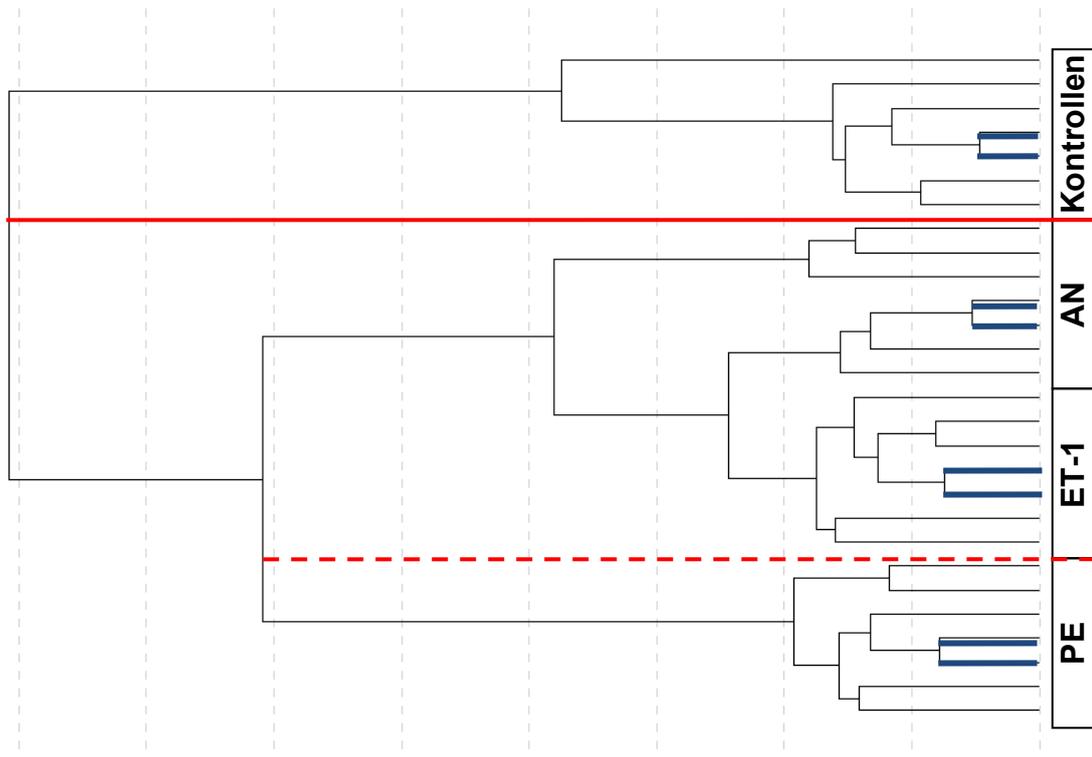


Abb. 3.19: Transkriptom-Cluster-Analyse. Je ähnlicher sich das Transkriptom zweier Proben darstellt, desto weiter rechts trennen sich ihre Linien.

Alle Interventionsgruppen unterschieden sich deutlich von der Kontrollgruppe (Abb. 3.19, rote durchgezogene Linie). Die Transkriptome der AN-Gruppe und der Endothelin-1-Gruppe ähnelten sich sehr und ließen sich von der Phenylephrin-Gruppe abgrenzen (Abb. 3.19, gestrichelte rote Linie). Die technischen Replikate (blaue waagrechte Linien, Abb. 3.19) lagen in der Cluster-Analyse exakt neben ihren „Partner-Proben“, was die Qualität des Verfahrens betonte (vgl. 3.5.1.5).

3.5.2.2 Venn-Diagramme

Die Darstellung in Venn-Diagrammen zeigte, dass ein Großteil der regulierten Gene, sowohl hoch als auch runter, in allen Gruppen verändert exprimiert wurden. Bei den hochregulierten Genen teilt sich die Endothelin-1-Gruppe weitere 46 Gene mit der Gruppe der Nachlasterhöhung und 96 Gene mit der Phenylephrin-Gruppe. 115 Gene waren nur durch Nachlasterhöhung und durch Stimulation mit Phenylephrin hochreguliert. Bei den herunter regulierten Genen ist die Verteilung ähnlich, allerdings teilen sich die Endothelin-1-Gruppe und die Gruppe der Nachlasterhöhung nur 8 Gene, während 77 ausschließlich in den

3 Ergebnisse

pharmakologisch induzierten Hypertrophiegruppen verändert exprimiert wurden und 72 durch Phenylephrin und erhöhter Nachlast (Abb. 3.20 A und B).

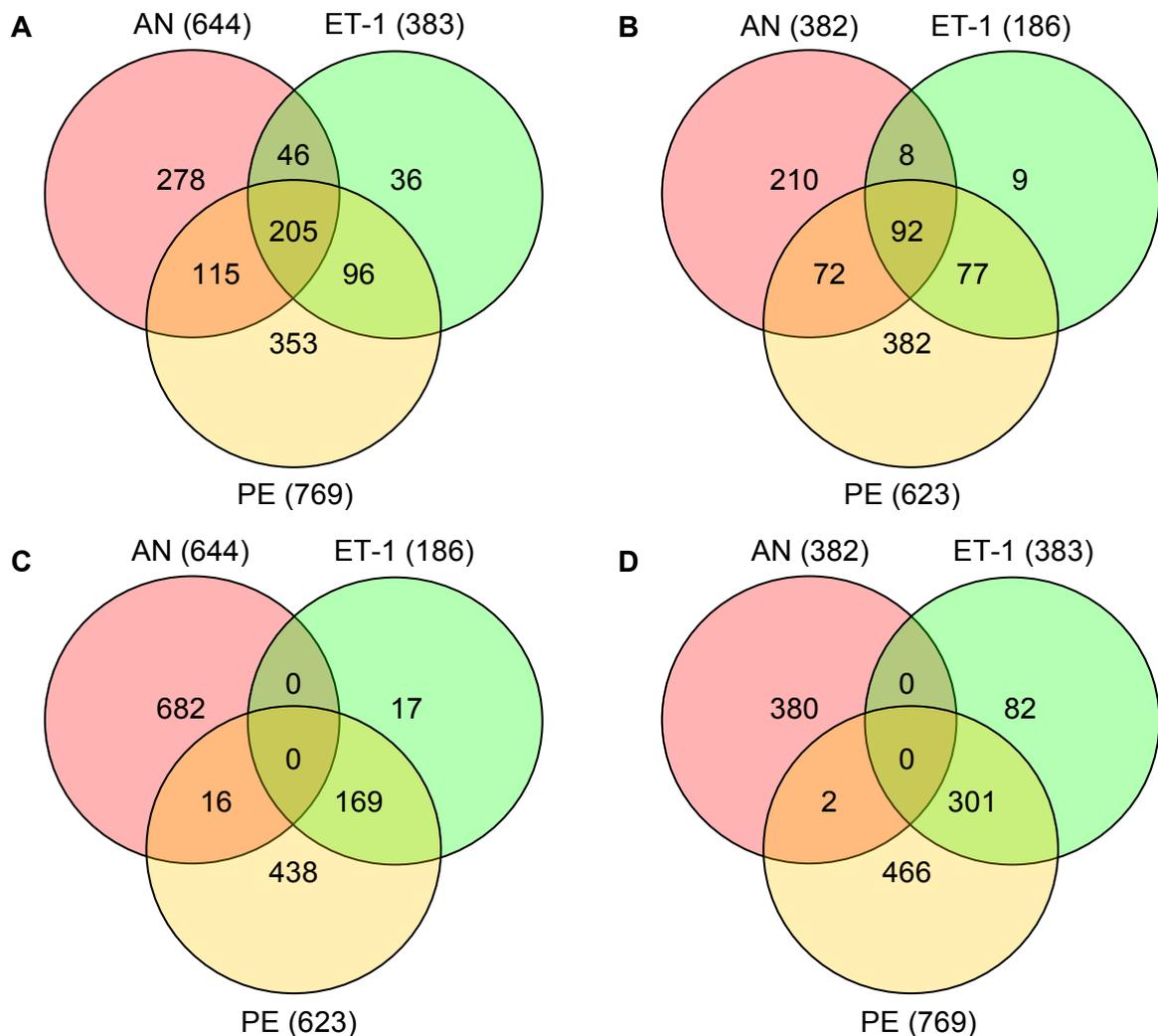


Abb. 3.20: Venn-Diagramm der Transkriptionsanalyse. A: Mengendarstellung der hochregulierten Gene. 205 Gene waren in allen Gruppen hochreguliert (nur signifikant hochregulierte Gene mit >1,5-facher Expression). B: Mengendarstellung der herunter regulierten Gene. 92 Gene waren in allen Gruppen herunter reguliert (nur signifikant herunter regulierte Gene mit <0,66-facher Expression). C: Mengendarstellung der bei AN hochregulierten und bei PE und ET-1 herab regulierten Gene. D: Mengendarstellung der bei AN herab regulierten und bei PE und ET-1 hoch regulierten Gene.

Um eventuelle Unterschiede zwischen der mechanischen Belastung und der pharmakologischen Stimulation aufzudecken, wurden auch Diagramme angefertigt, die untersuchten, ob es Gene gibt, die unter akuter Nachlast hoch und durch chemische Behandlung herab reguliert wurden (Abb. 3.20, C), bzw. umgekehrt (Abb. 3.20, D). Dabei wiesen 16 Gene eine Expressionszunahme durch akute Nachlasterhöhung und eine Abnahme unter Phenylephrin-Behandlung auf (Tabelle 3.7). Für den umgekehrten Fall

3 Ergebnisse

fanden sich 2 Gene. Endothelin-1-Behandlung zeigte keine gegengesetzten Expressionsveränderungen zur Gruppe der Nachlasterhöhung.

Tabelle 3.7 Entgegengesetzte Expressionsveränderungen durch Nachlasterhöhung und Phenylephrinstimulation

Nachlasterhöhung hoch, Phenylephrin herab regulierte Gene			
Gensymbol	FC AN	FC PE	Name
<i>Ccnb2</i>	1,96	0,50	<i>Cyclin B2</i>
<i>Cdc20</i>	1,72	0,62	<i>Cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i>
<i>Cdk1</i>	1,71	0,51	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
<i>Cdkn3</i>	1,96	0,57	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 3</i>
<i>Col14a1</i>	1,51	0,61	<i>Collagen, type XIV, alpha 1</i>
<i>Dlgap5</i>	1,60	0,59	<i>Discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5</i>
<i>Emr1</i>	1,62	0,66	<i>EGF-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1</i>
<i>Gja5</i>	1,51	0,64	<i>Gap junction protein, alpha 5</i>
<i>Itgb1</i>	1,72	0,61	<i>Integrin, beta-like 1</i>
<i>Kif20a</i>	1,94	0,47	<i>Kinesin family member 20A</i>
<i>RGD1565395</i>	2,00	0,65	<i>Similar to stathmin 1/oncoprotein</i>
<i>Rrm2</i>	1,93	0,54	<i>Ribonucleotide reductase M2</i>
<i>Spc24-ps1</i>	1,58	0,64	<i>SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae), pseudogene 1</i>
<i>Traf4af1</i>	1,78	0,54	<i>TRAF4 associated factor 1</i>
<i>Ube2c</i>	1,66	0,56	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2C</i>
<i>Ube2t</i>	2,14	0,64	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2T</i>

(Interessante Gene sind farbig markiert)

Unter den entgegengesetzt exprimierten Genen fanden sich diverse Zellzyklus-assoziierte Gene (hellblau in Tabelle 3.7), Extrazellulärmatrix-assoziierte Gene (rot) und *Gja5*, das Gen des vorwiegend in den Vorhöfen exprimierten Connexin 40 (violett). Nexilin, ein Protein, das für die Bindung von Actin an die Zonulae adherentes innerhalb der Glanzstreifen zuständig und somit auch Teil der Kraftübertragung auf Matrixproteine ist, wurde herab reguliert für die Gruppe der Nachlasterhöhung und hoch reguliert durch Phenylephrin-Behandlung (Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Entgegengesetzte Expressionsveränderungen durch Nachlasterhöhung und Phenylephrinstimulation

Nachlasterhöhung herab, Phenylephrin hoch regulierte Gene			
Gensymbol	FC AN	FC PE	Name
<i>Eef1a1</i>	0,57	2,43	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i>
<i>Nexn</i>	0,55	1,64	<i>Nexilin</i>

(Interessante Gene sind farbig markiert)

3.5.3 Vergleich der akuten Nachlasterhöhung im EHT mit *Transverse Aortic Constriction* im Versuchstier

Die Genliste des *Illumina*[®]-Chips bot die Möglichkeit, die durch akute Nachlast hervorgerufenen Änderungen des Transkriptom im EHT mit den Transkriptveränderungen nach Erhöhung der Nachlast im Versuchstier zu vergleichen. Da in der Literatur keine genomweiten Transkriptanalysen von Rattenherzen nach TAC gefunden wurden, wurden zunächst die 21.519 Gene des *Illumina*[®]-Chips in Gene der Spezies Maus übersetzt. Nun ließen sie sich mit zwei Datensätzen von Mäusen nach TAC vergleichen. Der erste Datensatz (TAC I) von Toischer et. al. (2010) basierte auf einer *Affymetrix*[®] *expression analysis*, der zweite Datensatz (TAC II) stammte von Lee et al. (2011) und wurde durch *RNA-Sequencing* gewonnen. TAC II beinhaltet Daten nach Kurzzeit-TAC (hypertrophes Stadium) und Langzeit-TAC (dekompensiertes Stadium).

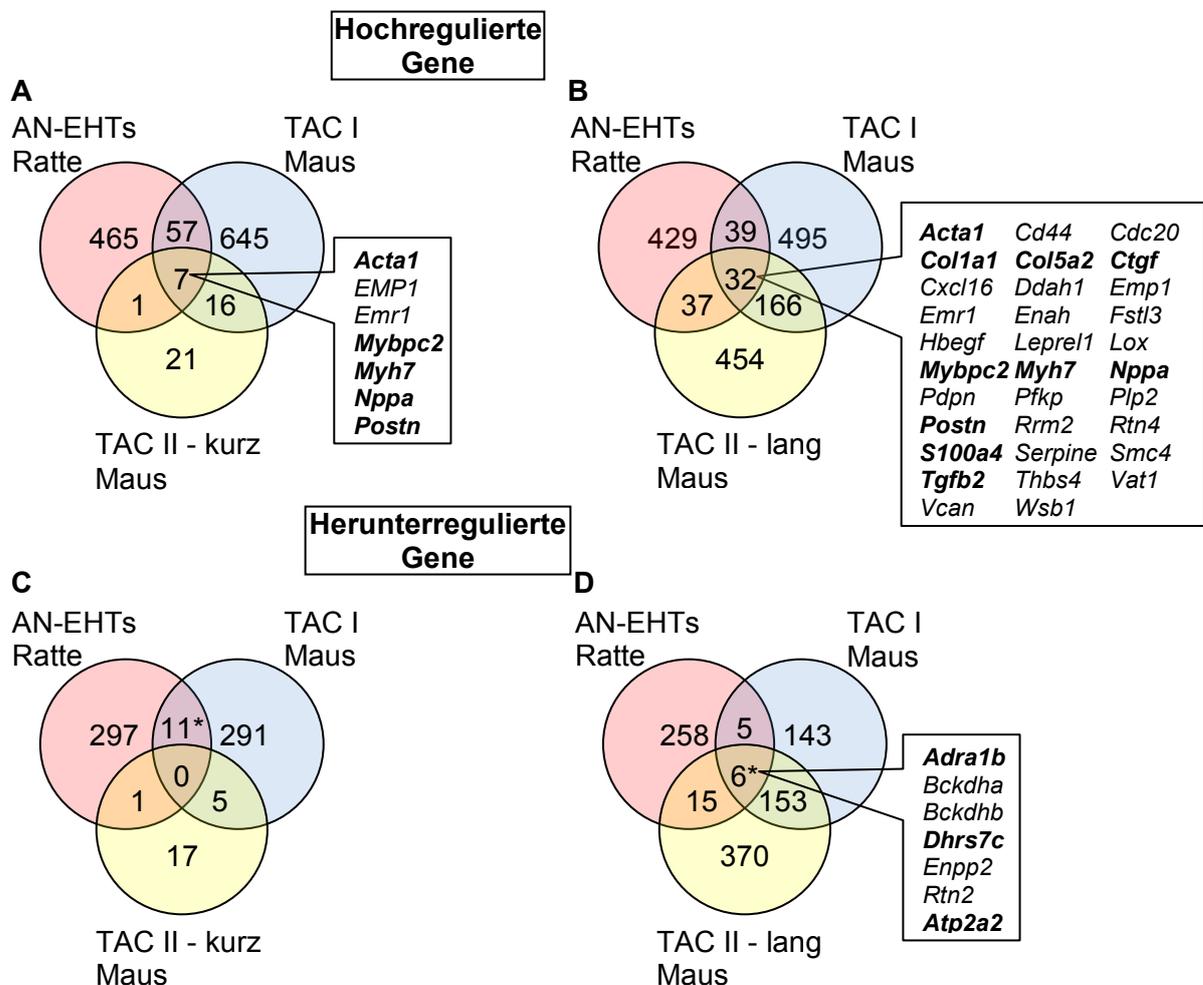


Abb. 3.21 Vergleich regulierter Gene zwischen EHTs mit akuter Nachlasterhöhung und Mäusen nach TAC. TAC I und II entstammen der Literatur. A und B: hochregulierte Gene. C und D: Herunterregulierte Gene. TAC II beinhaltet Daten für Kurzzeit-TAC (1 Woche; A, C) und Langzeit-TAC (8 Wochen; B, D). Die Herabregulation von SERCA2a (*Atp2a2*) wurde durch den *Illumina*[®]-Chip nicht detektiert, * markiert seine Position nach qPCR-Ergebnissen.

3 Ergebnisse

Sieben Gene waren unabhängig von Spezies und Analysetechnik in allen drei Formen der Nachlasterhöhung hochreguliert (unter ihnen: *Myh7*, *Acta1*, *Nppa*; Abb. 3.21, A). Durch den Vergleich mit den Daten der Langzeit-TAC stieg die Anzahl der in allen Gruppen hochregulierten Gene und wurde ergänzt durch Proteine der Extrazellulärmatrix und profibrotische bzw. Fibroblasten-spezifische Faktoren (Abb. 3.21, B). Unter den in allen Gruppen herunterregulierten Genen fanden sich *Adra1b* (α -1B-Adrenozeptor) und *Atp2a2* (SERCA2a; Abb. 3.21, D).

3.6 Untersuchung des Energiestoffwechsels in hypertrophierten EHTs

3.6.1 Veränderungen des Glukoseverbrauchs

Durch die unter 3.2.2 beschriebene Evaluation der EHTs mittels Blutgasanalyse konnte eine Aussage über den in den Geweben ablaufenden Glukoseverbrauch getroffen werden. Dabei fiel auf, dass die chemisch stimulierten EHTs einen deutlich erhöhten Glukosebedarf aufwiesen. Dieser war am höchsten in der mit Phenylephrin behandelten Gruppe (Abb. 3.22, A). Die mechanische Nachlasterhöhung führte tendenziell ebenfalls zu einer Erhöhung des Glukosebedarfs, unterschied sich aber nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Eine Korrelation des Glukoseverbrauchs mit der Schlagfrequenz der EHTs zeigte, dass prinzipiell eine hohe Frequenz zu einem hohen Glukoseverbrauch führt, dies aber nicht der einzige Faktor zu sein scheint (Abb. 3.22, B), da selbst bei sehr ähnlichen Schlagfrequenzen einzelne EHTs einen deutlich unterschiedlichen Glukosebedarf zeigten (vgl. EHTs mit einer Frequenz von ca. 80 bpm). Außerdem schien es eine Obergrenze der Glukoseaufnahme in die EHTs bei ca. 1,3 mg zu geben, was einem Verbrauch von 87% der im Medium vorhandenen Glukose entsprach.

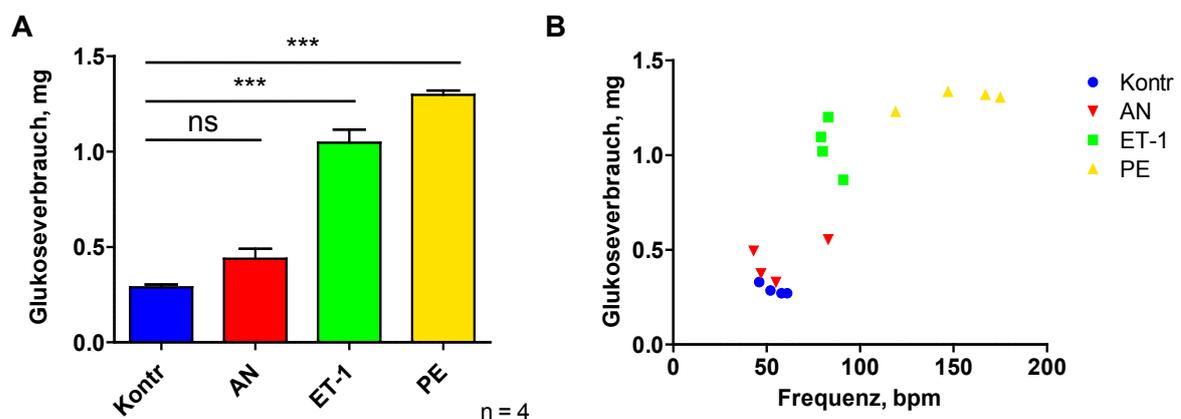


Abb. 3.22: Glukoseverbrauch der EHTs. A: Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM des Glukoseverbrauchs, gemessen mittels Blutgasanalyse nach 24 Stunden Inkubation in mg (Kontr: Kontrolle, AN: Akute Nachlasterhöhung, ET-1: Endothelin-1, PE: Phenylephrin). Es zeigte sich ein signifikanter Mehrverbrauch in den chemischen Interventionsgruppen, ($n = 4$, *One-Way-ANOVA*). B: Korrelation von Frequenz (videoptische Messung; in bpm) und Glukoseverbrauch (BGA aus Medienüberstand, in mg) aller Versuchsgruppen. Es zeigte sich ein gewisser Zusammenhang zwischen Frequenz und Glukoseverbrauch über alle Gruppen hinweg.

3.6.2 Messung der Luciferaseaktivität – Bioluminescence Imaging

Die durch die Luciferase katalysierte Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin und die dabei stattfindende Photonenemission benötigt als Energiequelle Adenosintriphosphat (ATP). Das

3 Ergebnisse

Biolumineszenz-Signal ist also von der lokalen ATP-Konzentration abhängig. Es wurden EHTs aus neonatalen Herzen einer transgenen Rattenlinie mit ubiquitärer Expression der Glühwürmchen-Luciferase hergestellt und die maximale Photonemission nach Zugabe von 4,5 µg/ml Luciferin gemessen.

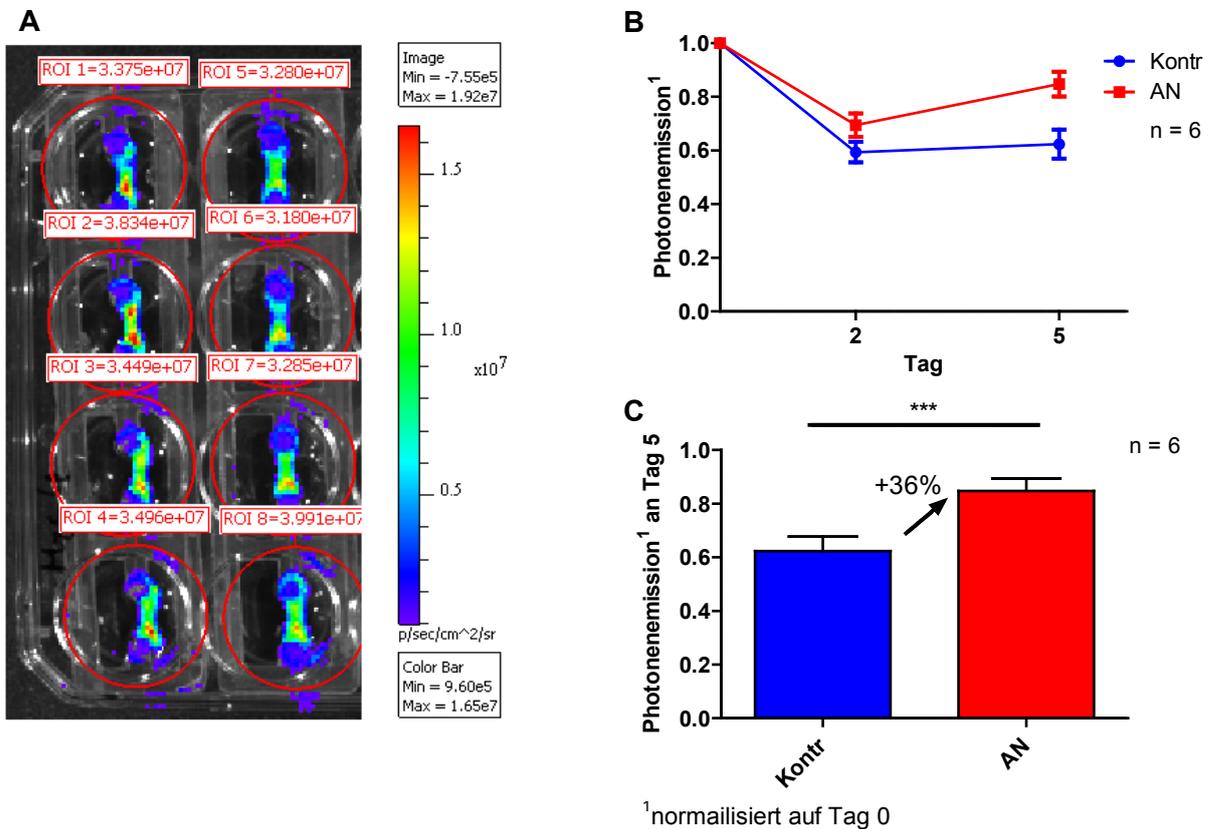


Abb. 3.23: Messung der Luciferaseaktivität. A: Ausschnitt der Aufnahme der CCD-Kamera mit 8 Luciferase-positiven EHTs. Die Farben kodieren die Signalstärke in photons/s/cm²/sr. B: Aufgetragen sind die Mittelwerte + SEM der maximalen Photonemission nach Zugabe von 4,5 µg/ml Luciferin gemessen an Tag 0, 2, 5 der Nachlasterhöhung, normalisiert auf Tag 0 (Kontr: Kontrolle, AN: Akute Nachlasterhöhung; n = 6). Nach einem initialen Abfall der Photonemission in beiden Gruppen (Tag 2), nahm die Lumineszenz der Gruppe mit akuter Nachlasterhöhung im Verlauf deutlich zu (Tag 5). C: Mittelwert + SEM der Photonemission normalisiert auf Tag 0, gemessen an Tag 5. Im Vergleich zur Kontrolle wies die Gruppe der akuten Nachlasterhöhung eine Zunahme der Photonemission um 36% auf. Statistik: *Two-Way-ANOVA*, p<0,001.

Beide Gruppen zeigten einen initialen Abfall der Signalintensität. Die Gruppe der akuten Nachlasterhöhung wies am Ende der Interventionszeit eine Zunahme der Photonemission um 36% im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

3.7 Zunahme des Bindegewebes – Fibrose

3.7.1 Fibrose im EHT auf Transkriptionsebene

Die Fibrosierung des Herzmuskelgewebes ist ein elementarer Bestandteil einer pathologischen Herzhypertrophie und bezeichnet eine Zunahme des extrazellulären Bindegewebes, im Herzen vor allem bestehend aus Kollagen I, Kollagen III, Fibronectin etc. (Hein und Schaper, 2001). Nachdem die genomweite Transkript-Analyse Hinweise ergab, dass die Signalwege der Extrazellulärmatrix-Zell-Interaktion in allen Interventionsgruppen hochreguliert wurden (vgl. 3.5.1.4, S. 69), wurde nun die Zunahme der extrazellulären Matrixproteine überprüft. Auf Transkriptionsebene konnten als Vertreter dieser Proteine die α -Untereinheit von Kollagen I und Fibronectin vermehrt exprimiert gemessen werden. Die Kollagen-III- α -Untereinheit wurde für die Akute Nachlasterhöhung nicht signifikant, für Endothelin-1 leicht erhöht und für Phenylephrin leicht reduziert gemessen. Bestandteile elastischer Fasern, wie Elastin und Fibrillin 1, waren in allen Gruppen signifikant herunterreguliert (Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9: Expressionsveränderung der Extrazellulärmatrix

Gensymbol	Beschreibung	AN	ET-1	PE
Matrixproteine				
<i>Col1a1</i>	Kollagen I, α -Untereinheit	1,55***	1,81***	1,33**
<i>Col3a1</i>	Kollagen III, α -Untereinheit	(1.27 ns)	1.25 *	0.68 ***
<i>Fn1</i>	Fibronectin, Typ I	1,48***	2,16***	2,08***
<i>Eln</i>	Elastin	0.40 ***	0.51*	0.12 ***
<i>Fbn1</i>	Fibrillin 1	0.55 ***	0.64 ***	0.51 ***
<i>Fbn2</i>	Fibrillin 2	(0.93 ns)	(0.89 ns)	0.68 ***
Wachstumsfaktoren				
<i>Tgfb1</i>	<i>Transforming-growth-factor-β1</i>	(0.79 ns)	(1.06 ns)	(1.17 ns)
<i>Tgfb2</i>	<i>Transforming-growth-factor-β2</i>	1,66***	1,57***	1,42***
<i>Ctgf</i>	<i>Connective tissue growth factor</i>	1,92***	1,86***	1,7***
<i>Fgf2</i>	<i>Fibroblast growth factor 2</i>	(1,11 ns)	1,28**	1,42**

Vielfache Expression der mRNA für *Col1a1*, *Col3a1*, *Fn1*, *Eln*, *Fbn1*, *Fbn2*, *Tgfb1*, *Ctgf* und *Fgf2* im Vergleich Intervention gegen Kontrolle; aus dem Datensatz der genomweiten Chipanalyse entnommen (n = 6, ***p<0,001, **p<0,01, * p<0,05, ns (nicht signifikant): p \geq 0,05).

Außerdem wurde die Transkription von *connective tissue growth factor* (*Ctgf*) in den Interventionsgruppen erhöht, ein Wachstumsfaktor, der durch die *Transforming-growth-factor- β* -(TGF- β)-Signalkaskade aktiviert wird. TGF- β -1 selbst war nicht signifikant verändert,

3 Ergebnisse

allerdings zeigte TGF- β -2 eine Expressionssteigerung in allen Interventionsgruppen. Das Elastin-Kollagen-Verhältnis, als Parameter für die Steifheit der EHTs, nahm in allen Interventionsgruppen stark ab (Abb. 3.24).

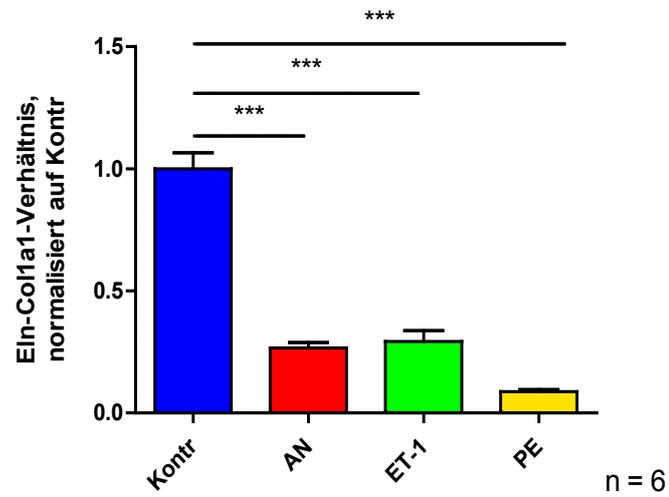


Abb. 3.24: Eln-Col1a1-Verhältnis, gezeigt ist das Verhältnis der Expression von Elastin (Eln) zu Kollagen 1 (Col1a1), n = 6:

3.7.2 Fibrose im EHT auf Proteinebene

Die Zunahme des Bindegewebes wurde durch immunhistochemische Färbungen von EHT-Längsschnitten mittels Kollagen-I-Antikörper verifiziert:

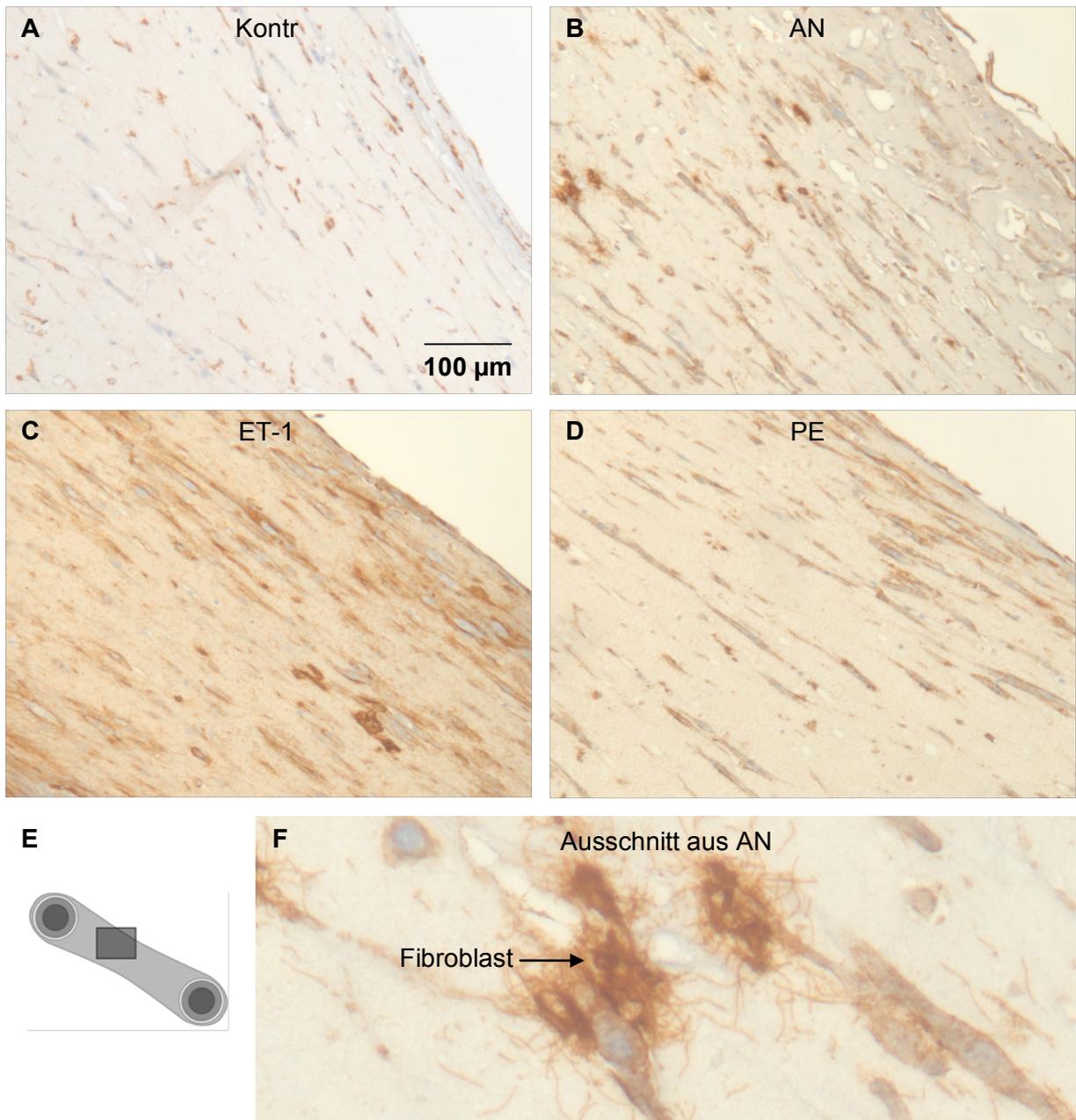


Abb. 3.25: Kollagen-1-gefärbte EHT-Längsschnitte. A: Kontrolle. B: Akute Nachlasterhöhung. C: Endothelin-1. D: Phenylephrin. Alle 10x vergrößert. E: Das Piktogramm zeigt die Position der unter A-D zu sehenden Ausschnitte. F: Ausschnittsvergrößerung aus B. Man erkennt deutlich die Zunahme des braunen Kollagensignals durch die Interventionen, wobei Endothelin-1 den stärksten Effekt aufweist. In der Ausschnittsvergrößerung sieht man feine Kollagenfibrillen konzentrisch verteilt um Fibroblasten.

Im Rahmen der Hypertrophie kam es zu einer deutlichen Fibrosierung der EHTs (Abb. 3.25), vor allem die mit Endothelin-1 behandelte Gruppe zeigte eine starke Anreicherung von Kollagen-I (Abb. 3.25 C). Die Färbung ließ deutlich die fibrilläre Struktur des Kollagens

3 Ergebnisse

erkennen. Das Signal zeigte eine für Kollagen typische Verteilung, d.h. im Bereich der Zellmembran sowie sternförmig um kardiale Fibroblasten (Abb. 3.25 F):

Um auszuschließen, dass die Zunahme des Bindegewebes auf einer Reduktion der Fibrinmatrix beruhte, z.B. ausgelöst durch Plasmin im CEE, wurde der Durchmesser der EHTs im Versuchsverlauf bestimmt. Grundlage dieser Messung waren Bilder des Video-optischen Messsystems.

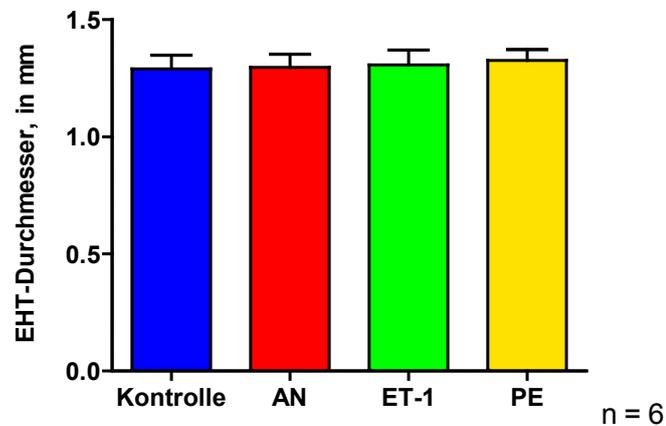


Abb. 3.26 Durchschnittlicher EHT-Durchmesser nach 5 Tagen Intervention, n = 6

Wie auf Abb. 3.26 zu sehen ist, änderte sich der mittlere EHT-Durchmesser nicht durch die Intervention, somit konnte die Zunahme des Bindegewebes nicht auf eine Abnahme der Fibrinmatrix zurückgeführt werden. Außerdem zeigt dieser Versuch, dass die Kardiomyozytenhypertrophie nicht zu einer Zunahme des gesamten EHT-Durchmessers führt.

3.8 Veränderungen der Kontraktilität

Um Auswirkungen der molekularen und strukturellen Veränderungen auf die Kontraktilität der Nachlast-erhöhten EHTs zu untersuchen, wurden mithilfe der automatischen videooptischen Messapparatur die Parameter Kraft, Frequenz, Kontraktionszeit und Relaxationszeit ermittelt.

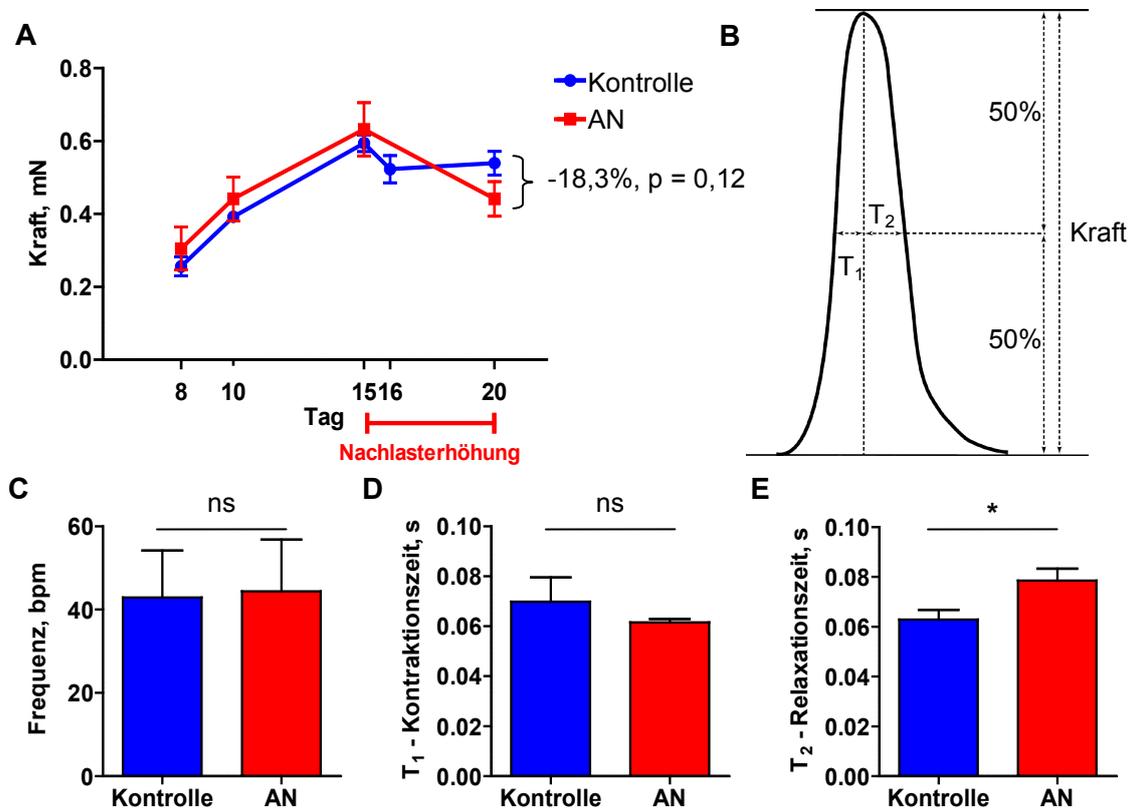


Abb. 3.27 Messung der Kontraktilität. A: Gezeigt ist die Kraft im Verlauf des Versuchs. An Tag 15 wurden die Metallbügel eingesetzt, nach Tag 20 wurde eine Messung nach Entfernung der Klammern durchgeführt. Die Gruppe der Nachlast-erhöhten EHTs zeigte einen Kraftabfall um 18,3% ($p = 0,12$). B: Illustration eines Kontraktionsablaufs mit den gemessenen Werten. T₁ und T₂ beschreiben die Zeit von 50% bis Kraftmaximum bzw. Kraftmaximum bis 50%. C: Frequenz in bpm, gemessen an Tag 20. D: Kontraktionszeit (T₁), gemessen an Tag 20. E: Relaxationszeit (T₂), gemessen an Tag 20. Die Relaxationszeit war im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Nachlastserhöhung deutlich verlängert (+25%). $n = 6$, Students t-Test für ungepaarte Messungen an Tag 20.

Die beobachtete Kraftminderung im Vergleich zu den Kontrollen nach 5 Tagen Intervention war nicht signifikant (-18,3%, $p = 0,12$). Auch die Kontrollgruppe zeigte während der Interventionszeit einen leichten Abfall der Kraft, der am ehesten mit der Entwöhnung von Pferdeserum (ab Tag 13) zu erklären war (Abb. 3.27 A). Die Kontraktionszeit (T₁) und die Relaxationszeit (T₂) sind stark frequenzabhängige Parameter. Zum Zeitpunkt der Messung war die Frequenz der untersuchten Gruppen nahezu identisch (Abb. 3.27 C). Die

3 Ergebnisse

Kontraktionszeit der EHTs mit erhöhter Nachlast war im Vergleich zur Kontrollgruppe, leicht verkürzt (Abb. 3.27 D), während die Relaxationszeit um 25% verlängert war (Abb. 3.27 E).

4 DISKUSSION

4.1 Entwicklung der Methodik

4.1.1 Das Grundprinzip

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kontraktionswiderstand künstlicher Herzmuskelkonstrukte nach einer Reifungszeit von 15 Tagen, während der sie ein spontanes Schlagmuster entwickelten, stark erhöht. Dies bedeutet für den Muskel eine zusätzliche Belastung während der Systole, bei gleich bleibender Entlastung in der Diastole. Ähnliche Bedingungen findet man beim menschliche Herzen während körperlicher Anstrengung (Schaible und Scheuer, 1985) sowie bei essentiellem Hypertonus und Aortenklappenstenose (Frohlich und Tarazi, 1979; Douglas et al., 1987). Aus diesen klinischen Situationen wissen wir, dass eine Erhöhung der Nachlast mit einer Hypertrophie der Kardiomyozyten einhergeht. Das hier entwickelte Modell sollte diese Hypertrophie unter kontrollierten Zellkulturbedingungen abbilden und so einer experimentellen Analyse zugänglich machen.

4.1.2 Künstliches Herzmuskelgewebe – EHT

Das im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie entwickelte Protokoll zur Herstellung künstlicher Herzmuskelgewebe ermöglicht die Produktion selbstständig kontrahierender Muskelkonstrukte, die eine messbare Kraft entlang eines Weges entwickeln, also Arbeit verrichten. Dabei überwinden sie erhebliche Widerstände (Hansen et al., 2010). Wie von Hansen et al. beschrieben, sind fibrinbasierte Herzmuskelkonstrukte einfach zu handhaben, sowohl Herstellung als auch Kultivierung betreffend, und die damit erzielten Ergebnisse gut reproduzierbar. Außerdem ermöglicht die Verwendung der videooptischen Messapparatur eine Evaluation der EHT-Entwicklung und Kontraktilitätsmessungen unter standardisierten, sterilen Bedingungen ohne Transfer oder Manipulation, wie bei Messungen in einem Organbad von Nöten (Eschenhagen et al., 1997).

Diese Voraussetzungen machen fibrinbasierte EHTs zu einer zuverlässigen Grundlage, um durch einfache Erhöhung des Kontraktionswiderstands die Nachlast der EHTs zu erhöhen und die Auswirkungen auf das künstliche Herzgewebe zu untersuchen. Dazu musste das beschriebene Protokoll nur minimal verändert werden. Statt der soliden Silikonstifte wurden hohle Silikonschläuche verwendet, in die passende Edelstahlbügel eingeführt werden können. Es wurde zunächst ein größeres Format gewählt, um Schwierigkeiten in der Handhabbarkeit zu vereinfachen. Das Einführen der Edelstahlbügel unter sterilen Bedingungen erwies sich jedoch als gut durchführbar, sodass die offensichtlichen Nachteile

4 Diskussion

des großen Formats, wie hoher Ressourcenverbrauch, damit einhergehende geringe Zahl biologischer Replikate, schlechte Nähr- und Sauerstoffversorgung der zentral eingebetteten Zellen und mangelnde Nutzbarkeit der für das kleinere 24-Well-Format entwickelten analytischen Verfahren für einen Wechsel auf das kleinere Format sprachen. Allerdings konnten bereits mit dem großen 6-Well-Format erste Zeichen einer Nachlast-induzierten Hypertrophie beobachtet werden.

4.1.3 Physikalische Grundlagen

Ein hohler Schlauch mit den hier verwendeten Maßen leistet einen deutlich höheren Widerstand als die von Hansen et al. verwendeten soliden Silikonstifte. Die EHTs müssen also bereits unter Kontrollbedingungen wesentlich mehr Kraft aufbringen, um den Schlauch auszulenken, sie erreichten dennoch vergleichbare Muskelverkürzungen (*fractional shortening*; Daten nicht gezeigt). Der höhere Widerstand von Tag 0 an scheint einen Trainingseffekt zu erzielen, der diese höheren Kräfte ermöglicht.

Nach Einführen der Edelstahlbügel ist die Flexion der Silikonschläuche durch die EHTs stark eingeschränkt. Die Restbewegung basiert auf der Flexion der letzten 2 mm des Schlauchs, in die der Metallbügel nicht vorgeschoben werden kann, da sie zur Abdichtung mit Silikon gefüllt werden. Die Ergebnisse der Korrelation von Auslenkung und aufzuwendender Kraft zeigen eine Widerstandserhöhung der Silikonschläuche um das 12-fache. Stark vereinfacht könnte man postulieren, dass während der Systole die Wandspannung um 1100% zunimmt und übertragen auf den Menschen würde dies einer sehr schweren Aortenstenose mit 0,15 cm² Öffnungsfläche entsprechen (Hakki et al., 1981). Die Eigenschaften dieses Modells lassen sich nicht ohne weiteres mit der Situation im Organismus vergleichen, trotzdem könnte die plötzliche immense Belastung erklären warum bei EHTs nach akuter Nachlasterhöhung Veränderungen zu beobachten sind, die im Versuchstier erst nach mehreren Wochen hypertropher Stimulation auftreten.

4.1.4 Etablierung serumfreier Medienbedingungen

Ein entscheidender Punkt für die Realisierung des Modells war die Etablierung von Medienbedingungen ohne Pferdeserum. Das Standard-EHT-Medium enthält 10% Pferdeserum, das einen seit langem bekannten hypertrophen Effekt hat (Simpson et al., 1982). Ohne Pferdeserum stellten die künstlichen Herzmuskelkonstrukte die spontanen Kontraktionen ein. Durch die sukzessive Reduktion des Serums und die Supplementierung mit Trijodthyronin (T₃) während der Intervention ließ sich der Verlust der spontanen Aktivität verhindern. Angesichts der besonderen Situation der Zellkultur war es nicht Ziel des

4 Diskussion

Versuchs, möglichst nah an den physiologischen Bereich heranzureichen, sondern die Bedingungen des Mediums mit 10% Pferdeserum in Bezug auf die Schilddrüsenhormone nachzubilden. Dessen Konzentration von freiem T_3 (fT_3), also nicht proteingebundenem und somit wirksamen Anteil, ist mit 1,0 pg/ml deutlich hypothyreat. Zum Vergleich: Mete et al. (2012) haben in sieben gesunden, 30 Tage alten Ratten eine durchschnittliche fT_3 -Konzentration von 4,38 pg/ml gemessen. Bereits die niedrigste getestete T_3 -Substitution von 0,5 ng/ml ist ausreichend, um die spontane Schlagaktivität zu erhalten und histologische Zellschädigungen zu verhindern und mit 0,7 pg/ml gemessener fT_3 -Konzentration der in Pferdeserum-Medium recht ähnlich, weshalb in den folgenden Versuchen 0,5 ng/ml T_3 eingesetzt wurde.

In allen Versuchen zeigte der Großteil der EHTs der Kontroll- und Nachlast-Gruppe eine Reduktion der spontanen Schlagaktivität unter T_3 -Behandlung. Das Ausmaß wurde als tolerabel angesehen. Bei auffällig langer Inaktivität wurden die EHTs aus Folgeversuchen ausgeschlossen (20-30%). Dies impliziert, dass T_3 alleine nicht in der Lage ist, die vielfältigen Eigenschaften des Pferdeserums zu ersetzen. Unter Pferdeserum ist prinzipiell eine Kultur bis zu 80 Tagen bei bestehender Spontanaktivität möglich (Eschenhagen et al., 2012). Neuere Versuche zeigen, dass die Zugabe von geringen Konzentrationen Hydrocortison die Ausfallrate und die spontane Aktivität deutlich verbessern (Hirt und Sörensen et al., 2012): Auch Hydrocortison ist im Pferdeserum enthalten und könnte für einen Teil des Serumeffektes verantwortlich sein.

4.1.5 Kardialer Phänotyp des künstlichen Herzmuskelgewebes

Das Standardprotokoll zur Herstellung und Kultivierung von künstlichem Herzmuskelgewebe führte zu einem gut ausgebildeten Herz-ähnlichen Phänotyp (Hansen et al., 2010). Auch unter den serumfreien Medienbedingungen und unter Verwendung der veränderten Silikonhalterungen konnte dieser Phänotyp ausgebildet werden. Die Kardiomyozyten erreichten eine gute parallele Ausrichtung entlang der Kraftlinien. Die elektronenmikroskopische Ultrastrukturanalyse offenbarte voll ausgebildete Querstreifung mit normaler Sarkomeranordnung (Z-, I-, A-, H-, M-Banden), mit großen Mitochondrien vom Crista-Typ und vereinzelt Glanzstreifen. Letztere sind für die Entwicklung von funktionellem Herzgewebe unentbehrlich, da sie die mechanischen Kontakte (*Fasciae adherentes*, Desmosomen) zur Kraftübertragung und Kontakte zur Impulsübertragung (*Gap junctions*) enthalten (Sheikh et al., 2009). Die veränderten physikalischen Bedingungen und die Entwöhnung vom Pferdeserum führen also nicht zu substantiellen Beeinträchtigungen der Kardiomyozytenentwicklung im EHT.

4.1.6 Hypertrophie durch pharmakologische Stimulation

Laut de Jonge et al. ist die Kultur von isolierten Kardiomyozyten das einzige aktuell verfügbare *in vitro* Modell, das den Vergleich der Auswirkungen verschiedener hypertropher Stimuli auf Zellgröße und Signaltransduktion ermöglicht (de Jonge et al., 2007). Um zu zeigen, dass das hier vorgestellte Modell genau diese Qualitäten erfüllt und um die gemessenen Effekte der Nachlasterhöhung einzuordnen, wurden zwei aus dem oben genannten Modell hinreichend bekannte hypertrophe chemische Stimuli eingesetzt:

Hierzu sind 20 μM Phenylephrin (α -adrenerger Agonist) und 5 nM Endothelin-1 (ET_A und ET_B Rezeptor Agonist) eingesetzt worden. Beide Substanzen aktivieren mittels ihrer Rezeptoren über $\text{G}_\text{q}/\text{G}_{11}$ -Proteine die Phospholipase C und sind bekannte Induktoren der Kardiomyozyten Hypertrophie (Münzel et al., 2005; Frank et al., 2008). Die eingesetzte Konzentration von Endothelin-1 ist im Vergleich mit ähnlichen *in vitro* Studien eher niedrig (Ito et al., 1991; de Jonge et al., 2007; Frank et al., 2008), sie ist aber ca. 8000-fach größer als die im Menschen gemessenen Plasmakonzentrationen (Miyachi et al., 1989). Beide pharmakologische Stimuli führten zu einer mit der akuten Nachlasterhöhung vergleichbaren hypertrophen Antwort, wie im Folgenden beschrieben.

4.2 Aktivierung des fetalen Genprogramms

Das hypertrophe oder fetale Genprogramm beschreibt eine Expressionssteigerung von verschiedenen Genen bei Herzhypertrophie, die auch während der frühen Herzentwicklung aktiviert sind. Dazu gehören das atriale natriuretische Peptid (ANP), *brain natriuretic peptide* (BNP), α -skeletales Aktin und die β -Isoform der schweren Kette von Myosin (β -MHC; Chien et al., 1991). Laut Dorn et al. (2003) ist es unbedingt nötig, diese Gene und zusätzlich die Sarco/Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2a) zu untersuchen, um kardiale Hypertrophie zu charakterisieren. Nur einzelne Vertreter dieser Gene seien nicht ausreichend. ANP und BNP sind Peptidhormone, die von Kardiomyozyten des Ventrikels und Atriums sezerniert werden und Einfluss auf Volumen- und Salzhaushalt nehmen. Während der kardialen Entwicklung sind sie wichtige Regulatoren des plazentaren Blutflusses (Cameron und Ellmers, 2003). α -skeletales Aktin ist eine der zwei im Herzen exprimierten Aktinisoformen. Im neonatalen Rattenherzen macht diese Isoform >50% des Anteils aus und fällt dann auf <10% im adulten Herzen ab (Boheler et al., 1991). Myosin ist ein hexameres Protein bestehend aus zwei schweren Ketten, zwei „essentiellen“ leichten Ketten und zwei „regulatorischen“ leichten Ketten. Die schweren Ketten sind für die Aktininteraktion zuständig und ihre ATPase-Aktivität ist elementar für die Umwandlung von chemischer in mechanische Kraft. Die β -Isoform von MHC hydrolysiert ATP deutlich langsamer und ist die prädominante Isoform in Ventrikeln der frühen fetalen Entwicklung. Adulte Rattenherzen exprimieren vorwiegend die α -Isoform, was durch schnellere Hydrolyse eine höhere Kontraktionsgeschwindigkeit ermöglicht. Ob eine Erhöhung des β -MHC zu α -MHC Verhältnisses für die Dekompensation der kardialen Funktion mitverantwortlich ist, wird seit vielen Jahren diskutiert (Schwartz et al., 1982; Waspe et al., 1990; Lopez et al., 2011). SERCA2a (Sarco/Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2, Typ P-ATPase) ist eine Ca^{2+} -Pumpe, die nach der Kontraktion Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol in das Sarcoplasmatische Retikulum zurückpumpt. Bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz wird SERCA2a herab reguliert, was durch die verlangsamte Ca^{2+} -Wiederaufnahme eine Verlängerung der Relaxationszeit mit sich bringt und somit direkt Auswirkungen auf die kardiale Funktion und Empfindlichkeit gegenüber Rhythmusstörungen hat (Hasenfuss et al., 1994; Tomaselli und Rose, 2000).

Wie von Dorn et. al (2003) empfohlen, wurden für diese Arbeit mittels quantitativer Realtime-PCR Expressionsveränderungen des gesamten hypertrophen Genprogramms gemessen. Es konnte eine vermehrte Expression aller Mitglieder dieser Genfamilie in allen Interventionsgruppen beobachtet werden. Die signifikante Herunter-Regulierung von SERCA2a (AN: -35,6 %, ET-1: -27,6 %, PE: -51,3 %) könnte zudem auch die beobachtete Verlängerung der Relaxationszeit erklären.

4 Diskussion

Im Verlauf der Experimente erwies sich die Messung der mRNA-Konzentrationen der hypertrophen Genfamilie als sehr stabiler Parameter, was sich auch in der genomweiten Chipanalyse bestätigte. So fanden sich z.B. für die Gruppe der Nachlastserhöhung unter den fünf am stärksten hochregulierten Genen (von insgesamt 644 hochregulierten und 22 000 untersuchten) β -MHC, α -skeletales Aktin und ANP. Die Transkriptionsveränderungen führten auch zu Veränderungen auf Proteinebene, was für β -MHC mittels Western Blot und für ANP mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte. Von den 1938 Aminosäuren unterscheiden sich die beiden schweren Myosinketten α -MHC und β -MHC in 131 (McNally et al., 1989). Die hohe Konkordanz der Proteine erschwert die genaue Differenzierung zwischen den beiden Isoformen. Laut Lopez et al. (2011) ist der in dieser Arbeit verwendete β -MHC-Antikörper der einzige auf dem Markt erhältliche, der mit ausreichender Sicherheit zwischen β -MHC und α -MHC unterscheiden kann. Die Fibrin-Matrix der EHTs bringt es mit sich, dass Proteinmessungen (z. B. nach Bradford, 1976) keine verlässlichen Werte liefern, da zelluläres Protein nicht vom Fibrin der Matrix unterschieden werden kann. Eine Normalisierung auf die Ponceau-Färbung schließt sich aus dem gleichen Grund aus. Gute Aussagen ließen sich nur durch Vergleich mit der Ladekontrolle, in diesem Fall ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated protein kinases 1 und 2*) treffen. Diese Proteinkinasen unterliegen vor allem posttranslationaler Regulation (Phosphorylierung), ihre Proteinkonzentrationen bleiben dabei stabil. Wenn man, wie in diesem Versuch, die gesamte Proteinmenge (phosphoryliert und nichtphosphoryliert) verwendet, eignen sie sich gut als Ladekontrolle.

Die ANP-Immunhistochemie zeigte in den Interventionsgruppen eine klare Zunahme der perinukleären ANP-Granula. Da ANP ein autokrines und parakrines Gewebshormon ist, wäre es vorstellbar, auch außerhalb der Zellgrenzen ein ANP-Signal zu detektieren. Dies wurde jedoch auf keinem der Schnitte beobachtet. Außerdem wurde versucht, ANP im Medienüberstand nachzuweisen, was ebenfalls nicht gelang (Daten nicht gezeigt). Dies ist vermutlich durch die starke Verdünnung zu erklären. Versuche zur Aufkonzentrierung von ANP wurden nicht durchgeführt. Nichtsdestotrotz zeigt die Zunahme von ANP und β -MHC, dass die transkriptionellen Veränderungen auch in unserem Model translationale Veränderungen nach sich ziehen.

4.3 Genomweite Transkriptomanalyse

Die genomweite Transkriptionsanalyse verdeutlicht die hohe Qualität des Modells. Sie zeigt nicht nur, dass sämtliche klassischen Vertreter des hypertrophen Genprogramms sich so verhalten, wie es für sie seit langem beschrieben wird, sondern lässt auch weiter gehende Beobachtungen zu: Die *Kegg-Pathway-Analyse* zeigt eine Überrepräsentation ribosomaler Signalwege, Extrazellulärmatrix-Interaktion und Glykolyse/Gluconeogenese unter den hoch regulierten Genen aller Interventionsgruppen.

Die Interaktion mit der Extrazellulärmatrix (ECM) ist elementar für die Arbeit eines Muskels, da hier die Kraft der Zelle auf das umliegende Gewebe übertragen wird. In allen Interventionsgruppen kam es zu einer Mehrbelastung des kontraktile Apparats, es ist daher nicht überraschend, dass diese Signalwege aktiviert wurden. Die von der ECM vermittelte mechanische Belastung kann auf verschiedenen Wegen zu einem hypertrophen Signal führen: Stresssensible Ionenkanäle reagieren beispielsweise auf Dehnung der Zellmembran mit Änderung des Aktionspotentials der Zelle und Aktivierung von *second-messenger*-Systemen (Stiber et al., 2009). Einen weiteren Mechanosensor stellen Integrine dar. Sie binden Membran-übergreifend an extrazelluläre Matrixproteine (Kollagene, Fibronectin) und intrazellulär an Aktinfilamente. Integrine übertragen dabei die physikalischen Kräfte von ECM-Proteinen auf das Zytoskelett und umgekehrt. Neben ihrer Eigenschaft als Kraft-Überträger führt die Annäherung von Integrinen aneinander zur Aktivierung mehrerer Signalwege (Brancaccio et al., 2006). Ein elementarer Bestandteil dieser Signalwege ist die rezeptorfremde Thyrosinkinase FAK (*focal adhesion kinase; Ptk2*). Bemerkenswert ist, dass sowohl für die volle Ausprägung der durch Endothelin-1- als auch der Phenylephrin-induzierten Hypertrophie Fak unbedingt benötigt wird (Eble et al., 2000; Taylor et al., 2000). Somit könnte die vermehrte Expression von FAK in allen Hypertrophiegruppen (AN: +44%, ET-1: +26%, PE: +55%, gemessen in der genomweiten Expressionsanalyse) die hohe Ähnlichkeit der Interventionsgruppen sowohl was das Ausmaß als auch was die Art der hypertrophen Antwort betrifft erklären.

Die Aktivierung der Glykolyse ist ein bekannter Bestandteil der Transkriptionsveränderung bei Herzhypertrophie (Kolwicz und Tian, 2011) und wird unter 4.6, S. 99 näher diskutiert. Verstärkte Proteinsynthese oder verminderter Abbau von Proteinen oder beides zugleich sind elementar für die Entwicklung einer Hypertrophie (Hill und Olson, 2008). Das Ribosom ist der Ort der Proteinsynthese und somit erscheint die Aktivierung ribosomaler Signalwege im hypertrophierten Kardiomyozyten als eine logische Konsequenz.

4 Diskussion

Die in anderen Versuchen bereits festgestellte hohe Ähnlichkeit der Interventionsgruppen zueinander ließ sich auch durch die Genliste bestätigen. Die Clusteranalyse zeigte eine klare Trennung der Interventionsgruppen von der Kontrollgruppe, bei Endothelin-1 und Akuter Nachlast überschritten sich einzelne EHTs sogar. Die Ähnlichkeit von Endothelin-1 und AN wird dadurch unterstrichen, dass kein Gen in diesen Gruppen entgegengesetzt reguliert wurde. 366 Gene – und damit mehr als die Hälfte der durch akute Nachlasterhöhung hochregulierten – waren auch durch Phenylephrin und / oder Endothelin-1 hochreguliert. Unter den bei akuter Nachlast hoch und unter Phenylephrin herab regulierten Genen fanden sich vor allem Zellzyklus assoziierte Gene. Auch bei der *KEGG-Pathway*-Analyse war Zellzyklus in der AN-Gruppe stark angereichert. Ob diese Ergebnisse wirklich eine Zellteilung induziert durch die Nachlasterhöhung bedeuten, wurde nicht untersucht. Am wahrscheinlichsten gehen diese Veränderungen aber auf Nicht-Kardiomyozyten im Gewebe zurück, z. B. könnte eine Proliferation der kardialen Fibroblasten dem zugrunde liegen (Kuwahara et al., 2002).

Beim Vergleich der hier beschriebenen Genliste mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigte sich eine teilweise Überschneidung der hochregulierten Gene in AN-EHTs und in Mäusen nach TAC. Auffallend war, dass sich die beiden TAC-Datensätze (TAC I und II), obwohl sie aus der gleichen Spezies gewonnen wurden und die Art der Nachlasterhöhung praktisch die Gleiche war, untereinander deutlich unterschieden. Vor diesem Hintergrund ist es umso erstaunlicher, dass sich unter den Genen, die in allen Gruppen hochreguliert waren, unabhängig von Spezies und Methode viele Vertreter des fetalen Genprogramms fanden. Die Tatsache, dass beim Hinzuziehen der Daten der Langzeit-TAC (von Lee et al.; 2011; als „*failing phenotype*“ – Herzversagen – bezeichnet) viele Fibrose-assoziierte Gene, also Kollagene und profibrotische Faktoren, die Überschneidung aller hochregulierten Gene ergänzten, deutet darauf hin, dass die akute Nachlasterhöhung im EHT bereits nach relativ kurzer Interventionszeit pathologische Folgen hat, wohingegen diese im Versuchstier erst nach mehreren Wochen Intervention erreicht werden.

4.4 Zellgrößenmessung

Der wahrscheinlich zentralste Parameter zur Beschreibung einer Hypertrophie ist die Zunahme der Zellgröße. Nach dem Laplace'schen Gesetz wird durch Zunahme der Ventrikelwanddicke die Wandspannung, die durch die hämodynamische Belastung entsteht, linear reziprok reduziert. Da Kardiomyozyten in aller Regel postpartal keine Zellteilung vollziehen, beruht diese Zunahme am ehesten auf einer Zunahme der Kardiomyozytengröße durch vermehrte Proteinsynthese sowie Organisation und Rekrutierung zusätzlicher Sarkomere oder Zunahme der extrazellulären Matrix (Hill und Olson, 2008). Die Zellgröße kann durch Anfärbung des Sarkolemmes mit Fluoreszenz gekoppelten Farbstoffen wie Weizen-Keim-Agglutinin (Heineke et al., 2007) oder Anti-Dystrophin (Campos et al., 2011) und anschließender Computer unterstützter Flächenmessung im Längs- oder Querschnitt erfolgen. Klassischerweise wird eine Zunahme der Querschnittsfläche assoziiert mit einer erhöhten Nachlast, während die Zunahme der Längsschnittsfläche einer erhöhten Vorlast zugeschrieben wird (Dorn et al., 2003). In dieser Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Färbung von Anti-Dystrophin eine Myozyten-spezifische Anfärbung der Zellmembran erreicht. Da es sich um ein Nachlastmodell handelt, wurde die Zunahme der Querschnittsfläche der Kardiomyozyten untersucht, welche mit Hilfe einer automatischen Segmentierung, deren Fehler durch einen verblindeten Untersucher korrigiert wurden, zuverlässig ermittelt werden konnten. Gegenüber Fluoreszenz-basierten Verfahren erwies sich diese Methode als stabiler und ermöglichte eine bessere Orientierung innerhalb des Gewebes, was aufgrund der im Vergleich zum Herzen geringeren Zelldichte im EHT von Vorteil war. Außerdem ermöglichte diese Methode eine Messung der Zellgröße in situ, d. h. eventuelle Artefakte, die durch Herauslösen aus der Matrix (z. B. durch enzymatischen Verdau) entstehen, konnten verhindert werden. Im Querschnitt lassen sich Zellfortsätze, am Rand getroffene Zellen und sehr kleine Zellen nicht unterscheiden, deswegen gingen, um artifizielle Ergebnisse zu verhindern, ausschließlich Zellen mit einer Mindestquerschnittsfläche von $40 \mu\text{m}^2$ in die Analyse ein. Dies entspricht einem Radius von $3,57 \mu\text{m}$. Dank der guten Längsausrichtung der Zellen im EHT wurden die Zellen bei entsprechender Präparation des Gewebes ausschließlich quer getroffen. Zellen, die nicht annähernd kreisförmig waren, wurden ausgeschlossen.

Die gemessene relative Zunahme der Querschnittsfläche in den Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich gut ausgeprägt (AN: +28,4%, PE: +40,6%, ET-1: +23,6%). Eine Größenzunahme der Kardiomyozytenquerschnittsfläche unter hypertrophen Bedingungen um ca. 30% wurde bereits zuvor beschrieben (Ago et al., 2010). Zwar lassen im Versuchstier angeblich Querschnittsflächenzunahmen bis zu 100% und mehr

4 Diskussion

beobachten, dies jedoch nach deutlich längerer Belastung (Toffolo und Ianuzzo, 1994). Die Zunahme im menschlichen Herzen ist jedoch durchaus mit unserem Modell vergleichbar. So konnte beispielsweise eine Zunahme der Kardiomyozytenquerschnittsfläche bei kompensierter Hypertrophie um +32,3%, bei dekompensierter Hypertrophie (Ejektionsfraktion <50%) um +55,2% gemessen werden (Hein et al., 2003). Auffällig ist, dass alle Interventionsgruppen eine recht ähnliche Zellgrößenzunahme aufweisen, was sich gut mit den Ergebnissen der Molekularbiologie deckt.

4.5 Fibrose

Die Zunahme des extrazellulären Bindegewebes ist ein Kerncharakteristikum der Herzhypertrophie und ein Schlüsselement des Übergangs von kompensierter Herzhypertrophie zur Herzinsuffizienz (Boluyt et al., 1994). Das Elastin-Kollagen-Verhältnis, ein Parameter der „Steifheit“ des Gewebes, scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen (Mujumdar und Tyagi, 1999). Das hier vorgestellte Modell zeigt in allen Interventionsgruppen eine Expressionszunahme von Kollagen I und Fibronectin I, zwei Hauptbestandteile der Hypertrophie assoziierten Fibrose sowie eine Herabregulation der Expression der elastischen Faserproteine Elastin und Fibrillin-1. Das Elastin-Kollagen-Verhältnis zeigt sich dementsprechend stark reduziert in den Hypertrophiegruppen (AN: -73%, ET-1: -71%, PE:-91). Nach aktuellem Wissensstand ist die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs (*transforming-growth-factor- β*) der zentrale Mechanismus zur Entstehung von Fibrose im Rahmen der Herzhypertrophie (Kuwahara et al., 2002). TGF- β kommt bei Säugetieren in drei Isoformen vor (TGF- β -1, -2 und -3). Die am besten untersuchte Isoform ist TGF- β -1. Sie wird hochreguliert bei Myokardinfarkt, erhöhter Nachlast, Kardiomyopathien und durch Angiotensin-II. Die Aktivierung von TGF- β -1 führt zu Fibroblastenproliferation, Produktion extrazellulärer Matrixproteine und verminderter Degradation der kollagenen Matrix (Lim und Zhu, 2006). Auf Transkriptionsebene konnte in unserem Modell keine Expressionsveränderung von TGF- β -1 festgestellt werden, allerdings fand sich eine signifikante Expressionssteigerung für TGF- β -2 in allen Interventionsgruppen (AN: +66%, ET-1: +57%, PE: +42%). Bei Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom ist die TGF- β -2 Sekretion im Trabekelmaschenwerk (TM) erhöht und die Produktion von Extrazellulärmatrixproteinen kann bei kultivierten TM-Zellen durch Gabe von TGF- β -2 stimuliert werden (Wordinger et al., 2007). In allen untersuchten Interventionsgruppen fand sich zusätzlich eine Herunterregulation von BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), das innerhalb der TGF- β -Signaltransduktion einen hemmenden Einfluss zu haben scheint sowie eine Hochregulation von Gremlin, einem direkten Antagonisten von BMP4 (ebd.). Außerdem wurde eine Hochregulation von Periostin beobachtet, das ein Zielprotein innerhalb des TGF- β -Signalwegs ist (Conway et al., 2011). Diese Ergebnisse deuten an, dass, auch wenn TGF- β -1 nicht verändert exprimiert wurde, die akute Nachlasterhöhung und die pharmakologischen Stimulationen im EHT zu einer Aktivierung des TGF- β -2-Signalwegs und mit zur beobachteten Fibrosierung des Gewebes geführt haben. Interessanterweise wurde in beiden Datensätzen der weiter oben beschriebenen Transkriptomanalysen in TAC-Mäusen ebenfalls eine höhere Transkriptkonzentration für TGF- β -2 nach TAC beobachtet.

4 Diskussion

CTGF (*connective tissue growth factor*), ein Zielprotein von TGF- β , zeigte sich in allen Interventionsgruppen hochreguliert. CTGF führt gemeinsam mit TGF- β zu Fibroblastenproliferation und Produktion von extrazellulären Matrixproteinen. Die Wechselwirkungen bei der Entstehung von Fibrose sind noch nicht ausreichend verstanden, es gibt jedoch Hinweise, dass die Aktivierung der Protein Kinase C eine direkte Induktion von CTGF nach sich zieht, was die beobachtete Expressionssteigerung durch Endothelin-1 und Phenylephrin erklären könnte (Leask, 2007), für Endothelin-1 ist auch eine direkte Aktivierung von CTGF beschrieben worden (Xu et al., 2004). Die Nachlasterhöhung könnte über die in der Einleitung beschriebenen Mechanosensoren zu einer CTGF Induktion führen (vgl. 1.4, S. 7). So könnte eine Integrin vermittelte Stimulation von FAK durch die biomechanische Belastung in einer Expressionssteigerung von CTGF resultieren (Graness et al., 2006). Aber auch lokale parakrine Sekretion von Gewebshormonen, wie Angiotensin und Endothelin-1, oder eine direkt durch mechanische Belastung ausgelöste Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptoren sind vorstellbar und würden zudem die hohe Ähnlichkeit der Interventionsgruppen zueinander erklären.

Der immunhistologische Nachweis von Kollagen I zeigte eine Zunahme des interstitiellen Kollagens sowohl in der Gruppe der Nachlasterhöhung als auch in pharmakologisch stimulierten EHTs. Dadurch konnte die gemessene Expressionsveränderung auch auf Translationsebene nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Vorteile von EHTs, die als funktionelles Gewebe sowohl Kardiomyozyten als auch Fibroblasten enthalten und durch die Kommunikation dieser verschiedenen Zelltypen komplexe Vorgänge wie die Entstehung von Fibrose ermöglichen. Das verdeutlicht zudem einen Vorteil der Fibrinmatrix gegenüber der in früheren Versuchen verwendeten Kollagenmatrix, die eine immunhistologische Färbung von Kollagen I nicht ermöglicht hätte (Zimmermann et al., 2006).

4.6 Veränderung des Stoffwechsels

Das erwachsene Herz gewinnt seine Energie vorwiegend durch Oxidation von Fettsäuren (60-90%; der Anteil von Glukose am Energiestoffwechsel beträgt ca. 10-40 %). Unter hypertrophen Bedingungen findet eine gesteigerte Glykolyse bei gleichzeitiger Reduktion des Fettsäurestoffwechsels statt, sodass der Anteil von Glukose am gesamten Energiestoffwechsel den der Fettsäuren übersteigt (Neubauer, 2007). Es ist umstritten, ob dieser Wechsel der Energiesubstrate eine Maladaptation bedeutet oder einen protektiven Charakter hat. So könnte die langsamere ATP-Produktion der Glykolyse zu einem Mangel an energiereichen Phosphaten führen und damit die Kontraktilität beeinflussen (Ingwall, 2009). Da aber pro gewonnenes ATP durch Glykolyse weniger Sauerstoff benötigt wird, als durch Fettsäure-Oxidation, könnte bei zunehmender Myokarddicke und damit schlechterer Sauerstoffversorgung der inneren Myokardschichten die Reduktion des Fettstoffwechsels ein Schutzmechanismus sein. Dazu passen Beobachtungen, dass die Hemmung der Fettsäure-Oxidation einen positiven Effekt bei ischämischer Herzinsuffizienz zu haben scheint (Vitale et al., 2004). Obwohl diese Frage aktuell noch ungeklärt ist, war es von besonderem Interesse, den Verbrauch von Glukose der EHTs unter hypertrophen Bedingungen zu messen. Die Analyse des EHT-Mediums mittels herkömmlicher Blutgasanalyse-Geräte ermöglichte dies auf einfache und verlässliche Weise.

Die Glykolyse ist einer der Signalwege, die in der KEGG-*Pathway*-Analyse der hochregulierten Gene aller Interventionsgruppen überrepräsentiert waren. Dies ließ vermuten, dass der bekannte Mehrverbrauch an Glukose in der Herzhypertrophie auch im hypertrophierten EHT einsetzt. Dabei ist zu betonen, dass die bekannten Studien zum Energiestoffwechsel des hypertrophierten Kardiomyozyten allesamt als *in vivo* Experimente durchgeführt wurden, bei denen das hypertrophierte Myokard *ex vivo* untersucht wurde. Die Verwendung von EHTs ermöglichte die Untersuchung des Stoffwechsels während der Entstehung der Hypertrophie komplett *in vitro*. Die Messung der Glukose im Medienüberstand nach 24h Inkubation zeigte einen starken Anstieg des Glukoseverbrauchs in den pharmakologisch induzierten Hypertrophiegruppen und einen tendenziellen Anstieg in der Gruppe der Nachlasterhöhung. Die Kontraktion des Kardiomyozyten macht ca. 75% seines Gesamt-ATP-Verbrauchs aus (Ingwall, 2004), die Hauptverbraucher sind dabei die Myosin-ATPase und die ATPasen der Ionenpumpen. Es ist daher logisch, dass eine erhöhte Schlagfrequenz zu einem erhöhten Glukosebedarf führt (vgl. Abb. 3.22 B, S. 79). Dies erklärt den hohen Glukoseverbrauch der mit Phenylephrin behandelten EHTs, die unter dem Einfluss dieser positiv chronotropen Substanz eine wesentlich höhere Schlagfrequenz erreichen als die Kontrollgruppe. Die Streuung der Glukoseverbrauchswerte bei annähernd

4 Diskussion

gleicher Schlagfrequenz einiger EHTs impliziert, dass es noch mehr Einflussfaktoren gibt, als allein die Schlagfrequenz. Dazu muss man ergänzend erwähnen, dass die Aufzeichnung der Schlagfrequenz durch das videooptische Messsystem nur 60 Sekunden lang war, diese Aussagen gelten also nur unter der Annahme die EHTs würden dauerhaft in der gemessenen Frequenz schlagen. Grund für einen gesteigerten Glukoseverbrauch bei gleicher Schlagfrequenz könnte beispielsweise die Aktivierung hypertropher Anpassungsmechanismen, wie auch in der Herzhypertrophie beobachtet, sein. Leider lässt die kleine Stichprobe in diesem Versuch keine eindeutigen Aussagen bzgl. des Glukoseverbrauchs der nachlasterhöhten EHTs zu. Der tendenzielle Mehrverbrauch könnte neben den erwähnten Anpassungsmechanismen auch direkt Folge der erhöhten Arbeitslast sein.

Der ATP-Vorrat eines Kardiomyozyten ist gemessen an seinem Bedarf sehr gering. Die 10 mM im Zytosol würden nur für wenige Kontraktionen ausreichen. Um den großen ATP-Bedarf zu decken und die Konzentration konstant zu halten, greift die Zelle auf verschiedene Synthesemechanismen zurück. Neben der Beta-Oxidation von Fettsäuren und der Glykolyse, speichert ein Kardiomyozyt energiereiche Phosphate durch Kreatin-Phosphorylierung, dessen Phosphatgruppe wieder auf ADP übertragen werden und so ATP gewonnen werden kann. Die Geschwindigkeit der ATP-Synthese ist hierbei 200-fach höher als bei der Glykolyse (Ingwall, 2009). Die Reaktion wird katalysiert von der Kreatinkinase, ein Enzym das in vier Isoenzymen vorkommt (CK-MM, CK-MB, CK-BB und CK-MiMi). In hypertrophierten Herzen konnte eine Zunahme des Anteils der „unreiferen“ Isoenzyme CK-MB und CK-BB gemessen werden, die unter anderem durch eine Reduktion der Expression von *Ckm* (*Creatinekinase, muscle*; um ca. 40%) verursacht wurde (Ye et al., 2001). In der Transkriptomanalyse zeigte sich eine ähnlich ausgeprägte Reduktion der *Ckm*-Expression in allen Interventionsgruppen (AN: -38%, ET-1: -37%, PE: -61%; gemessen in der genomweiten Expressionsanalyse). Obwohl die funktionellen Auswirkungen dieses Isotypenwechsels noch unklar sind, zeigt dies, wie verlässlich EHTs auf die hypertrophen Stimuli reagieren.

Die Etablierung einer Rattenlinie mit ubiquitärer Expression der Glühwürmchen-Luciferase des *Transplant and Stem Cell Immunobiology Lab* des Universitären Herzzentrum Hamburg, ursprünglich zur *in-vivo*-Bildgebung von transplantierten EHTs (Conradi et al., 2011) eingeführt, sollte durch Vergleich des Biolumineszenz-Signals einen Rückschluss auf den ATP-Haushalt des EHTs ermöglichen. In Versuchen auf Kryoschnitten von Schweineaorten konnte gezeigt werden, dass die Intensität des Biolumineszenz-Signals direkt von der lokalen ATP-Konzentration abhängt (Levin et al., 1998). Dies gilt nur dann, wenn die anderen

4 Diskussion

Reaktionspartner, Luciferin (Substrat) und Luciferase (Enzym), im Überfluss vorhanden sind. Wenn man davon ausgeht, dass das Enzym durch die ubiquitäre Expression in beiden Versuchsgruppen in gleicher Menge und Aktivität vorliegt, könnte man die gemessene Zunahme des Biolumineszenz-Signals der nachlast erhöhten EHTs auf eine höhere ATP-Konzentration zurückführen. Dies ist jedoch nach aktuellem Wissensstand sehr unwahrscheinlich, da die zytosolische ATP-Konzentration im hypertrophierten Herzmuskel streng reguliert wird und solange wie möglich unverändert bleibt, bzw. bei Dekompensation des Herzens abfällt (Ingwall und Weiss, 2004). Viel wahrscheinlicher ist hingegen, dass im Rahmen der Hypertrophie und der allgemeinen Zunahme der Proteinsynthese auch die Expression der Glühwürmchen-Luciferase in den transgenen EHTs zunimmt und dies zu einem vermehrten Umsatz von D-Luciferin zu Oxyluciferin führt. Die hier vorgestellte Methode wäre also in der Lage, die Entwicklung der Hypertrophie im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Da das Signal zudem nicht nur quantifizierbar ist, sondern auch genau lokalisierbar, könnte man in Zukunft an Hand des Biolumineszenz-*Imaging* Bereiche im EHT ausmachen, die besonders auf die Nachlast erhöhtung reagieren und diese Informationen zur weiteren Verfeinerung des Modells verwenden. Interessanterweise zeigen vor allem die Regionen dicht an den Silikonschläuchen die höchste Luciferaseaktivität, was auf eine besonders hohe physikalische Beanspruchung in diesem Bereich hinweisen könnte.

4.7 Kontraktilität

Im Vergleich zum normalen Kardiomyozyten weist der krankhaft hypertrophierte Kardiomyozyt Veränderungen in der Kontraktilität auf. Charakteristisch ist hierbei eine eingeschränkte Sarkomer-Verkürzung resultierend in einer geringeren Kraftentwicklung sowie eine Verlängerung der Kontraktions- und Relaxationszeit (Mann et al., 1991; Varian et al., 2009). Die videooptische Messapparatur ermöglichte eine einfache Erfassung dieser Parameter ohne die Kultur der künstlichen Herzmuskelgewebe zu beeinflussen.

Es konnte eine Verlängerung der Relaxationszeit der nachlasterhöhten EHTs festgestellt werden. Dabei gilt zu beachten, dass Kontraktions- und Relaxationszeit von der Schlagfrequenz eines Kardiomyozyten abhängig sind. Bei hohen Frequenzen verkürzen sich diese Parameter, so dass eine Aussage über Veränderung von Kontraktions- und Relaxationszeit nur bei gleicher Schlagfrequenz der Versuchsgruppen möglich ist. In diesem Versuch zeigte sich eine tendenzielle Kraftminderung (-18,3%, $p = 0,12$) bei Verlängerung der Relaxationszeit (+25%). Diese Beobachtung lässt sich mit der auf Transkriptionsebene beobachteten Expressionsminderung von SERCA2a in Einklang bringen (AN -35,7%, ET-1 -27,33%, PE -51,3%). SERCA2a, die Calciumpumpe des sarcoplasmatischen Retikulums, die Ca^{2+} -Ionen nach der Kontraktion unter ATP-Verbrauch wieder in das sarcoplasmatische Reticulum zurückpumpt, ist in Herzhypertrophie und -insuffizienz reduziert (Arai et al., 1994). Eine verminderte Aktivität von SERCA2a führt in der Theorie zu einer langsameren Rückführung der Ca^{2+} -Ionen in das SR – die Relaxation verlängert sich (*negative Lusitropie*). Reicht die Zeit zwischen zwei Kontraktionen nicht mehr aus, um eine Ruhe- Ca^{2+} -Konzentration zu erreichen, verhindert dies eine vollständige Relaxation und führt somit zu einer diastolischen Insuffizienz. Durch die hohe diastolischen Ca^{2+} -Konzentration wird der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal inaktiviert und das Membranpotential für den systolischen Ca^{2+} -Einstrom erniedrigt. Beides führt zu einem geringeren systolischen Ca^{2+} -Ionen-Einstrom, was zu einer niedrigen systolischen Ca^{2+} -Konzentration und somit Beeinträchtigung der Muskelkraft führt (Lee et al., 1985; Periasamy et al., 1999).

Ob die Kontraktilitätsveränderungen in Nachlasterhöhten EHTs auf eine Calciumüberladung zurückzuführen ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden und sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Die Einbußen an Kontraktionskraft könnten ebenso andere Ursachen haben (z.B. die beschriebene Versteifung des extrazellulären Bindegewebes durch Verminderung des Elastin/Kollagen-Verhältnisses, einer Veränderung der Myosinschwerketten-Isoformen, Verlust von kontraktilen Zellen durch Apoptose, Umbau der elektrischen Reizleitung, etc.).

4.8 Hypertrophie im EHT – Vergleich des neuen Modells mit bereits etablierten Herzhypertrophie-Modellen

Ein Großteil der heute bekannten Mechanismen der Herzhypertrophie sind in Zellkulturversuchen an isolierten Kardiomyozyten entdeckt und untersucht worden. Die Isolierung und Kultur von Kardiomyozyten wird seit den 1970er Jahren erfolgreich durchgeführt und ermöglicht eine Analyse der Kardiomyozyten *in vitro*, losgelöst von den komplexen Mechanismen im Organismus (Speicher et al., 1981). Den unterschiedlichsten Spezies sind bereits Kardiomyozyten zur Kultivierung entnommen worden, und neuerdings lassen sich auch menschliche Kardiomyozyten nach Differenzierung embryonaler Stammzellen in diesen Modellen untersuchen (Harding et al., 2007). Unter stabilen Kulturbedingungen können Wachstum und Differenzierung der Zellen beobachtet und experimentell beeinflusst werden. So konnten die Effekte von Pferdeserum im Medium untersucht und mit einer Stimulation durch Katecholamine verglichen werden (Simpson et al., 1982). Viele weitere hypertrophe Substanzen wurden bis heute untersucht, so z. B. Endothelin-1, Trijodthyronin und Angiotensin-II (Ito et al., 1991; Dubus et al., 1993; Ito et al., 1993) und aktuell dient das Modell auch neuen Ansätzen, wie der Untersuchung der Rolle von microRNAs oder Autophagie im Rahmen der Hypertrophie (Duisters et al., 2009; Porrello et al., 2009). Auch Analysen bezüglich Kontraktilität sind möglich (Simpson, 1989). Mechanische Belastung jedoch, ein wichtiger Faktor bei der Entstehung der Hypertrophie, ist bislang in diesem Modell nur durch passive Dehnung zu erreichen (Frank et al., 2008). Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist dieser Dehnungsstress vergleichbar mit einer Erhöhung der Vorlast im Organismus. Erhöhte Nachlast jedoch scheint der ausschlaggebendere Faktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu sein (Levy et al., 1996). Außerdem lassen sich nur neonatale Kardiomyozyten und diese nur für wenige Wochen stabil kultivieren (de Jonge et al., 2007). Reifere Kardiomyozyten lassen sich zwar isolieren, sie verlieren aber in wenigen Tagen ihre spindelförmige Form, ein Prozess, der als Dedifferenzierung bezeichnet wird (Bird et al., 2003).

Im Gegensatz zu isolierten Kardiomyozyten in 2D-Kulturen bilden EHTs ein funktionelles Gewebe mit einem ausgeprägten Herz-ähnlichen Phänotyp. Sie erreichen erhebliche Kräfte (bis zu 0,6 mN) und können Widerstände überwinden. Es ist daher möglich die Belastung gezielt in der Systole zu erhöhen, was einer reinen Erhöhung der Nachlast entspricht. Die Tatsache, dass alle im Ventrikel vorkommenden Zellen auch in die Matrix des EHTs eingebettet werden und dadurch eine direkte Kommunikation der Zellen untereinander ermöglicht wird (z.B. durch echte Zell-Zell-Kontakte oder parakrine Mechanismen), macht zudem die Entstehung von Fibrose möglich, primär durch kardiale Fibroblasten vermittelt,

4 Diskussion

und daher in 2D-Kardiomyozyten-Kultur nicht beobachtbar. Das *in vitro* Design erhält indes die Vorteile der isolierten Kardiomyozyten, wie eine einfache Applikation verschiedenster Substanzen, wie hier z. B. Endothelin-1 und Phenylephrin, oder eine virale Transduktion (siehe Anhang, S. 131). Im Gegensatz zum Versuchstier ist es im EHT-Modell wesentlich einfacher, ausreichende Konzentrationen der eingesetzten Substanzen am Zielgewebe zu erreichen. Außerdem ermöglicht die Isolation Analysen losgelöst vom Organismus, genauer gesagt lassen sich einzelne Stimulatoren gezielt applizieren und vergleichen – in diesem Fall die erhöhte Nachlast mit der neurohumoralen Stimulation. Diese Möglichkeit bietet aktuell kein anderes verfügbares Modell (de Jonge et al., 2007).

Ein weiteres etabliertes Modell zur Analyse der Hypertrophie durch Nachlasterhöhung ist die Durchführung eines „*transverse aortic constriction*“ (TAC) im Versuchstier, in der Regel Ratte oder Maus, aber auch Hund oder Schaf. Hierbei wird operativ durch eine Ligatur die Aorta des Versuchstiers verengt, was in einer Situation vergleichbar mit einer Aortenstenose resultiert. Die Nachlast erhöht sich massiv, es kommt zu Ausschüttung neurohumoraler Faktoren und zur kardialen Hypertrophie (Li et al., 2007; Toischer et al., 2010). Dieses Modell kommt der klinischen Situation im Menschen deutlich näher, was sich allein durch die Pathophysiologie erklärt. Allerdings sind auch Nachteile mit dieser Methode verbunden: Um verlässliche, standardisierte Ergebnisse zu erhalten, muss die Operation sehr routiniert durchgeführt werden, es gibt also eine hohe Abhängigkeit vom Operateur, der eingesetzten Technik und sogar der eingesetzten Maus- oder Rattenlinie. Die Sterblichkeit für die Versuchstiere ist mit ca. 14-17% relativ hoch (Komuro et al., 1988; Hu et al., 2003) und die Belastungen für die überlebenden Versuchstiere sind in den auf die Prozedur folgenden Wochen immens. Dabei ist nicht gesichert, dass die Nachlasterhöhung während der Dauer des Versuchszeit die ganze Zeit gleich groß bleibt, da sie nicht nur von der Größe der Stenose abhängig ist, sondern auch vom Herzzeitvolumen. Dies stellt z.B. bei Studien zum Vergleich von Medikamenten, die das Herzzeitvolumen beeinflussen, ein großes Problem dar (Berry et al., 2007). Generell führt die Erhöhung des Kontraktionswiderstand im Versuchstier immer zu zentraler Stress-bedingter Ausschüttung neurohumoraler Faktoren, wie Katecholamine und Kortisol, Endothelin-1 sowie einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Diese Botenstoffe sind starke Stimulatoren der Herzhypertrophie, sodass das Endergebnis immer ein Mischbild aus mechanischem und neurohumoralem Stress ist. Ungeachtet dessen sind die Anwendungsmöglichkeiten vielfältig. So können z. B. Tiere mit einem genetischen Knockout einer TAC unterzogen und dadurch einzelne Signalwege in der Situation der Nachlasterhöhung untersucht werden (O'Connell et al., 2003) oder durch ein Aufheben der Konstriktion die Reversibilität der Hypertrophie und die Erholung des Herzens beobachtet werden (Gao et al., 2005). Beide genannten Beispiele

4 Diskussion

wären mit deutlich weniger Aufwand im EHT anwendbar, ohne Leidensdruck für die Versuchstiere, dafür mit geringerem Ressourcenverbrauch und damit größeren Stichproben. Allerdings ist die Aussagekraft bezogen auf die Pathologie des menschlichen Herzens sicherlich geringer.

Das hier vorgestellte Modell könnte sich zwischen diesen beiden etablierten Hypertrophie-Modellen positionieren. Es eröffnet den Zugang zu deutlich komplexeren Vorgängen als in der 2D-Kultur von Kardiomyozyten, wie z. B. Fibrose und Kontraktilitätsveränderungen. Das hier vorgestellte Modell ist damit das erste *in vitro* Modell für pathologische Hypertrophie. Die Pathologische Herzhypertrophie ist gekennzeichnet durch eine Größenzunahme der Kardiomyozyten vergesellschaftet mit Fibrose, gesteigerter Apoptose, einer Aktivierung des fetalen Genprogramms, veränderter Ca^{2+} -Homöostase, einem Umbau der Ionenkanäle und funktionellen Veränderungen, wie Verlust an Kontraktionskraft und Verlängerung der Relaxationszeit (Dorn, 2007; Hill und Olson, 2008). Der tendenzielle Kraftverlust (-18,3%) bei Kardiomyozytengrößenzunahme (+28%) ist ein erstes Indiz und mit der verlängerten Relaxationszeit (+25%), der Expressionssteigerung von ANP, BNP, α -skeletalem-Aktin und β -MHC, der Expressionsminderung der Thyroidhormonrezeptoren α und β (siehe Anhang; Kinugawa et al., 2001), der Expressionsminderung von SERCA2a sowie der Entstehung von kardialer Fibrose mit einem verminderten Elastin-Kollagen-Verhältnis (-73%; Mujumdar und Tyagi, 1999) sind viele Kriterien für pathologischen Hypertrophie erfüllt. Die Zunahme des Glukoseverbrauchs, ein weiteres wichtiges Merkmal der pathologischen Herzhypertrophie, konnte mit den hier verwendeten Bedingungen nicht eindeutig bewiesen werden. Aktuelle Versuche mit Hydrocortisonsupplementation zeigen jedoch einen eindeutigen Mehrverbrauch an Serum-Glukose durch akute Nachlasterhöhung, auch die Kraftminderung nach Nachlasterhöhung erreicht unter Hydrocortison Signifikanz (Hirt und Sörensen et al., 2012).

4.9 Ausblick

Das hier vorgestellte Modell bietet eine gute Grundlage für zukünftige Versuche. Ein nächster Schritt wäre zum Beispiel die Therapie mit einem Endothelin-1-Rezeptor-Inhibitor (z.B. Bosentan), um die hohe Ähnlichkeit der beiden Interventionsgruppen (AN und ET-1) weiter zu untersuchen (Hirt und Sörensen et al., 2012). Langfristig könnte das Modell auch Anwendung in der Austestung neuer Medikamente gegen pathologische Herzhypertrophie oder deren Spätfolge Herzinsuffizienz finden. Attraktiv wäre auch die Anwendung des Modells auf humane EHTs, um die Aussagekraft bezüglich menschlicher Herzhypertrophie zu erhöhen. Deren Produktion ist in unserem Institut bereits etabliert. Es lassen sich sowohl embryonale als auch induzierte pluripotente Stammzellen zu Kardiomyozyten differenzieren und aus ihnen EHTs generieren (Schaaf et al., 2011). Moderne Forschungsansätze zu Herzhypertrophie, wie microRNAs, Autophagie oder Epigenetik, könnten ohne großen Aufwand in dem vorgestellten Modell untersucht werden.

Um die Interventionsdauer zu verlängern und die volle Ausprägung der pathologischen Herzhypertrophie zu untersuchen, sollte weiter an der Entwicklung der Medienbedingungen gearbeitet werden. Auch die Reversibilität nach Entlastung der EHTs wäre dann der Analyse zugänglich (Hirt und Sörensen et al., 2012). Aber auch unter den bereits etablierten Bedingungen sollten sich viele aktuell offene Fragen in der Herzhypertrophieforschung anhand des Modells beantworten lassen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Herzinsuffizienz ist aktuell die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Dabei ist der häufigste Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz eine Erhöhung der Nachlast, z. B. bei arteriellem Hypertonus. Das Herz reagiert auf eine Nachlasterrhöhung mit Hypertrophie, definiert als Zunahme des Kardiomyozytenvolumens mit gesteigerter Proteinsynthese und höherer Sarkomerorganisation. Dadurch gelingt es zunächst, die Zusatzbelastung zu kompensieren und die Perfusion des Organismus sicherzustellen. Bei dauerhafter Überlastung des kontraktiven Apparats treten pathologische Veränderungen auf, wie Zunahme der extrazellulären Matrix und Untergang von Kardiomyozyten, was die Progression zur Herzinsuffizienz einleitet. Bislang war es nicht möglich, die reine Erhöhung der Nachlast für Kardiomyozyten *in vitro* zu untersuchen, und Experimente an Versuchstieren sind immer durch Anpassungsmechanismen des Organismus, wie eine Aktivierung der neurohumoralen Achse, beeinflusst.

Um die Erhöhung der Nachlast für Kardiomyozyten *in vitro* zu ermöglichen, wurde ein Protokoll zur Herstellung künstlicher Herzmuskelgewebe auf Fibrin-Basis (EHTs) so modifiziert, dass der Kontraktionswiderstand der Gewebe massiv erhöht werden konnte. Endothelin-1 (ET-1)- oder Phenylephrin (PE)-stimulierte EHTs dienten als Positivkontrollen. Die wichtigsten der dabei gewonnenen Ergebnisse waren:

- 1) Durch Zugabe geringer Konzentrationen von Trijodthyronin konnten die spontanen Kontraktionen der EHTs trotz serumfreier Medienbedingungen über mehrere Tage erhalten werden.
- 2) Die Nachlasterrhöhung führte zu einer Zunahme der Kardiomyozytenquerschnittsfläche um 28,4%, was mittels einer myozytenspezifischen Anti-Dystrophin-Färbung von EHT-Querschnitten mit anschließender automatisierter Zellflächenmessung festgestellt wurde. Die Stimulation durch ET-1 oder PE zeigte ein ähnliches Ausmaß der Hypertrophie (+40,5% bzw. +23,4%).
- 3) Die Erhöhung der Nachlast führte zu einer Aktivierung der Hypertrophie-assoziierten fetalen Gene ANP, BNP, β -MHC, α -skeletales Aktin und Herabregulation der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase SERCA2a. Für ANP und β -MHC wurde diese Aktivierung auch auf Proteinebene nachgewiesen.
- 4) In einer genomweiten Transkriptomanalyse fiel eine hohe Ähnlichkeit der Transkriptome der Interventionsgruppen untereinander auf. Die Gruppe der Nachlasterrhöhung ähnelte dabei besonders der ET-1-Gruppe.

5 Zusammenfassung

- 5) In immunhistochemischen Färbungen zeigten sowohl EHTs nach akuter Nachlasterhöhung als auch die ET-1- oder PE-stimulierten EHTs eine Zunahme von interstitiellem Kollagen I. Zudem fand sich eine Reihe von Fibrose-assoziierten Expressionsveränderungen. Elastin und Fibrillin-1, Vertreter der elastischen Fasern, zeigten eine deutlich geringere Transkriptkonzentration in den Interventionsgruppen als in Kontroll-EHTs, was eine Versteifung der Gewebe implizierte.
- 6) EHTs zeigten nach akuter Nachlasterhöhung eine Verlängerung der diastolischen Relaxation.

Viele der beobachteten Veränderungen sind Charakteristika der pathologischen Hypertrophie. Durch das hier vorgestellte Modell ist diese nun erstmals *in vitro* analysierbar. Dabei ist bemerkenswert, dass die Nachlasterhöhung alleine (ohne Kostimulation durch neurohumorale Faktoren) ausreichend ist, um eine pathologische Hypertrophie zu provozieren.

6 SUMMARY

Congestive heart failure is the third most common cause of death in Germany. The major risk factor leading to a heart failure is an increase of afterload of the contracting muscle, e.g. due to hypertension. This rise is followed by hypertrophy, which can be described as a increase of cardiomyocyte volume, protein synthesis and higher organization of sarcomeres. Therefore, it is possible to overcome the augmented workload and ensure the organism's perfusion. Pathological changes, like growth of extracellular matrix proteins and loss of cardiomyocytes, are caused by permanent overload of the contractile apparatus. This initiates the progression towards heart failure. A limitation of previous studies is its inability to analyze the sole increase of afterload for cardiomyocytes *in vitro*. Furthermore, recent studies using experimental animals were always influenced by regulations of the organism, e.g. an activation of neurohumoral factors.

A protocol for manufacturing engineered heart tissue on a fibrin basis (EHT) was modified, so that the contraction resistance could be highly increased. Endothelin-1 (ET-1)- and phenylephrine (PE)-stimulated EHTs served as positive controls. The most important results were:

- 1) Adding small concentrations of triiodothyronine preserved spontaneous contractions of the EHTs over several days in spite of serum free medium conditions.
- 2) Afterload enhancement resulted in an increase of cardiomyocyte cross-sectional area by 28.4%. This was confirmed by myocyte specific anti-dystrophin-staining of EHT cross sections followed by automated and blinded measurement of cardiomyocyte size. Pharmacological stimulation with ET-1 or PE showed similar increases of cell sizes (+40.5% or +23.4% respectively).
- 3) Increased afterload lead to the activation of hypertrophy-associated fetal genes ANP, BNP, β -MHC, α -skeletal actin and to downregulation of sarcoplasmatic Ca^{2+} -ATPase SERCA2a. For ANP and β -MHC. This could also be demonstrated by a change in protein levels.
- 4) In a genomewide gene expression analysis the interventional groups bore high resemblance to each other. Therefore, the afterload enhanced group was notably similar to the ET-1-group.
- 5) Immunohistochemical staining for collagen I revealed a growth of interstitial collagen I in all interventional groups. In addition, there were fibrosis-associated transcriptional changes. Elastin and fibrillin-1, both elastic fibres, showed decreased transcript concentrations. This implicates an increase of tissue stiffness.

6 Summary

6) Diastolic relaxation was prolonged following the afterload's enhancement.

Many of the observed alterations are characteristic for pathological hypertrophy. This model is the first to reproduce the demonstrated changes in an *in vitro* setting. Remarkably, afterload enhancement alone was sufficient to provoke pathological hypertrophy without costimulation of neurohumoral factors.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abel ED, Doenst T (2011) Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 90: 234-242.

Ago T, Yang Y, Zhai P, Sadoshima J (2010) Nifedipine inhibits cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction in response to pressure overload. *J Cardiovasc Transl Res* 3: 304-313.

Arai M, Matsui H, Periasamy M (1994) Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res* 74: 555-564.

Berry JM, Naseem RM, Rothermel BA, Hill JA (2007) Models of cardiac hypertrophy and transition to heart failure. *Drug Discovery Today: Disease Models* 4: 197-206.

Bird SD, Doevendans PA, van Rooijen MA, Brutel de la Riviere A, Hassink RJ, Passier R, Mummery CL (2003) The human adult cardiomyocyte phenotype. *Cardiovasc Res* 58: 423-434.

Boheler KR, Carrier L, de la Bastie D, Allen PD, Komajda M, Mercadier JJ, Schwartz K (1991) Skeletal actin mRNA increases in the human heart during ontogenic development and is the major isoform of control and failing adult hearts. *J Clin Invest* 88: 323-330.

Boluyt MO, O'Neill L, Meredith AL, Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Crow MT, Lakatta EG (1994) Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* 75: 23-32.

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.

Brancaccio M, Hirsch E, Notte A, Selvetella G, Lembo G, Tarone G (2006) Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy. *Cardiovasc Res* 70: 422-433.

Cameron VA, Ellmers LJ (2003) Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology* 144: 2191-2194.

Campos EC, O'Connell JL, Malvestio LM, Romano MM, Ramos SG, Celes MR, Prado CM, Simoes MV, Rossi MA (2011) Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol* 670: 541-553.

Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S (1991) Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 5: 3037-3046.

Cingolani HE, Aiello EA, Perez NG, Ennis IL, Camilion de Hurtado MC (2005) The Na⁺/H⁺ Exchanger as the Main Protagonist following Myocardial Stretch: The Anrep Effect and Myocardial Hypertrophy. In: Kamkin A, Kiseleca I (eds.) *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*. Academia Publishing House Ltd., Moscow: Academia

Conradi L, Pahrman C, Schmidt S, Deuse T, Hansen A, Eder A, Reichenspurner H, Robbins RC, Eschenhagen T, Schrepfer S (2011) Bioluminescence imaging for assessment of immune responses following implantation of engineered heart tissue (EHT). *J Vis Exp*

Conway SJ, Doetschman T, Azhar M (2011) The inter-relationship of periostin, TGF beta, and BMP in heart valve development and valvular heart diseases. *ScientificWorldJournal* 11: 1509-1524.

de Jonge HW, Dekkers DH, Houtsmuller AB, Sharma HS, Lamers JM (2007) Differential Signaling and Hypertrophic Responses in Cyclically Stretched vs Endothelin-1 Stimulated Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Cell Biochem Biophys* 47: 21-32.

Dorn GW, 2nd (2007) The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* 49: 962-970.

Dorn GW, 2nd, Robbins J, Sugden PH (2003) Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circ Res* 92: 1171-1175.

Douglas PS, Reichek N, Hackney K, Ioli A, Sutton MG (1987) Contribution of afterload, hypertrophy and geometry to left ventricular ejection fraction in aortic valve stenosis, pure aortic regurgitation and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 59: 1398-1404.

Dubus I, Mercadier A, Lucas O, Contard F, Nallet O, Oliviero P, Rappaport L, Samuel JL (1993) Alpha-, beta-MHC mRNA quantification in adult cardiomyocytes by in situ hybridization: effect of thyroid hormone. *Am J Physiol* 265: C62-71.

Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE (2009) miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* 104: 170-178, 176p following 178.

Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM (2000) Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1695-1707.

Eschenhagen T (2008) Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14: 485-487.

Eschenhagen T, Eder A, Vollert I, Hansen A (2012) Physiological aspects of cardiac tissue engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H133-143.

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

Falcao LM, Pinto F, Ravara L, van Zwieten PA (2004) BNP and ANP as diagnostic and predictive markers in heart failure with left ventricular systolic dysfunction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5: 121-129.

Fraga H (2008) Firefly luminescence: A historical perspective and recent developments. *Photochemical & Photobiological Sciences* 7: 146-158.

Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Ludde M, Katus HA, Frey N (2008) Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension* 51: 309-318.

Frey N, Olson EN (2003) Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 65: 45-79.

Frohlich ED, Tarazi RC (1979) Is arterial pressure the sole factor responsible for hypertensive cardiac hypertrophy? *Am J Cardiol* 44: 959-963.

Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, Feng XH, Sheppard K, Dart A, Du XJ (2005) Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H2702-2707.

Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* 9: 859-864.

Graness A, Cicha I, Goppelt-Struebe M (2006) Contribution of Src-FAK signaling to the induction of connective tissue growth factor in renal fibroblasts. *Kidney Int* 69: 1341-1349.

Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64.

Hakki AH, Iskandrian AS, Bemis CE, Kimbiris D, Mintz GS, Segal BL, Brice C (1981) A simplified valve formula for the calculation of stenotic cardiac valve areas. *Circulation* 63: 1050-1055.

Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirioglu B, Schworer A, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107: 35-44.

Harding SE, Ali NN, Brito-Martins M, Gorelik J (2007) The human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte as a pharmacological model. *Pharmacol Ther* 113: 341-353.

Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H, Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 75: 434-442.

Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, Schaper J (2003) Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* 107: 984-991.

Hein S, Schaper J (2001) The extracellular matrix in normal and diseased myocardium. *J Nucl Cardiol* 8: 188-196.

Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Oka T, Sargent MA, York A, Klevitsky R, Vaikunth S, Duncan SA, Aronow BJ, Robbins J, Crombleholme TM, Molkentin JD (2007) Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest* 117: 3198-3210.

Hill JA, Olson EN (2008) Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 358: 1370-1380.

Hirt MN, **Sörensen NA**, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stohr A, Schulze T, Witten A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107: 307.

Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE (2003) Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1261-1269.

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.

Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, Miyazaki H, Matsuda M, Yamaguchi I (2001) Physiological and pathological cardiac hypertrophy

induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R2029-2036.

Ingwall JS (2004) Transgenesis and cardiac energetics: new insights into cardiac metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 37: 613-623.

Ingwall JS (2009) Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res* 81: 412-419.

Ingwall JS, Weiss RG (2004) Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* 95: 135-145.

Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A, Nogami A, Murumo F, Hiroe M (1993) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. *J Clin Invest* 92: 398-403.

Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69: 209-215.

Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28: 27-30.

Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 209: 139-151.

Kinugawa K, Yonekura K, Ribeiro RC, Eto Y, Aoyagi T, Baxter JD, Camacho SA, Bristow MR, Long CS, Simpson PC (2001) Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Circ Res* 89: 591-598.

Kisseberth WC, Brettingen NT, Lohse JK, Sandgren EP (1999) Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev Biol* 214: 128-138.

Kolwicz SC, Jr., Tian R (2011) Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 90: 194-201.

Komuro I, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y (1990) Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J Biol Chem* 265: 3595-3598.

Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibasaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y (1991) Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene

expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem* 266: 1265-1268.

Komuro I, Kurabayashi M, Takaku F, Yazaki Y (1988) Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure-overloaded hypertrophy of the rat heart. *Circ Res* 62: 1075-1079.

Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T (2002) Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106: 130-135.

Leask A (2007) TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 74: 207-212.

Lee JH, Gao C, Peng G, Greer C, Ren S, Wang Y, Xiao X (2011) Analysis of transcriptome complexity through RNA sequencing in normal and failing murine hearts. *Circ Res* 109: 1332-1341.

Lee KS, Marban E, Tsien RW (1985) Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 364: 395-411.

Legrice IJ, Pope AJ, Sands GB, Whalley G, Doughty RN, Smaill BH (2012) Progression of myocardial remodeling and mechanical dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.

Leor J, Abouafia-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: III56-61.

Levin ER, Gardner DG, Samson WK (1998) Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339: 321-328.

Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK (1996) The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 275: 1557-1562.

Li HL, Yin R, Chen D, Liu D, Wang D, Yang Q, Dong YG (2007) Long-term activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase attenuates pressure-overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem* 100: 1086-1099.

Lim H, Zhu YZ (2006) Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci* 63: 2584-2596.

Lopez JE, Myagmar BE, Swigart PM, Montgomery MD, Haynam S, Bigos M, Rodrigo MC, Simpson PC (2011) beta-myosin heavy chain is induced by pressure overload in a minor subpopulation of smaller mouse cardiac myocytes. *Circ Res* 109: 629-638.

Mann DL, Urabe Y, Kent RL, Vinciguerra S, Cooper Gt (1991) Cellular versus myocardial basis for the contractile dysfunction of hypertrophied myocardium. *Circ Res* 68: 402-415.

McMurray JJ, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Bohm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, Jaarsma T, Kober L, Lip GY, Maggioni AP, Parkhomenko A, Pieske BM, Popescu BA, Ronnevik PK, Rutten FH, Schwitler J, Seferovic P, Stepinska J, Trindade PT, Voors AA, Zannad F, Zeiher A, Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S, Bonnet LA, Avraamides P, Ben Lamin HA, Brignole M, Coca A, Cowburn P, Dargie H, Elliott P, Flachskampf FA, Guida GF, Hardman S, Jung B, Merkely B, Mueller C, Nanas JN, Nielsen OW, Orn S, Parissis JT, Ponikowski P (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail* 14: 803-869.

McNally EM, Kraft R, Bravo-Zehnder M, Taylor DA, Leinwand LA (1989) Full-length rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences. Comparisons suggest a molecular basis for functional differences. *J Mol Biol* 210: 665-671.

Mete F, Kilic E, Somay A, Yilmaz B (2012) Effects of heat stress on endocrine functions & behaviour in the pre-pubertal rat. *Indian J Med Res* 135: 233-239.

Miyauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T, Sugishita Y, Suzuki N, Fujino M, Ajisaka R, Goto K, Masaki T (1989) Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 2: 53-54.

Molkentin JD, Dorn GW, 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63: 391-426.

Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, Han X, Kompa AR, McCombe D, Wright CE, Itescu S, Angus JA, Morrison WA (2007) Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber. *Circulation* 115: 353-360.

Mujumdar VS, Tyagi SC (1999) Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens* 17: 261-270.

Münzel F, Mühlhauser U, Zimmermann WH, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Engmann S, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Endothelin-1 and isoprenaline co-stimulation causes contractile failure which is partially reversed by MEK inhibition. *Cardiovasc Res* 68: 464-474.

Neubauer S (2007) The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 356: 1140-1151.

Neumann T, Biermann J, Erbel R, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R (2009) Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int* 106: 269-275.

Nussey S, Whitehead S (2001) *Endocrinology - An Integrated Approach*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, Cotecchia S, Rokosh DG, Grossman W, Foster E, Simpson PC (2003) The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* 111: 1783-1791.

Ogawa E, Saito Y, Harada M, Kamitani S, Kuwahara K, Miyamoto Y, Ishikawa M, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Nakagawa O, Masuda I, Kishimoto I, Nakao K (2000) Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32: 765-776.

Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27: 282-293.

Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 14: 213-221.

Periasamy M, Reed TD, Liu LH, Ji Y, Loukianov E, Paul RJ, Nieman ML, Riddle T, Duffy JJ, Doetschman T, Lorenz JN, Shull GE (1999) Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene. *J Biol Chem* 274: 2556-2562.

Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE (2000) The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 101: 336-344.

Porrello ER, D'Amore A, Curl CL, Allen AM, Harrap SB, Thomas WG, Delbridge LM (2009) Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. *Hypertension* 53: 1032-1040.

Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA (2011) Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331: 1078-1080.

Roberts RG (2001) Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* 2: REVIEWS3006.

Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2012) Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 125: e2-e220.

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

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75: 977-984.

Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, Eder A, Stohr A, Hirt MN, Rau T, Zimmermann WH, Conradi L, Eschenhagen T, Hansen A (2011) Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 6: e26397.

Schaible TF, Scheuer J (1985) Cardiac adaptations to chronic exercise. *Prog Cardiovasc Dis* 27: 297-324.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671-675.

Schwartz K, Lompre AM, Bouveret P, Wisnewsky C, Whalen RG (1982) Comparisons of rat cardiac myosins at fetal stages in young animals and in hypothyroid adults. *J Biol Chem* 257: 14412-14418.

Sheikh F, Ross RS, Chen J (2009) Cell-cell connection to cardiac disease. *Trends Cardiovasc Med* 19: 182-190.

Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T (2002) Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90: e40.

Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofe S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K (2005) Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 115: 2108-2118.

Simpson P (1989) Molecular Mechanisms in Myocardial Hypertrophy. *Heart Failure* May/June 1989: 13.

Simpson P, McGrath A, Savion S (1982) Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res* 51: 787-801.

Speicher DW, Peace JN, McCarl RL (1981) Effects of plating density and age in culture on growth and cell division of neonatal rat heart primary cultures. *In Vitro* 17: 863-870.

Statistisches Bundesamt (2012): Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12 / Reihe 4: 1-43. Wiesbaden.

Stiber JA, Seth M, Rosenberg PB (2009) Mechanosensitive channels in striated muscle and the cardiovascular system: not quite a stretch anymore. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 116-122.

Storch U, Mederos y Schnitzler M, Gudermann T (2012) G protein-mediated stretch reception. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302: H1241-1249.

Tarone G, Lembo G (2003) Molecular interplay between mechanical and humoral signalling in cardiac hypertrophy. *Trends Mol Med* 9: 376-382.

Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT (2000) A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 275: 19250-19257.

Toffolo RL, Ianuzzo CD (1994) Myofibrillar adaptations during cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem* 131: 141-149.

Toischer K, Rokita AG, Unsold B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T, Grebe C, Preuss L, Gupta SN, Schmidt K, Lehnart SE, Kruger M, Linke WA, Backs J, Regitz-Zagrosek V, Schafer K, Field LJ, Maier LS, Hasenfuss G (2010) Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation* 122: 993-1003.

Tomaselli GF, Rose J (2000) Molecular aspects of arrhythmias associated with cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* 15: 202-208.

van Deel ED, de Boer M, Kuster DW, Boontje NM, Holemans P, Sipido KR, van der Velden J, Duncker DJ (2011) Exercise training does not improve cardiac function in compensated or decompensated left ventricular hypertrophy induced by aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol* 50: 1017-1025.

Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, Barbata V, Reid J, Thorrez L, Valentini R, Crawford G (2008) Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle Nerve* 37: 438-447.

Varian KD, Kijawornrat A, Gupta SC, Torres CA, Monasky MM, Hiranandani N, Delfin DA, Rafael-Fortney JA, Periasamy M, Hamlin RL, Janssen PM (2009) Impairment of diastolic function by lack of frequency-dependent myofilament desensitization rabbit right ventricular hypertrophy. *Circ Heart Fail* 2: 472-481.

Vitale C, Wajngaten M, Sposato B, Gebara O, Rossini P, Fini M, Volterrani M, Rosano GM (2004) Trimetazidine improves left ventricular function and quality of life in elderly patients with coronary artery disease. *Eur Heart J* 25: 1814-1821.

Waspe LE, Ordahl CP, Simpson PC (1990) The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J Clin Invest* 85: 1206-1214.

Wordinger RJ, Fleenor DL, Hellberg PE, Pang IH, Tovar TO, Zode GS, Fuller JA, Clark AF (2007) Effects of TGF-beta2, BMP-4, and gremlin in the trabecular meshwork: implications for glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 1191-1200.

Xu SW, Howat SL, Renzoni EA, Holmes A, Pearson JD, Dashwood MR, Bou-Gharios G, Denton CP, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ (2004) Endothelin-1 induces expression of matrix-associated genes in lung fibroblasts through MEK/ERK. *J Biol Chem* 279: 23098-23103.

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271: 3221-3228.

Ye Y, Wang C, Zhang J, Cho YK, Gong G, Murakami Y, Bache RJ (2001) Myocardial creatine kinase kinetics and isoform expression in hearts with severe LV hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H376-386.

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.

8 VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten

Hirt MN*, **Sörensen NA***, Bartholdt LM, Boeddinghaus J, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stohr A, Schulze T, Witten A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107: 307.

**Both authors contributed equally to this work*

Kongressbeiträge

Sörensen NA, Hirt MN, Boeddinghaus J, Bartholdt LM, Schaaf S, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T. Increased afterload in engineered heart tissue leads to pathological hypertrophy with impaired contractility. *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung, Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe Rhythmologie*, Hamburg, Deutschland, 11.-13. Oktober 2012.

Hirt MN, Bartholdt LM, **Soerensen NA**, Stenzig J, Schaaf S, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T. Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy in engineered heart tissue. *European Society of Cardiology (ESC, International Society for Heart Research (ISHR) – European Section, Heart Failure 2012 Congress*, Belgrad, Serbien, 19.-22. Mai 2012.

Hirt MN, Bartholdt LM, **Sörensen NA**, Stenzig J, Schaaf S, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T. Increased afterload is sufficient to induce pathological cardiac hypertrophy in engineered heart tissue. *7th Ascona International Workshop on Cardiomyocyte Biology*, Ascona, Italien, 22.-26. April 2012.

Hirt MN, **Soerensen NA**, Hansen A, Eder A, Conradi L, Sietmann A, Stoll M, Schrepfer S, Eschenhagen T. Increased workload in engineered heart tissue leads to cardiomyocyte hypertrophy – a new in vitro model. *The XXX Annual Meeting of the ISHR-ES*, Haifa, Israel, 26.-29. Juni 2011.

9 DANKSAGUNG

Ich danke Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Überlassung des Themas, das in mich gesetzte Vertrauen und die Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Marc Hirt, für seine unermüdliche wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung zu jeder Zeit. Seine Begeisterung für unsere Arbeit, seine Kreativität und Gelassenheit genauso wie seine Hartnäckigkeit waren elementar für die Fertigstellung dieser Dissertation. Marc hat mir unglaublich viel beigebracht, nur das Wegräumen von dreckigem Geschirr fällt mir immer noch schwer.

Monika Nose danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Labortätigkeiten, aber auch für die vielen anregenden Gespräche darüber hinaus. Besonders wichtig waren mir die stets ehrlichen und konstruktiven Rückmeldungen. Ein Jahr neben ihr zu sitzen hat mir große Freude bereitet.

Ich danke Dr. rer. nat. Alexandra Eder, die immer anprechbar war und die dank ihrer großen EHT-Expertise für viele Probleme im Verlauf der Arbeit eine passende Lösung parat hatte, Bülent Aksehirlioglu für die Hilfe bei der Herstellung der Silikonhalterungen, June Uebeler und Thomas Schulze für die Präparationen der Zellen sowie den vielen weiteren Doktorandinnen und Doktoranden sowie Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie für das angenehme Arbeitsklima und die großartige kollegiale Zusammenarbeit.

Weiterer Dank geht an Frau Prof. Dr. sc. hum. Monika Stoll und Dr. rer. nat. Anika Weber vom Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung in Münster für die Durchführung der genomweiten Expressionsanalyse, Dr. rer. nat. Melanie Neumann von der *HEXT Mouse Pathology Facility* für die Hilfe bei den histologischen Präparationen sowie an Malik Alawi von der *HEXT Bioinformatics Service Facility* für die Arbeit an der Auswertung der Expressionsanalyse.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die großartige Unterstützung und für das Gefühl, dass ich sie stolz und glücklich mache.

Der größte Dank gilt Franziska. Aufzuzählen wofür, wäre wie Sterne zählen, ohne sie würde wahrscheinlich kein Wort auf diesen Seiten stehen.

10 LEBENS LAUF

Nils Arne Sörensen

*18.08.1985, Gießen

Schulbildung

1995 - 2005 | Gesamtschule Gießen Ost, Abschluss mit Allgemeiner Hochschulreife

Studium

seit 10/2006 | Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

08/2008 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 07/2009 | Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes

02/2012 - 01/2013 | Praktisches Jahr in Basel (CH), London (GB) und Hamburg

11 ANHANG

11.1 Austestung verschiedener interner Standards zur Bestimmung der Transkriptkonzentrationen in der qPCR

11.1.1 Methodik

Da viele Gene bei hypertropher Stimulation verändert exprimiert werden, war es von Interesse, Gene zu finden, deren Transkriptkonzentrationen während der Stimulation stabil bleiben, um sie als interne Standards zu verwenden (sog. *house-keeping-genes*). Zu diesem Zweck wurden die Konzentration von ribosomaler 18s-rRNA (ribosomale RNA 18s) und die Transkriptkonzentrationen von Beta-Aktin, Transferrinrezeptor, Glucuronidase und G_{as} (α_s -Untereinheit des heterotrimeren stimulierenden G-Proteins G_s) in Kontroll-EHTs und EHTs mit akuter Nachlastserhöhung mittels qPCR untersucht. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 11.1 aufgeführt.

Tabelle 11.1: Primerliste zur Austestung interner Standards für qPCR

Gensymbol	Beschreibung	RefSeq Nummer	Primer	PPG*
18s	18s rRNA	V01270.1	For: ATACATGCCGACGGGCGCTG Rev: TTCGAATGGGTCGTCGCCGC	181
Actb	B-Aktin	NM_031144.2	For: GCGTCCACCCGCGAGTACAA Rev: TAGGGCGGCCACGATGGAG	184
Tfrc	Transferrinrezeptor	NM_022712.1	For: TGCTTGGGTAGGAGGCAGCG Rev: GCCGAGCAAGGCTAAACCGGG	186
Gusb	Glucuronidase	NM_017015.1	For: CCCGCATGTCCCCAAGACGG Rev: CGGCACGGAAGCTCCACAGG	153
Gnas	Heterotrimeres G-Protein G _s , α_s -Untereinheit	NM_001024823.4	For: TTCCAGTGGCTTCTGCGGCG Rev: TTCCCGGGGCTGAGGGATCG	152

*PPG: PCR-Produkt-Größe

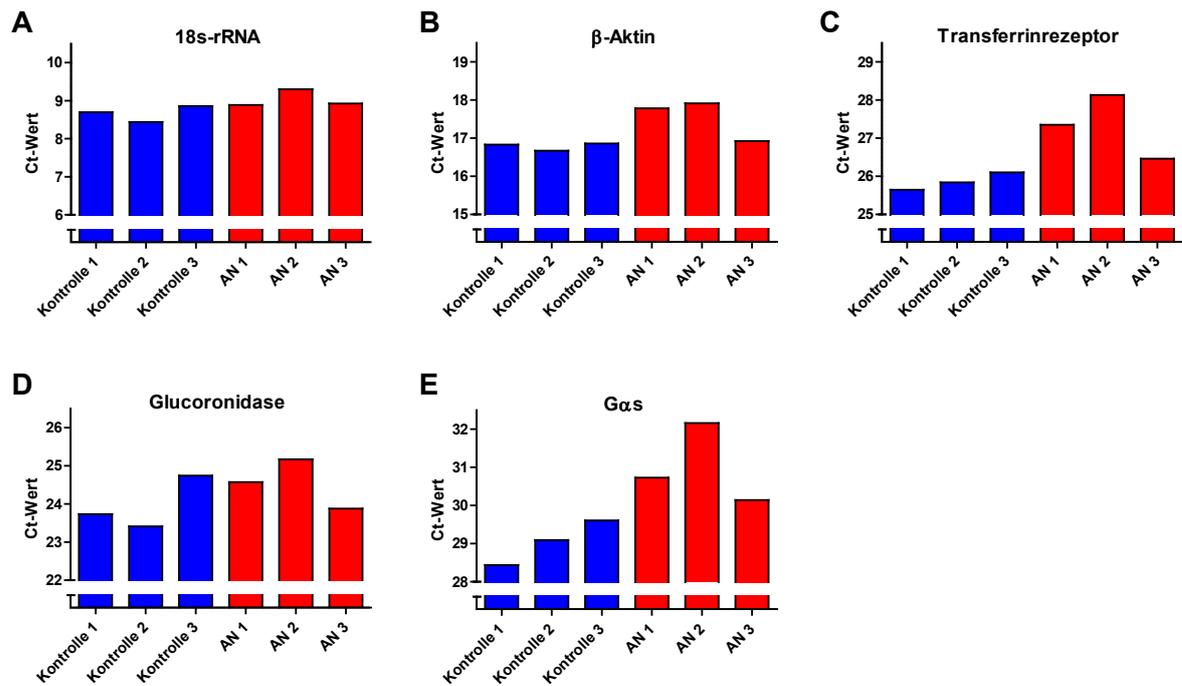
11.1.2 Ergebnisse

Abb. 11.1: Austestung interner Standards für die qPCR. Ct-Werte, ermittelt in jeweils drei Kontroll-EHTs und EHTs mit akuter Nachlasterhöhung, für 18s-rRNA (A), β -Aktin (B), Transferrinrezeptor (C), Glucoronidase (D) und Gas (E). Zur besseren Darstellung der Ct-Wert-Differenzen beginnen die Ordinaten nicht bei 0.

Wie in Abb. 11.1 gezeigt, wies die 18s-rRNA eine stabile Transkriptkonzentration auch unter hypertrophen Bedingungen auf, sodass sie bei den folgenden qPCRs als interner Standard verwendet wurde.

11.2 Messung der Kontraktilität bei aufsteigendem Calciumgradienten

11.2.1 Methodik

11.2.1.1 Das modifizierte IonOptix-Messsystem

Da viele Kontraktilitätsparameter, wie z. B. Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit oder Kontraktions- und Relaxationszeit, frequenzabhängig sind, ist es sinnvoll, die Schlagfrequenz während der Messung dieser Parameter durch elektrische Stimulation festzulegen. Elektrische Stimulation zur Frequenzkorrektur führt jedoch durch Elektrolyse zur Entstehung von hypochloriger Säure, einem starken Oxidationsmittel, das im Medium schnell eine für EHTs schädliche Konzentration erreicht. Daher wurde für diese Versuche ein modifiziertes IonOptix-Messsystem verwendet, das während der elektrischen Stimulation einen kontinuierlichen Austausch des Nährmediums ermöglichte. Das Messsystem war ursprünglich entwickelt worden, um intrazelluläre Kalzium-Transienten zu analysieren, war aber auch in der Lage, Längenmessungen durchzuführen und damit Kontraktilitätsparameter zu erfassen. Im Folgenden werden nur die für die Kontraktilitätsmessungen relevanten Komponenten erklärt.

Das System bestand aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (*Axiinvert 200M*, Carl Zeiss®) mit einem 2,5-fach-Objektiv, in dessen Objektträgerhalterung eine beheizbare 24-Well-Schalen-Halterung (37 °C) eingesetzt wurde. In diese Vorrichtung konnte eine 24-Well-Messplatte mit Glasboden (*IWAKI cell biology*, Dunn Labortechnik GmbH) als Messkammer für die EHTs eingebracht werden. Um die Messkammer befand sich ein gasdichter Plexiglastasten, der über eine Begasungsanlage mit einer konstanten CO₂-Konzentration von 7% und einer Temperatur von 37 °C versorgt wurde. Ein Aufsatz auf der Silikonhalterung in der 24-Well-Messplatte diente sowohl zur Perfusion als auch zur elektrischen Stimulation der EHTs während der Messung (Abb. 11.2, Ausschnitt links unten). Die elektrische Stimulation erfolgte durch zwei in die Messlösung der EHTs tauchende Platinelektroden, die mit einem Feldstimulator (*MyoPacer EP*, IonOptix Corporation) verbunden waren. Somit konnte eine kontrollierte Kontraktion der EHTs sichergestellt werden. Der Feldstimulator sendete ein Kontrollsignal an ein digitales Steuerungselement (*Fluorescence System Interface*, IonOptix Corporation), welches es an den Computer weiterleitete. Die Kontraktionen der EHTs wurden mit einer Kamera (*MyoCam™*, IonOptix Corporation) mit 1000 Bildern pro Sekunde aufgezeichnet und von der IonOptix Software (*IonWizard 6.0*) analysiert (Abb. 11.2).

Es wurden jeweils 4 Kontroll-EHTs und 4 AN-EHTs nach 5 Tagen Intervention mit dem System gemessen. Im Gegensatz zur unter 2.4.8.1 (S. 26) beschriebenen Messapparatur konnte bei diesem Verfahren nicht unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden, so dass die gemessenen EHTs nicht für Folgeversuche verwendet wurden.

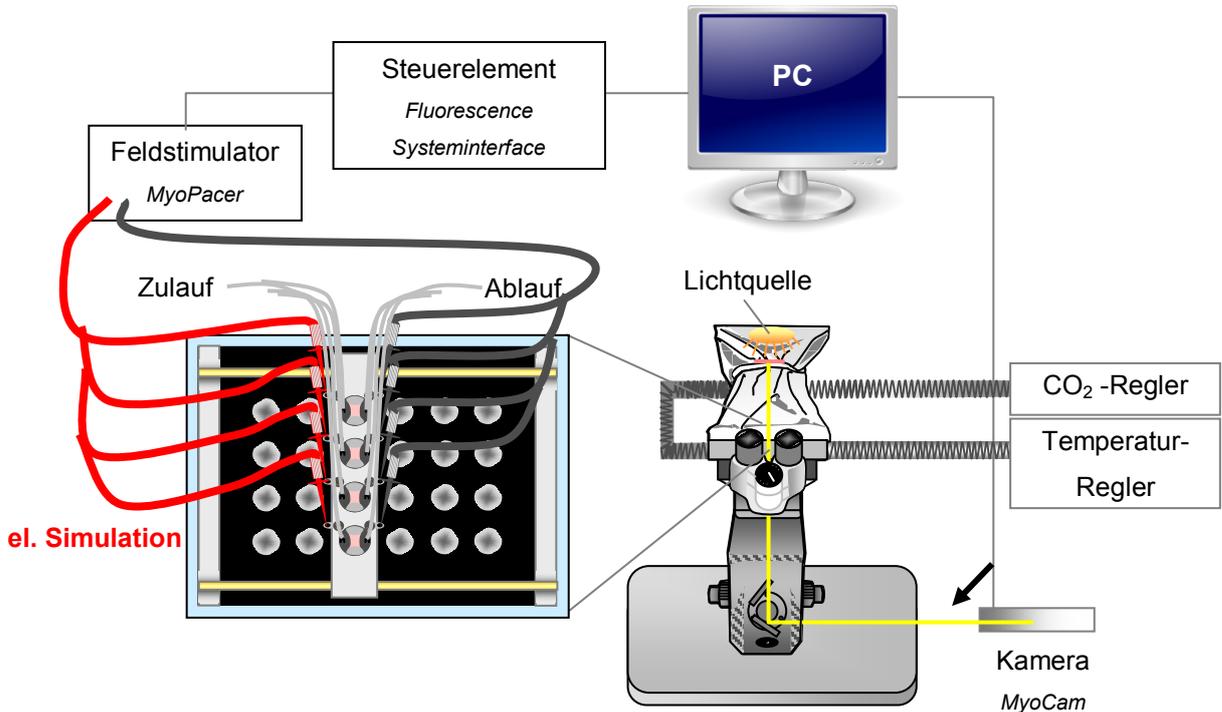


Abb. 11.2: Modifiziertes IonOptix Messsystem zur Kontraktionsanalyse mit Perfusion und elektrischer Stimulation, schematische Darstellung. Gezeigt ist das Mikroskop mit dem eingezeichneten Lichtweg (gelb, Pfeil) sowie die Messkammer mit dem Aufsatz für Zu- und Ablauf des Nährmediums und den Platinelektroden zur elektrischen Stimulation.

11.2.1.2 Messung der Kalziumkonzentrationswirkungskurve

Für die Erstellung der Kalziumkonzentrationswirkungskurve wurde die unter 11.2.1.1 beschriebene Messapparatur verwendet. Die EHTs wurden in die 24-Well-Messplatte überführt, die zuvor mit 1,5 ml EHT-Medium pro Well befüllt wurde. Nach Einsetzen der Messplatte in die Messkammer wurde das zu messende EHT kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaster Tyrode-Lösung über den Zu- und Ablauf perfundiert. Das EHT-Medium wurde auf diese Weise sukzessiv durch Tyrode-Lösung ausgetauscht.

Das zu messende EHT wurde mit 3 Hz, 40 V, biphasisch und einer Pulsdauer von 5 ms durch die im Medium platzierten Platinelektroden stimuliert. Die hohe Spannung wurde benötigt, da der Feldstimulator sonst keine ausreichend hohe Stromstärke erzeugen konnte. Mit dem Objektisch des Mikroskops wurde das EHT so ausgerichtet, dass der rechte Fuß des Silikon Schlauchs in dem Live-Bild der Kamera scharf zu sehen war und ein guter Hell-Dunkel-Kontrast erreicht wurde. Durch den Kontrast von dunklem Silikon zu hellem Gewebe war die Software in der Lage, die Kontraktionen des EHTs zu erkennen.

11 Anhang

Nach etwa 30 Minuten Perfusion mit calciumfreier Thyrode unter elektrischer Stimulation war das Mediumcalcium heraus gewaschen. Begonnen wurde mit einer Tyrode-Lösung mit 0 mmol/l CaCl_2 gefolgt von 0,1 mmol/l, 0,2 mmol/l, 0,4 mmol/l, 0,6 mmol/l, 1,0 mmol/l und 1,6 mmol/l CaCl_2 .

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung

NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
CaCl₂	0 - 1,6 mM
MgCl ₂	1,05 mM
NaHCO ₃	22,6 mM
NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
Glukose	5,05 mM
Na ₂ EDTA	0,05 mM
Ascorbinsäure	0,56 mM

11.2.2 Ergebnisse

Beide untersuchten Gruppen erwiesen sich als äußerst Calcium-sensibel und erreichten bereits bei sehr niedrigen Calcium-Konzentrationen die maximale Kraft. Die Kraft lag im typischerweise ermittelten Bereich (Abb. 11.3, H; vergleiche mit 3.8). Die großen individuellen Schwankungen der hier gewonnenen Messwerte und die geringe Anzahl der gemessenen EHTs ließen keine signifikanten Aussagen bezüglich der Kontraktilitätsunterschiede zwischen Kontroll-EHTs und AN-EHTs zu. Abb. 11.3 B zeigt einen zu einer pathologischen Hypertrophie passenden Kontraktionsablauf mit im Vergleich zu Kontroll-EHTs verminderter Kraft und verlängerter Relaxationszeit der EHTs mit erhöhter Nachlast.

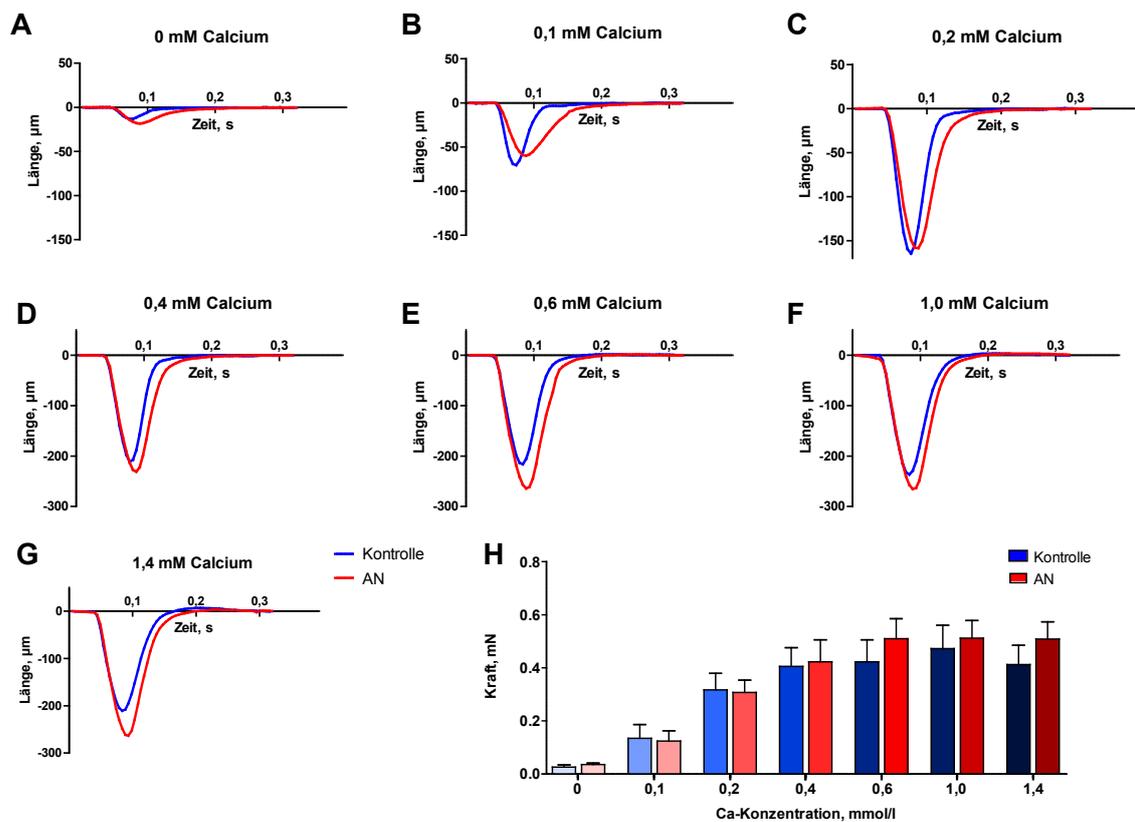


Abb. 11.3 Calciumkonzentrationswirkungskurve. A-G: Durchschnittlicher Kontraktionsablauf bei verschiedenen Calciumkonzentrationen. Aufgetragen ist die Längenveränderung von Kontroll-EHTs und EHTs nach akuter Nachlasterrhöhung über 5 Tage gegen die Zeit. Die leichten Unterschiede zwischen den Kontraktionsabläufen sind statistisch nicht signifikant. H: Maximale Kraft bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen. Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen auf. Bemerkenswert war der frühe Anstieg der Kontraktionskraft - bei 0,6 mM Ca^{2+} war bereits das Maximum erreicht. Biologische Replikate: $n = 3-4$ ($n = 1-2$ für 0,1 mM), in die Kalkulation gingen 40-80 Einzelkontraktionen ein.

11.3 Autophagie im EHT

Autophagie ist ein auch als „zellulärer Kannibalismus“ bezeichneter Recyclingprozess, der gealterte Proteine, toxische Proteinaggregate und dysfunktionale Zellorganellen in ihre Einzelbestandteile auflöst (Zucker, Aminosäuren, Lipide) und diese der Zelle erneut zur Verfügung stellt (Wang et al., 2010). Unter normalen Bedingungen sorgt Autophagie für eine geregelte Homöostase von Proteinproduktion und -degradation. Da Kardiomyozyten nach der Geburt nicht mehr zur Zellteilung fähig sind, sind sie besonders auf Einhaltung dieses Gleichgewichts angewiesen. In verschiedenen Tier-Modellen der Herzhypertrophie konnte eine verstärkte Aktivierung von Autophagie beobachtet werden. Man geht davon aus, dass der hämodynamische Stress und die gesteigerte Proteinsynthese einen hohen Bedarf an Rohstoffen darstellen, sodass vermehrt katabole Stoffwechselwege, wie Autophagie aktiviert werden, um diesen Bedarf zu decken. Autophagie ist also, bis zu einem gewissen Maß, notwendig, um in Stresssituationen die Zelle mit ausreichenden Ressourcen zu versorgen. Bei der Progression von Herzhypertrophie zu Herzinsuffizienz könnte allerdings Autophagie übermäßig aktiv sein, sodass lebenswichtige Zellbestandteile degradiert werden, was zum Zelltod durch Autophagie führt (Zhu et al., 2007). Bei Herzinsuffizienz im Endstadium wiesen explantierte Herzen alle drei Formen von Zelltod auf: Apoptose, Nekrose und Autophagie, wobei Autophagie die vorherrschende zu sein schien (Kostin et al., 2003). Im Folgenden wurde Autophagie im EHT und dabei die Auswirkungen der Nachlasterhöhungen auf die Autophagie-Aktivierung untersucht.

11.3.1 Methodik

Bei der Autophagie spaltet sich eine kleine Membranvakuole vom Endoplasmatischen Retikulum ab (Phagophore) und faltet sich um nicht gebrauchte, alte Zellorganellen und Proteine. Es entsteht ein Doppelmembran-Vesikel (Autophagosom). Die Formierung des Autophagosoms ist ein komplexer Vorgang, der vor allem durch die Aktivierung von Atg12 und Atg8 (LC3), zwei Autophagie-assoziierte Gene vermittelt wird (Abb. 11.4). Nach Schluss des Autophagosoms fusioniert es mit einem Lysosom, was das saure Milieu und die notwendigen Enzyme zur Degradation der Proteine und Zellorganellen liefert.

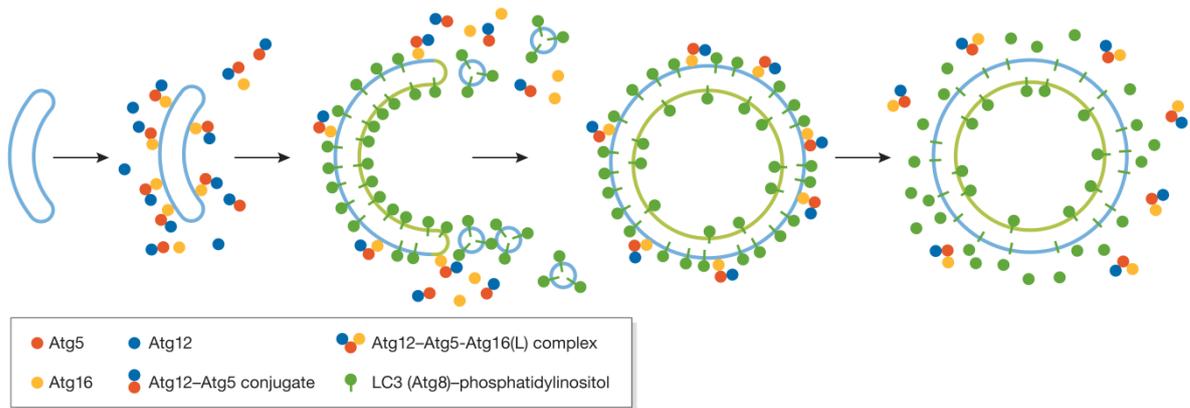


Abb. 11.4: Formierung des Autophagosoms. Das Membranvesikel (Phagophore) wird nach Autophagie-Aktivierung (z.B. durch Proteinmangel, oder hämodynamischem Stress) von dem aktivierten Komplex aus Atg5, Atg16 und Atg12 besetzt. Dieser rekrutiert mit Atg8 (LC3) besetzte Vesikel zur Phagophore, welche sich symmetrisch verteilen und den Schluss des Autophagosoms vermitteln. LC3 auf der äußeren Membran wird wiederverwertet, LC3 auf der inneren Membran wird durch das Autophagosom degradiert (Geng und Klionsky, 2008).

Zur Untersuchung der Autophagie im EHT wurden EHTs vier Tage nach ihrer Generierung mit einem LC3-GFP-Adenovirus, Serotyp 5 (*Multiplicity of infection*; MOI 20) infiziert. Das Virus kodierte für ein Fusionsprotein aus LC3 und dem Fluoreszenzfarbstoff GFP (*green fluorescent protein*). Insgesamt wurden drei Gruppen untersucht: Eine Kontrollgruppe, eine Gruppe mit akuter Nachlasterhöhung und eine Gruppe, die 4h vor Untersuchung in *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS; Gibco®) inkubiert wurde. HBSS enthält keine Proteine, sodass ein Autophagie-aktivierender Proteinmangel vorlag. Zur besseren Kontrastierung wurden EHTs, wie unter 2.5.5, S. 40 beschrieben, mit DAPI zur Darstellung der Zellkerne und α -Actinin zur Darstellung der Querstreifung gefärbt.

11.3.2 Ergebnisse

Unter normalen Bedingungen liegt LC3 über das gesamte Zytosol verteilt vor. Kommt es zu einer Aktivierung der Autophagie, bilden sich Autophagosome, das heißt viele LC3-Moleküle aggregieren an einem Ort. Das Fusionsprotein aus LC3 und GFP machte es möglich, im Fluoreszenzmikroskop Zellen ohne Autophagie-Aktivierung (gleichmäßig verteilte grüne Färbung) von Zellen mit Autophagie-Aktivierung (Punktförmige grüne Farbklexe) zu unterscheiden (Abb. 11.5).

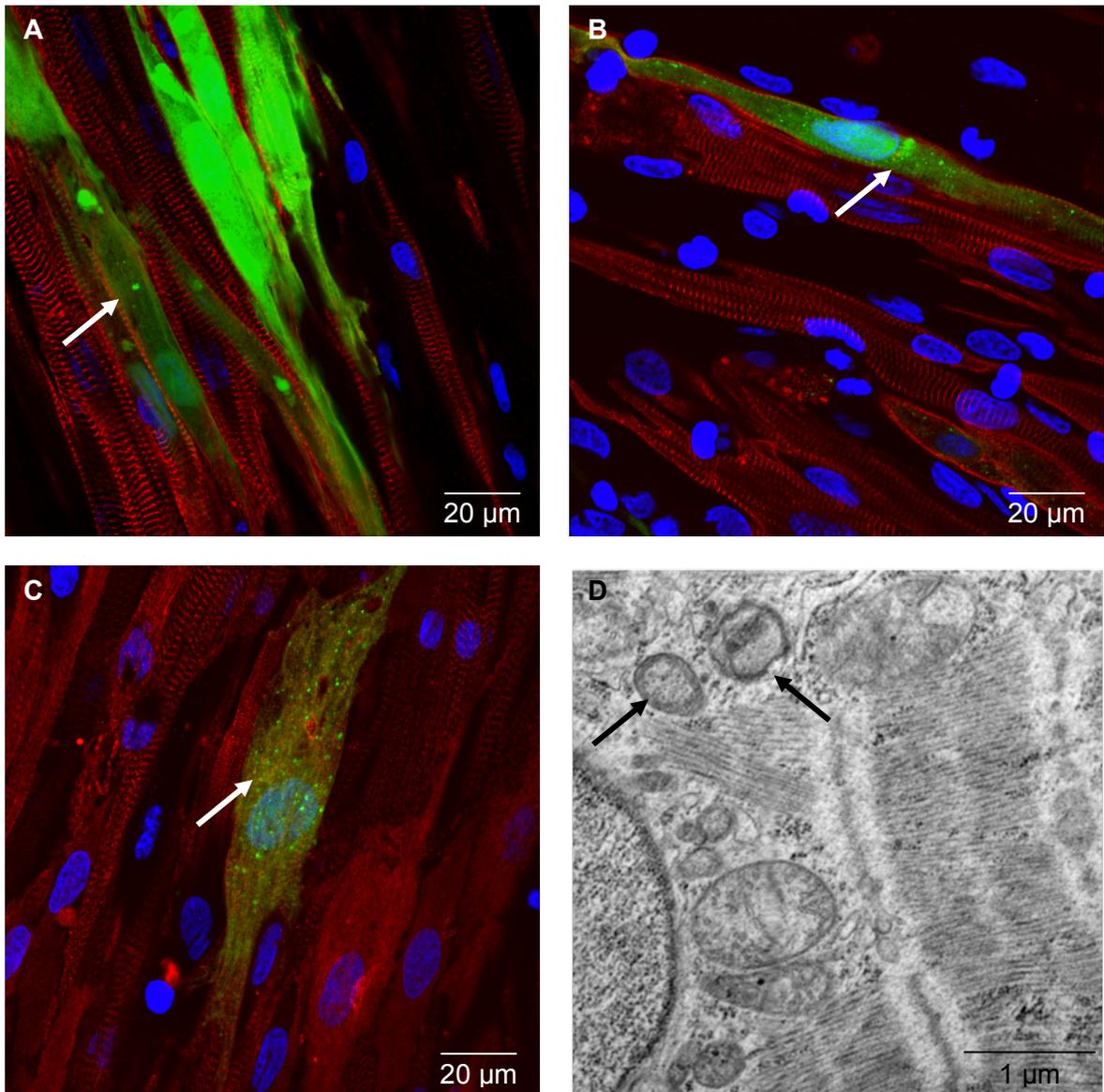


Abb. 11.5: Autophagie im EHT. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EHTs nach adenoviraler Transduktion mit dem LC3-GFP-Fusionsgen. Vergrößerung 63x, Gegenfärbung mit DAPI (blau) und Anti- α -Actinin (rot). A: Kontroll-EHT mit gleichmäßiger Verteilung des grünen LC3-Signals über die gesamte Zelle (Pfeil). B: EHT nach 5 Tagen akuter Nachlastserhöhung mit punktförmiger intrazellulärer Signalanhebung (Pfeil). C: EHT nach Inkubation in HBSS. Es sind deutliche punktförmige LC3-Aggregate zu erkennen. D: Elektronen-mikroskopische Aufnahme eines EHTs nach 7 Tagen akuter Nachlastserhöhung. Es lassen sich für Autophagie typische Doppelmembranvesikel erkennen (Pfeile). Vergrößerung 5000x.

Sowohl die akute Nachlastserhöhung als auch der Proteinmangel mit HBSS führte zu einer punktförmigen Aggregation von LC3 (Abb. 11.5, A-C), was für eine Aktivierung von Autophagie in diesen Gruppen spricht. Gestützt wurden diese Beobachtungen durch ein Auftreten von Doppelmembranvesikeln in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von EHTs nach akuter Nachlastserhöhung (Abb. 11.5, D). Aufgrund der relativ geringen Transduktionsrate (vgl. Abb. 11.5, B; die Aufnahme zeigt mindestens 8 Zellen, von denen nur eine deutlich GFP-positiv ist) ließen sich keine quantitativen Aussagen über eine

11 Anhang

mögliche stärkere Aktivierung von Autophagie in EHTs mit akuter Nachlasterhöhung treffen. Die Methode scheint prinzipiell gut auf EHTs anwendbar zu sein. Möglicherweise könnte sie verbessert werden, indem man EHTs bereits bei der Herstellung transduziert und die Transduktion mit adeno-assoziierten Viren (AAV) Serotyp 6 durchführt, die bei guter Kardiomyozytenpräferenz wenig toxisch sind.

11.4 Literaturverzeichnis für im Anhang zitierte Quellen

Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, Schaper J (2003) Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* 92: 715-724.

Wang ZV, Rothermel BA, Hill JA (2010) Autophagy in hypertensive heart disease. *J Biol Chem* 285: 8509-8514.

Zhu H, Tannous P, Johnstone JL, Kong Y, Shelton JM, Richardson JA, Le V, Levine B, Rothermel BA, Hill JA (2007) Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress. *J Clin Invest* 117: 1782-1793.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit 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 die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Datum:

Unterschrift: