

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

## **Über die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums in *Engineered Heart Tissue* (EHT)**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Benjamin Nicolai Schäffer  
aus Essen

Hamburg 2014

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.09.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg.**

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. K. Sydow**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. R. Smeets**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Herzinsuffizienz	1
1.2 Myokardiales <i>Tissue Engineering</i>	2
1.3 Physiologie der Herzaktion und Erregungsausbreitung, Bildung eines funktionellen Synzytiums	4
1.4 Aufbau von <i>gap junctions</i> und Connexin-Proteinen	7
1.5 Connexine im Herzen und in EHTs	11
1.6 Zielsetzung und Fragestellung	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Tierhaltung	15
2.2 Kardiomyozytenpräparation	15
2.2.1 Organentnahme	15
2.2.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss	15
2.3 Aufreinigung und Kultur von Nicht-Kardiomyozyten	18
2.4 Herstellung von <i>Engineered Heart Tissue</i> (EHT)	18
2.4.1 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	18
2.4.2 Herstellung von Kollagen Typ I	19
2.4.3 Herstellung von EHTs	19
2.4.4 Herstellung von Gewebekonstrukten aus Nicht-Kardiomyozyten	21
2.5 Kulturbedingung und Interventionen	21
2.6 Kontraktionskraftmessung	23
2.7 Echtzeit PCR-Analyse	24
2.7.1 RNA-Präparation	24
2.7.2 Reverse Transkription	25
2.7.3 Quantitative Echtzeit-PCR	26
2.7.4 TaqMan-Sonden und PCR-Primer Design	27
2.8 <i>Western blot</i> Analyse	30
2.8.1 Proteinbestimmung nach Lowry	30
2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	30
2.8.3 <i>Western blot</i>	31
2.9 Immunhistologie	33
2.10 Analyse der Erregungsausbreitung in EHTs	34

2.11	Statistik	36
2.12	Substanzen und Hilfsmittel	37
2.12.1	Substanzen	37
2.12.2	Hilfsmittel und Geräte	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Ausbildung von funktionellen Synzitionen in EHTs	42
3.2	Connexine in EHTs	45
3.2.1	Connexin-Isoformen in EHTs	45
3.2.2	Connexin-Expression in EHTs und neonatalem Herzgewebe	46
3.2.3	Ausbildung der Connexine während der EHT-Entwicklung	49
3.3	Connexin-Expression in Nicht-Kardiomyozyten	51
3.4	Einfluss von phasischer und statischer mechanischer Dehnung auf Connexin-Expression in EHTs	52
3.4.1	Höhere Kontraktionskraft unter phasischer Dehnung	52
3.4.2	Erhöhte Cx45-Transkriptkonzentration unter phasischer Dehnung	54
3.4.3	Optimierte Myogenese unter phasischer Dehnung	55
3.5	Modulierung der Connexin-Expression durch Insulin	57
3.5.1	Erhöhte Kontraktionskraft insulinbehandelter EHTs	57
3.5.2	Reduktion der Connexin45-Transkriptkonzentration unter Insulin	59
3.5.3	Zunahme des Connexin43-Proteingehaltes unter Insulin	60
3.5.4	Optimierte Myogenese unter Insulin	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1	Ausbildung eines funktionellen Synzytiums	64
4.2	Connexin-Isoformen in EHTs	66
4.3	Modulierung der Connexine in EHTs durch mechanische Dehnung	68
4.4	Modulation der Connexine in EHTs durch Insulin	70
4.5	Ausblick und Limitationen	72
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>87</b>

<b>9. Lebenslauf</b>	<b>88</b>
<b>10. Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>89</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Herzinsuffizienz

Die häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2009 waren mit etwa 43% Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems (Statistisches Bundesamt Deutschland 2010). Insgesamt 5,7% sind dabei auf eine Herzinsuffizienz zurückzuführen. In Anbetracht einer immer älter werdenden Gesellschaft und einer steigenden Zahl von Patienten ist zu erwarten, dass die Herzinsuffizienz das führende Krankheitsbild dieses Jahrhunderts sein wird (Schannwell et al. 2007). Durch präventive und therapeutische Bemühungen konnte die 5-Jahres-Prognose verbessert werden (Owan et al. 2006). Trotzdem ist das Gesamtüberleben mit 30-40% über 5 Jahre niedrig (Owan et al. 2006). Verbesserte Präventionsmaßnahmen und neue Therapieansätze sind hier gefordert.

Herzinsuffizienz beschreibt eine Funktionsstörung, bei dem die Pumpleistung des Herzens nicht mehr ausreicht, um die von der Peripherie benötigte Menge an Blutvolumen zur Verfügung zu stellen. Grundlage bildet zumeist ein Schaden der Herzmuskulatur, oft basierend auf einer koronaren Herzerkrankungen, Klappenvitien, Kardiomyopathien, kardiotoxische Medikamente, Infektionen oder Endokrinopathien (Murdoch et al. 1998, Fox et al. 2001). Die pharmakologische Therapie, welche Wirkstoffgruppen wie  $\beta$ -Adrenorezeptorblocker, Angiotensin-Converting-Enzyme-(ACE)-Hemmer, Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-(AT<sub>1</sub>)-Rezeptor-Antagonisten, Diuretika, Aldosteronantagonisten und Herzglykoside umfasst und unter anderem eine Abschirmung der neurohumoralen Dauerstimulation des vorgeschädigten Herzens sowie mechanische Entlastung durch Vor- und Nachlastsenkung erreicht, vermag es jedoch nicht den Verlust von Muskelmasse und kontraktile Einheiten als kausale Ursache adäquat zu kompensieren.

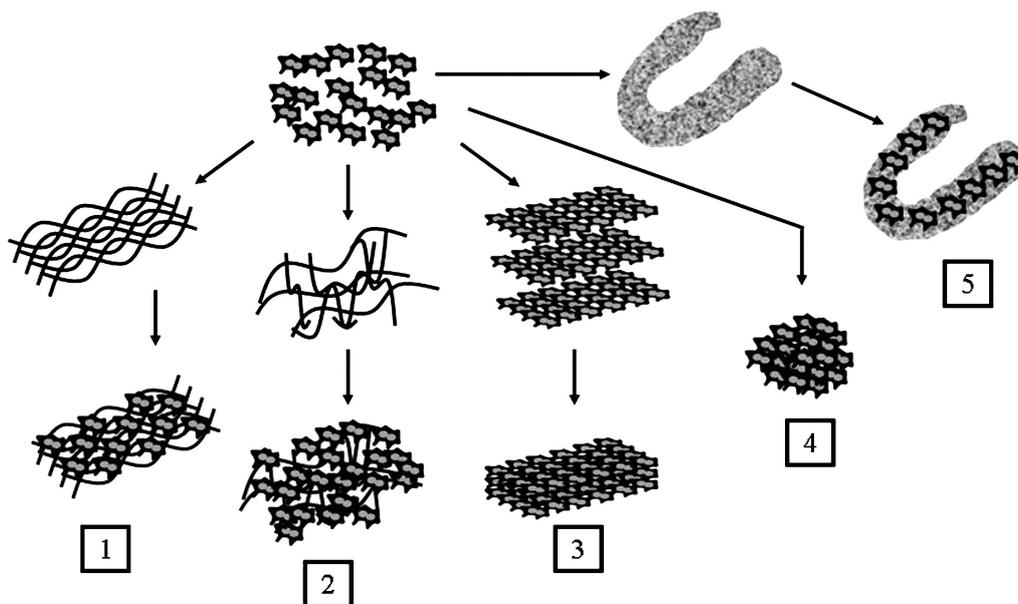
Eine kausale Behandlung stellt die Herztransplantation dar (Kirklin et al. 2003). 2010 wurden in Deutschland 392 Herztransplantationen durchgeführt. Demgegenüber standen 929 angemeldete Patienten auf der Warteliste (Eurotransplant International Foundation, 2011). Dies verdeutlicht die wesentliche Limitation - die mangelnde Zahl an Spenderorganen. Alternativen wie ventrikuläre Assist-Systeme (*ventricular assist device*, VAD) stellen trotz technischer Fortschritte, mit Entwicklung kleinerer,

leistungsfähigerer und weniger invasiver Geräte aufgrund begrenzter Anwendungsdauer, Infektionen, Hämolyse, Antikoagulationsbedürftigkeit, Arrhythmien und hohem Energiebedarf, zumeist nur eine überbrückende Maßnahme (*bridge-to-transplant*) bis zur Herztransplantation dar (Wieselthaler et al. 2010).

Bei Unfähigkeit einer körpereigenen Regeneration des Herzens findet der Ansatz geschädigtes Gewebe durch neu generierte, funktionsfähige Gewebekonstrukte zu ersetzen große Aufmerksamkeit in der Medizin. Seit Jahren werden verschiedene Möglichkeiten erprobt, geschädigtes Herzgewebe durch zellbasierte Therapien zu ersetzen. Soonpaa et al. (1994) konnten die prinzipielle Anwendbarkeit dieses Konzeptes mit Integration implantierter Zellen in Herzgewebe demonstrieren. Untersuchungen von Rubart et al. (2003) und Zimmermann et al. (2006) konnten dies ebenfalls unter Verwendung verschiedener Techniken zeigen.

## 1.2 Myokardiales *Tissue Engineering*

*Tissue Engineering* beschreibt die Generierung von funktionstüchtigem Gewebe aus einzelnen Zellen *in vitro* mit möglicher Funktionsüberprüfung und nachfolgender Implantation und Integration in ein geschädigtes Gewebe. An künstlich konstruiertes Herzgewebe werden verschiedene Ansprüche gestellt: (1) Es soll Kontraktionen ausführen, mechanische Kraft entwickeln und in entsprechender Größe generierbar sein, (2) die Morphologie von nativem Herzgewebe aufweisen, (3) eine elektrische Einheit bilden und (4) sich in das native Myokard integrieren können (Zimmermann 2008). Verschiedene *Tissue Engineering* Konzepte wurden entwickelt und im Verlauf weiter präzisiert (Zimmermann et al. 2006, 2009). Abbildung 1 zeigt eine Übersicht verschiedener myokardialer *Tissue Engineering* Verfahren: (1) Klassisches *Tissue Engineering* mit Fertigung von Matrizes im ersten Schritt und anschließender Besiedelung mit Zellen zur „Vitalisierung“ (Carrier et al. 1999, Li et al. 2000, Radisic et al. 2004); (2) spontane Aggregation unreifer Herzzellen in einem dreidimensionalen flüssigen Zell-Matrix-Gemisch (mit Kollagen, Laminin, Fibronectin u.a.) zu einem Herzgewebeverbund (Eschenhagen et al. 1997; Zimmermann et al. 2000, 2002, 2006; Fink et al. 2000); (3) Stapelung einzelner Zellschichten (Shimizu et al. 2002, 2006); (4) eine Modifikation des hängenden-Tropfen-Zellkultur-Systems als mikro-*tissue* Technik (Kelm et al. 2004); (5) Dezellularisation-Rezellularisations Ansatz des Organs (Ott et al. 2008).



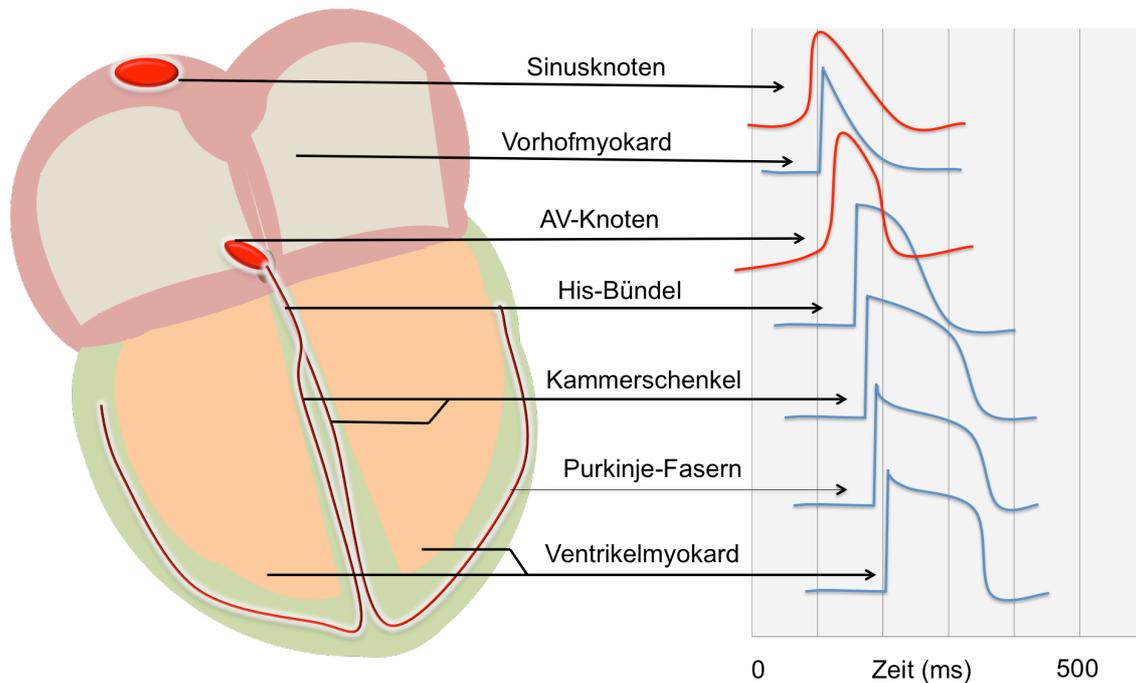
**Abbildung 1: Konzepte myokardialen *Tissue Engineerings***; aus Zimmermann (2009).

Eschenhagen et al. (1997) und Zimmermann et al. (2000, 2002, 2006) entwickelten das unter (2) beschriebene Verfahren zur Generierung eines dreidimensionalen künstlichen Herzgewebes (*Engineered Heart Tissue*, EHT), welches in dieser Arbeit verwendet wurde. Dabei werden neonatale Kardiomyozyten der Ratte in einem kollagenhaltigem Hydrogel mit Wachstumsfaktoren kultiviert und ein zirkuläres Herzmuskelorganoid generiert. Die entstandenen EHTs verfügen über einen hohen Differenzierungsgrad. Unter Ausbildung intensiv vernetzter, longitudinal ausgerichteter Herzmuskelstränge mit differenzierter Sarkomerbildung, engen Zell-Zell-Kontakten, bestehend aus Adhäsionsverbindungen, Desmosomen und einem gut ausgebildetem T-Tubuli-System weisen sie dabei hohe Ähnlichkeiten mit adultem, nativen Myokard auf (Zimmermann et al. 2002). Zudem werden Connexin-(Cx)-haltige *gap junction*-Verbindungen zwischen den Kardiomyozyten etabliert (siehe 1.3). In funktioneller Hinsicht, bei Kraft-Frequenz- und Kraft-Längen-Beziehung (Frank-Starling-Mechanismus),  $\beta$ -adrenerger Antwort und Reaktion auf Änderung der Kalziumkonzentrationen, verhalten sich EHTs einem differenziertem Herzgewebe sehr ähnlich (Eschenhagen und Zimmermann 2005). Untersuchungen von Aktionspotentialen in EHTs konnten elektrophysiologische Charakteristika eines nativen intakten Herzgewebes zeigen (Zimmermann et al. 2002). Diese vielversprechenden Erkenntnisse der EHT-Herstellung und -Analysen wurden durch den Beleg der prinzipiellen Anwendbarkeit als therapeutischen Gewebersatz von Zimmermann et al. (2006) bestätigt. Bei Implantation von EHTs auf Areale

infarzierter Rattenherzen konnte eine verbesserte kontraktile Funktion erreicht werden, mit funktioneller und elektrischer Integration des Implantats in das Empfängerherz. Essentiell dafür waren die wesentlichen Fortschritte, die bei der Generierung von EHTs seit den ersten Entwicklungen von Eschenhagen et al. (1997) und Zimmermann et al. (2000) erzielt werden konnten. Zimmermann et al. (2002, 2006) und Naito et al. (2006) konnten durch Modifizierung der Kultivierungsbedingungen die funktionellen Eigenschaften der EHTs optimieren. Parakrine Stimulation durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren wie Insulin oder PDGF-BB (Naito et al. 2006, Vantler et al. 2010), mechanischer Dehnung (Fink et al. 2000, Zimmermann et al. 2000) und die Optimierung der Sauerstoffbedingungen während der Kultivierung spielen dabei eine bedeutende Rolle (Zimmermann et al. 2006). Dennoch bleiben viele Details der Entwicklung von EHT unklar. Eine besondere Herausforderung stellt sich im Bereich der elektrischen Kopplung der Zellen und der Erregungsausbreitung, denn für die koordinierte Kontraktion eines Muskelverbandes, wie das des Herzens, ist die geordnete und anisotrope (also richtungsabhängige) Ausbreitung der elektrischen Erregung in einem elektrischen Netzwerk essentiell.

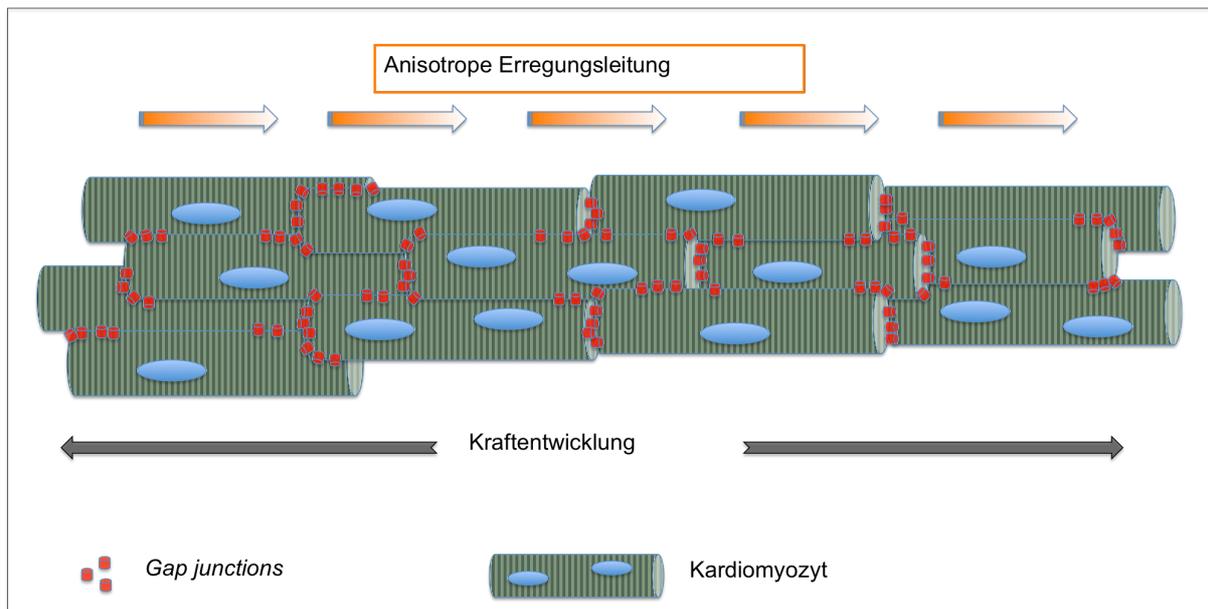
### **1.3 Physiologie der Herzaktion und Erregungsausbreitung, Bildung eines funktionellen Synzytiums**

Durch rhythmische Kontraktionen der Ventrikel während der Systole pumpt das Herz Blut durch den Körper- und Lungenkreislauf und sorgt so für eine ständige Perfusion der Organe. Unter Führung des taktgebenden Sinusknotens werden spontan Aktionspotentiale generiert, die über das Vorhofmyokard fortgeleitet werden, bis sie über den Atrio-Ventrikular-(AV)-Knoten, das His-Bündel, die Kammerchen und Purkinje-Fasern das Ventrikelmyokard erreichen und dieses erregen (Abb. 2). Dabei wird die elektrische Erregung von Kardiomyozyt zu Kardiomyozyt über das gesamte Myokard übertragen. Auf zellulärer Ebene induziert ein Aktionspotential mit Depolarisation der Zellmembran durch elektromechanische Kopplung einen intrazellulären Kalziumkonzentrationsanstieg, dem eine Kontraktionsbewegung folgt.



**Abbildung 2: Erregungsausbreitung über das Herz mit Darstellung der Aktionspotential** (nach Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagl, Physiologie, 6. Auflage, Thieme-Verlag 2009, Seite 158)

Der synchrone Ablauf der Kontraktion, als Folge einer koordinierten Erregungsausbreitung im Herzgewebe, ist somit eine wesentliche Eigenschaft des Herzens. Hierfür ist eine ungestörte Erregungsausbreitung mit intensiver Vernetzung der Kardiomyozyten erforderlich. Die für das Herzgewebe spezifischen Zell-Zell-Kontakte werden dabei in speziellen Gebieten, den Glanzsteifen (*disci intercalares*), gebildet. Desmosomen und Adhäsionsverbindungen formieren hier mechanische Zell-Zell-Verbindungen. Sie dienen vor allem der Stabilisierung des Gewebeverbundes und der Kraftübertragung. Grundlage der Fortleitung elektrischer Erregung von Zelle zu Zelle bilden die den mechanischen Kontakten benachbarten *gap junctions* (Abb. 3). Diesen Regionen mit spezialisierten Kanälen, bestehend aus Connexin-Proteinen, kommt eine zentrale Bedeutung zu. Sie stellen die basale, funktionelle Einheit eines elektrischen Netzwerkes dar. Ihre interzellulären Verbindungen zwischen einzelnen Myozyten sind zentraler Bestandteil des funktionellen Synzytiums.



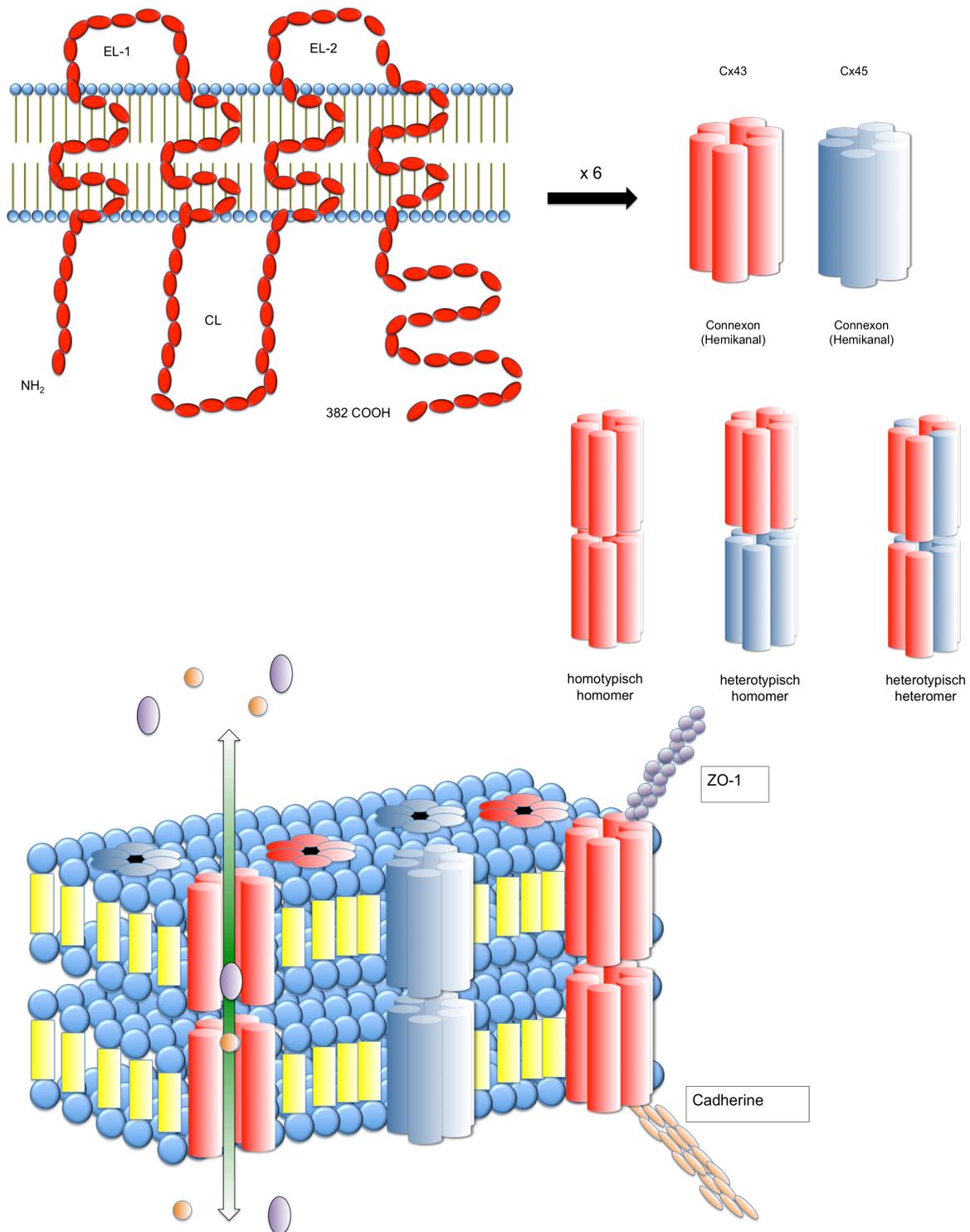
**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Herzgewebeausschnitts;** nach Zimmermann 2009. Morphologisch getrennte, individuelle Kardiomyozyten arbeiten über *gap junctions* verbunden als funktionelles Synzytium. Die Etablierung dieser Zell-Zell-Kontakte ermöglicht die anisotrope und verzögerungsfreie Ausbreitung der Erregung und bildet somit die Grundlage für eine synchrone Kontraktion. *Gap junctions* formieren sich im nativen Myokard in einem charakteristischen stufenartigen Muster in den Glanzstreifen an den Zellpolen der Kardiomyozyten.

#### 1.4 Aufbau von *gap junctions* und Connexin-Proteinen

Bei Organverbänden sind verlässliche Mechanismen der Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen von essentieller Bedeutung, um spezifische Funktionen koordiniert auszuführen. Eine Möglichkeit der direkten Zell-Zell-Kommunikation stellt die Verbindung über *gap junctions* dar (Bennett und Goodenough 1978). *Gap junctions* wurden nach ihrem elektronenmikroskopischen Erscheinungsbild benannt. Sie bilden spezialisierte Regionen, in denen die Membranen an den Grenzflächen benachbarter Zellen mit einer „Lücke“ von 2–3 nm dicht aneinander liegen (Dewey und Barr 1962; Robertson 1963; Sosinsky und Nicholson 2005). Sie weisen eine charakteristisch dichte Struktur mit in Gruppen (sogenannte *cluster* oder Plaques) angeordneten trans-membranen Kanälen auf. Diese Poren verbinden die Zytoplasmen benachbarter Zellen, wodurch die Weiterleitung elektrischer Erregung von Zelle zu Zelle und der Austausch von Ionen, Aminosäuren, Nukleotiden, Glukose, *second messengers* wie Adenosintriphosphat (ATP), cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositoltrisphosphat ( $InsP_3$ ) und anderen kleinen Molekülen ermöglicht wird (Lawrence et al. 1978; Harris 2001, 2007; Goldberg et al. 2004). Die Anzahl der Kanäle kann dabei von 10 bis mehrere 10.000 variieren (Severs et al. 2008). *Gap junctions* kommen in fast sämtlichen Säugetierzellen vor. Neben der Weiterleitung elektrischer Erregung im Herzen sind sie an der Regulierung von embryonaler Entwicklung, kontrolliertem Zellwachstum und Differenzierung sowie Gewebshomöostase beteiligt (Goodenough et al. 1996, Sáez et al. 2003). Mutationen in *gap junction*-Genen sind mit verschiedenen Erkrankungen wie Taubheit, Hauterkrankungen, Katarakt, peripheren und zentralen Neuropathien oder kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (Zoidl und Dermietzel 2010).

*Gap junction*-Kanäle werden von je zwei „Hemikanälen“, Connexone genannt, der angrenzenden Zellen gebildet. Grundlage der Connexone bilden jeweils sechs strukturbildende Transmembranproteine, die Connexine. Zimmer et al. (1987) beschrieben ein topologisches Modell, welches sich bis heute in verschiedenen Connexin-Isoformen grundsätzlich bestätigte (Abb. 4): Sie weisen dabei vier Transmembrandomänen, zwei extrazelluläre (EL1 und EL2) sowie eine intrazelluläre Schleife (CL) und einen zytoplasmatischen N- und C-Terminus auf (Laird 2006). Die C-Terminusdomäne ist sehr variabel und scheint eine Schlüsselrolle für Regulation, Phosphorylierungen und Protein-Protein-Interaktion, insbesondere mit

strukturbildenden Proteinen der Zelle wie Cadherinen, *Zonula Occludens*-1-Proteinen und weiteren, zu spielen (Laird 2006; Solan und Lampe 2009). Connexine bilden eine Proteinfamilie mit 21 verschiedenen Isoformen im Menschen und einer vergleichbaren Anzahl in anderen Spezies (20 Isoformen in der Maus; Harris und Locke 2009). In der gebräuchlichsten Nomenklatur nach Beyer et al. (1990) werden die Connexin-Subtypen ihrer Molekülmasse entsprechend nach Auftrennung im SDS-PAGE in Kilodalton (kDa) und einem Präfix für die entsprechende Spezies benannt. „rCx43“ steht für die generell am häufigsten exprimierte und am besten untersuchte Connexin-Isoform mit einer Molekülmasse von 43 kDa. Das Präfix „r“ steht hier für Ratte. Verschiedene Isoformen können unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen. In einer Zelle können gleichzeitig verschiedene Connexin-Isoformen co-exprimiert werden und so zu einer große Variabilität der Zusammensetzung der Kanäle und den funktionellen Eigenschaften beitragen (Harris 2001). Neben der Expression zweier homotypischer Hemikanäle, bestehend aus einer einzelnen Isoform, zu einen homomeren Kanal, können auch heterotypisch/homomere Kanäle entstehen. Diese bestehen aus zwei homomeren Hemikanälen unterschiedlicher Isoformen (z.B. Cx43 und Cx45 im Herzen; Coopen et al.1999; Desplantez et al. 2004). Auch die Bildung heterotypische/heteromere Kanäle, bestehend aus Hemikanälen, unter Oligomerisation unterschiedlicher Isoformen ist möglich (Abb. 4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von *gap junctions*, Connexonen und Connexinen;** nach Laird (2006). Sechs strukturbildende Connexin-Proteine mit je vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen (EL-1 und EL-2), einer zytoplasmatischen Schleife (CL), zytoplasmatischen N- und variablem C-Terminus bilden ein Connexon („Hemikanal“). Zwei Connexone formen einen Zytoplasmenverbindenden Kanal. Diese ermöglichen neben der verzögerungsfreien Weiterleitung elektrischer Erregung den Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von etwa 1 kDa und zeigen Interaktionen mit einer Reihe von strukturbildenden Proteinen der Zelle wie z.B. Cadherinen und *Zonula Occludens*-Proteinen (ZO-1).

Der „Lebenszyklus“ von Connexin-Proteinen ist trotz zahlreicher Untersuchungen nicht vollständig erklärt. In Anbetracht der Notwendigkeit einer stabilen Zell-Zell-Kommunikation für die Sicherung einer normalen Gewebefunktion ist die Halbwertszeit von Connexin-Proteinen mit nur 1,5 bis 5 Stunden erstaunlich kurz (Fallon und Goodenough 1981; Beardslee et al. 1998). Der ständige Wandel von Synthese und Abbau mit hohem Connexin-Umsatz scheint einen wesentlichen Regulationsfaktor in der Connexin-vermittelten Zell-Zell-Kommunikation darzustellen (Musil et al. 2000; Laird 2006). Connexin-Proteine gelangen, mit wenigen Ausnahmen über co-translationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum und nach dortiger Oligomerisation zu Connexonen über den Golgi-Apparat in die Zellmembran. Neu synthetisierte Connexine werden an den äußeren Rändern der *gap junction*-Plaques in die Membran integriert, ältere Connexine befinden sich im Plaque-Zentrum (Gaietta et al. 2002; Lauf et al. 2002). Der Ausbau aus der Zellmembran und der weitere Abbau von Connexin-Proteinen sind noch nicht hinreichend verstanden. Untersuchungen von Jordan et al. (2001), Murray et al. (2004) und anderen weisen darauf hin, dass ganze *gap junctions* oder Fragmente davon, inklusive der doppelten Zellmembran beider Zellen, als „*annular junctions*“ oder „Connexosomen“ von einer der beteiligten Zellen internalisiert werden und dann dem Abbau oder einem *recycling* zugeführt werden können (Laird 2006). Eine Rolle beim Abbau wird dabei „frühen Endosomen“ (*early endosomes*) zugeschrieben. Hier können Connexin-Proteinen nach Endozytose und Internalisierung dem weiteren Abbau über Lysosomen zugeführt werden, zurück in die Zellmembran integriert oder zum *trans*-Golgi-Netzwerk gebracht werden. Der Connexin-Abbau erfolgt über lysosomale Wege. Aber auch Ubiquitinierungsvorgänge und die direkte oder indirekte Beteiligung von Proteasomen scheinen nach Untersuchungen von Laing und Beyer (1995), Laing et al. (1998) und Musil et al. (2000) beim Cx43-Abbau von Bedeutung zu sein. Nach Erkenntnissen von Leithe und Rivedal (2004, 2007) und Girao et al. (2009) ist Cx43 vornehmlich ein Substrat von mono-Ubiquitinierung, welches eher als Internalisierungssignal dient, als von poly-Ubiquitinierung, welches typischerweise Proteine für einen Proteasomabbau markiert.

Viele der Connexin-Isoformen sind Phosphoproteine, so auch Cx43. Phosphorylierungen treten zumeist an Serin-, selten an Tyrosin-Aminosäuren am variablen C-terminalen Ende des Proteins auf. Verschiede Kinasen wie Proteinkinase

A (PKA) (Paulson et al. 2000), Proteinkinase C (PKC) (Berthoud 1992, 1993, Lampe 1994), Proteinkinase 1 (Cooper und Lampe 2002) und mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) (Cameron et al. 2003) wurden hier identifiziert. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen dienen als schneller Mechanismus der Regulation und Anpassung an veränderte physiologische oder pathophysiologische Zustände von *gap junction*-vermittelter Zellkommunikation (Solan und Lampe 2009). Dies geschieht auf verschiedenen Ebenen, wie der Connexon-Oligomerisation, dem Proteinexport in die Zellmembran, dem *gap junction*-Auf- und Abbau, der Kanalaktivität oder Änderung der Cx-Lokalisation in der Zelle durch Wandel der Proteinstruktur oder -Funktion (Solan und Lampe 2009). Im Herzen wurden unter anderem Phosphorylierungen von Cx43 an Ser<sup>365</sup> und Ser<sup>325</sup> /Ser<sup>328</sup> /Ser<sup>330</sup> von Cx43 identifiziert (Ek-Viktorin et al. 2006; Solan et al. 2007). In der Auftrennung nach SDS/PAGE sind dabei, den veränderten Migrationseigenschaften entsprechend, multiple Banden erkennbar.

## 1.5 Connexine im Herzen und in EHTs

Im Herzen spielen *gap junctions* und ihre strukturbildenden Connexin-Proteinen eine essentielle Rolle beim Ablauf einer koordinierten und somit effektiven Kontraktion. Grundlage dieser ist eine ungestörte Erregungsausbreitung von Zelle zu Zelle, basierend auf einer intensiven elektrischen Vernetzung durch *gap junctions*. Drei Connexin-Isoformen mit einem spezifischen räumlichen Verteilungsmuster und elektrischen Eigenschaften sind dabei von Bedeutung (Desplantez et al. 2007; Severs et al. 2008): Cx43 als prädominierende Isoform, vor allem im Arbeitsmyokard vorkommend mit Erregungsleitungsgeschwindigkeiten von ca. 0,5-0,75 m/s; Cx40 vorwiegend im atrialen Gewebe und im Erregungsleitungssystem (His-Bündel und Purkinje-Fasern) exprimiert mit schneller elektrischer Leitung (2 m/s) sowie Cx45 im Sinus- und AV-Knoten und Erregungsleitungssystem auftretend mit langsamer Fortleitung der elektrischen Erregung (0,05 m/s). Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Verteilungsmuster der Cx-Isoformen und deren (Co-)Expressionsmuster, wie in Abbildung 5 dargestellt, von Spezies zu Spezies variieren kann und dies bei Übertragung von gewonnenen Ergebnissen berücksichtigt werden muss, um Fehlinterpretationen zu vermeiden (Severs et al. 2008).

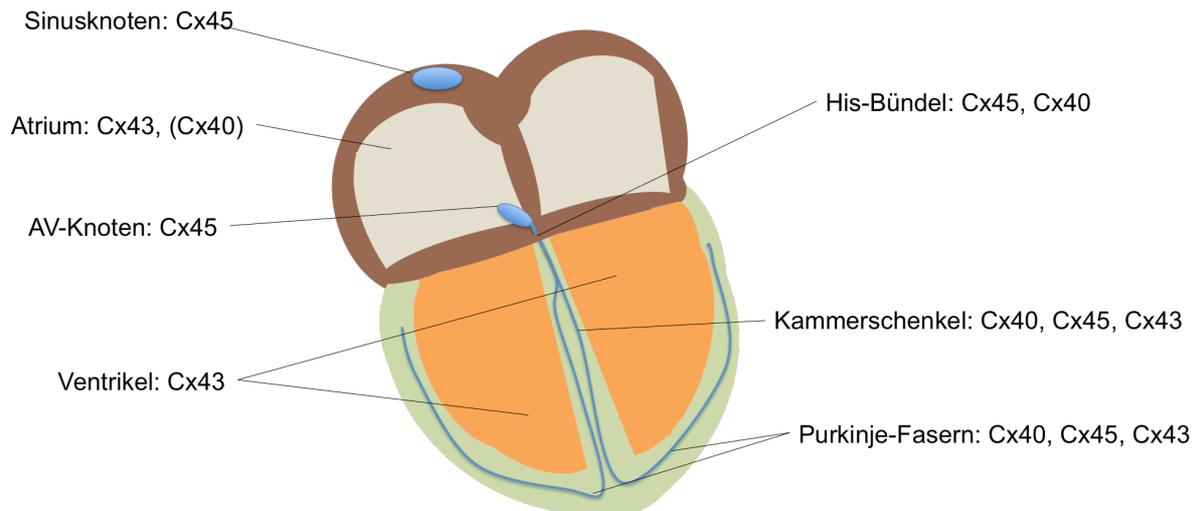


Abbildung 5: Strukturspezifische Verteilung der Connexin-Isoformen im Säugetierherzen; nach Severs et al. 2008.

Während der Entwicklung des Herzens verändert sich das räumliche Organisationsmuster der Connexine und der verschiedenen Isoformen (van Kempen et al. 1991, 1995, Severs et al. 2008). Auch auf zellulärer Ebene gibt es Änderungen in der räumlichen Verteilung der Connexine. In der Ratte ist zum Zeitpunkt der Geburt Connexin43 ubiquitär über die gesamte Zelloberfläche ventrikulärer Kardiomyozyten verteilt und erst drei Monate postpartal ist die typische Formierung in den Glanzstreifen abgeschlossen. Dabei werden die Glanzstreifen zunächst über mechanischen Zell-Zell-Kontakte, wie Desmosomen und *fascia adherentes* etabliert und anschließend elektrisch über Connexine gekoppelt (Angst et al. 1997). Peters et al. (1994) beschrieb, dass im menschlichen Herz die Entwicklung analog dazu verläuft, mit vollendeter Ausbildung im charakteristischen Connexin-Organisationsmuster nach dem 6. Lebensjahr und dass etwaige Korrekturoperation bei Herzfehlbildungen in diesem Entwicklungsstadium mit weniger postoperativen Arrhythmien assoziiert ist (Severs et al. 2001).

Es gibt zunehmend Erkenntnisse über Veränderungen der *gap junctions* und somit der Connexin-Anordnung und -Expression (*remodeling*) bei pathologischen Zuständen (Severs et al. 2008). Im Menschen wurden bei Erkrankungen wie Herzinsuffizienz basierend auf dilatativer Kardiomyopathie und Myokarditis, kompensierter oder dekomensierter Hypertrophie bei Aortenstenosen (Kostin et al.

2003, 2004) oder hypertropher Kardiomyopathie (Sepp et al. 1996) ein verändertes Cx43-Verteilungsmuster mit geringer interzellulärer *gap junction*-Verknüpfung gefunden (Severs et al. 2008). Ein als „Lateralisierung“ bezeichnetes Phänomen, mit Verlagerungen von Cx43-Proteinen aus den Bereichen der Glanzstreifen in laterale Membranabschnitte ist bei diversen pathologischen Zuständen des Herzens beobachtet worden, insbesondere bei Ischämie (Beardslee et al. 2000). Dies führte zu einer verminderter interzellulärer Kommunikation und zu einer geringeren Kopplung der Connexine an die Strukturproteine der Zellen (Hesketh et al. 2010). Die lateralisierten Cx43-Kanäle wiesen Dephosphorylierungen und ein verändertes Migrationsmuster in der SDS/PAGE-Analyse auf. Dies ging mit einer verlangsamten Erregungsleitung bei verminderter Zell-Zell-Diffusion des *Lucifer Yellow*-Farbstoff einher (Lampe et al. 2006). Diese Beobachtungen machen Connexine auch als therapeutisches Ziel interessant. Versuche mit dem Pharmakon Rotigaptide (ZP123), welches unter anderem durch Inhibierung der Dephosphorylierung von Cx43 eine Verminderung ventrikulärer und atrialer Tachyarrhythmien und Prävention ischämisch bedingter Arrhythmien bewirken soll, erscheinen vielversprechend (Kjolbye et al. 2007, 2008; Jozwiak und Dhein 2008).

Wie unter 1.2 beschrieben stellt sich EHT unter morphologisch-strukturellen, funktionellen und elektrophysiologischen Gesichtspunkten als differenziertes Herzmuskelgewebe dar. Durch Modifikation der Kultivierung mittels parakriner Stimulation mit Insulin und verschiedenen Variationen mechanischer Dehnung können EHTs in ihrer Funktion optimiert werden (Zimmermann et al. 2002). EHTs exprimieren *in vitro* und *in vivo* aus Cx43 bestehende *gap junctions* und können sich nach Implantation in ein Empfängergewebe elektrisch integrieren (Zimmermann et al. 2006). Über die elektrische Kopplung innerhalb der EHTs, den Prozess der Ausbildung eines funktionellen Synzytiums basierend auf Connexinen und deren möglichen Modulation ist jedoch wenig bekannt. Von zentraler Bedeutung für eine Optimierung von Gewebeäquivalenten wird daher das bessere Verständnis der beteiligten Mechanismen sein sowie die Identifizierung geeigneter Modulationmöglichkeiten und deren Anwendung *in vitro* und *in vivo*.

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Ausbildung und den Aufbau der Zell-Zell-Kontakt vermittelnden Strukturproteine (Connexine) der *gap junctions* in künstlich hergestelltem Herzgewebe (EHT) zu untersuchen. Weiterhin war es Ziel den Einfluss von Insulin und mechanischer Dehnung auf die Connexin-Ausbildung in EHTs zu untersuchen, da sich diese Modifikationen in der EHT-Herstellung nach Untersuchungen von Naito et al. (2006) und Zimmermann et al. (2002) als förderlich für die Generierung funktionsoptimierter EHTs erwiesen.

Im Einzelnen soll die vorliegende Arbeit folgende Punkte untersuchen:

1. Bildet sich in EHTs ein funktionelles Synzytium aus?
2. Welche der verschiedenen Connexin-Isoformen sind am Aufbau von *gap junctions* in EHTs beteiligt, und wie verhält sich die Connexin-Ausbildung im Verlauf der EHT-Entwicklung?
3. Kann die Ausbildung des funktionellen Synzytiums durch pharmakologische Stimulation (Insulin) und mechanische Dehnung moduliert werden?
4. Führt eine Änderung der Connexin-Expression oder -Organisation zu einer Beeinflussung der kontraktile Eigenschaften von EHTs?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Tierhaltung**

Die in diesen Versuchen verwendeten Tiere entstammten der Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Es wurden neonatale (0-3 Tage alt) männliche und weibliche Wistar-Ratten herangezogen. Die Tiere wurden bei handelsüblichem Labortierfutter und Wasser *ad libitum* gehalten. Eine Genehmigung für die Organentnahmen erfolgte durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg.

### **2.2 Kardiomyozytenpräparation**

Die Kardiomyozytenpräparation erfolgte wie in Zimmermann et al. (2000) beschrieben.

#### **2.2.1 Organentnahme**

Die Entnahme der gesamten Herzen neonataler Ratten (0–3 Tage alt) erfolgte nach Dekapitation und Sternotomie. Anschließend wurde diese in eine sterile Zellkulturschale mit 25 ml eisgekühltem, sterilen Kalzium- und Bicarbonat-freiem Hanks Puffer mit HEPES (CBFHH) überführt. Bei einer Präparation variierte die Anzahl der Tiere von 29 bis 50.

Alle weiteren Schritte der Zellpräparation, der Herstellung der EHTs und die anschließende Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen, mit frisch angesetzten, steril filtrierten oder autoklavierten Lösungen. Die für die Präparation verwendeten Instrumente (Scheren, Pinzetten) wurden stets autoklaviert.

#### **2.2.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss**

Mit einer Schere wurden zunächst die Gefäßstiele und Vorhöfe von den Ventrikeln getrennt, diese der Länge nach eröffnet und in eine weitere sterile Zellkulturschale mit 25 ml CBFHH überführt. Nach drei Waschschritten mit CBFHH und Abnahme des Puffers erfolgte die Zerkleinerung der Ventrikel mit einer Präparationsschere auf eine Größe von maximal 1 mm<sup>3</sup>. Anschließend erfolgte die Überführung dieser Gewebesuspension in ein steriles 50 ml Sammelgefäß. Es folgten drei weitere

Waschschritte mit je 10 ml CBFHH. Der Überstand wurde verworfen und anschließend mit dem Trypsin/DNA-Verdau des Gewebes nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) begonnen. Die Suspension mit den enthaltenen Gewebeteilchen wurde dafür zunächst in 8 ml Trypsin-Arbeitslösung aufgenommen. Bei ständiger Bewegung auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15 °, 60 Kippbewegungen/min) erfolgte die Inkubation für insgesamt 10 min. Der Überstand dieses Vorverdaus zeigte sich trübe verfärbt und wurde nach Sedimentation verworfen. Die Gewebesuspension wurde ein weiteres Mal in 8 ml Trypsin-Arbeitslösung aufgenommen und erneut für 10 min unter kontinuierlicher Schwenkbewegung auf der Kippwippe inkubiert. Dann erfolgte die Überführung des Überstandes in ein Sammelgefäß. Dieses war zuvor mit 2,5 ml aktivem fetalen Kälberserum (FKS) versetzt worden. Die verbliebenen Gewebestücke wurden anschließend in 7 ml DNase-Arbeitslösung inkubiert und trituiert (25–30 maliges Auf- und Abpipettieren mit weitlumiger Pipette). Nach Sedimentation wurde auch dieser Überstand in das selbige Sammelgefäß überführt. Ein Wechsel von Protein/DNA-Verdau und reinem DNA-Verdau wurde für den weiteren Prozess beibehalten. Die Dauer der weiteren Inkubationszeiten der Trypsin-Arbeitslösung wurden in den folgenden Arbeitsschritten, zunächst auf 4 min, anschließend auf 2,5 min verkürzt und bei 1,5 min für die restlichen Verdauungsschritte belassen, es sei denn, die entstandene Trübung des Überstandes machte eine Anpassung der Verdauungszeiten notwendig. Wurde ein 50 ml Sammelgefäß gefüllt, erfolgte die Reduktion des eingesetzten Volumens der verwendeten Arbeitslösungen in 0,5 ml Schritten bis auf 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung). Unter Fortführung dieser Technik dauerte der gesamte Verdau der Gewebestücke im Mittel 3,5 h. Es wurden dabei 6 bis 7 Sammelröhrchen gefüllt, welche bis zur anschließenden Zentrifugation (Zentrifuge mit Schwenkbecherröhrer (60 g, 15 min, 4 °C)) auf Eis gelagert wurden. Die pelletierten Zellen wurden in 4 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) suspendiert und in erneut in einem 50 ml Sammelgefäß erfasst, nachdem der klare Überstand nach Zentrifugation verworfen wurde. Die leeren Sammelröhrchen wurden mit 2 ml NKM-Medium gespült, dieses wurde ebenfalls zu der gesammelten Suspension der Zellen gegeben. Anschließend wurden 0,8% des Gesamtvolumens an DNase-Stammlösung zu dieser Suspension gegeben. Es erfolgte eine erneute Trituierung (etwa 30 Mal) und wiederum die Zentrifugation für bei 60 g für 15 min und 4 °. Das Zellpellet wurde nach Verwurf des

Überstandes in 32 ml NKM aufgenommen und durch ein Zellsieb (Maschengröße 100 µm) gegeben. Durch dreimaliges Messen (CASY-Cellcounter, Schärfe Systeme) erfolgte die Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen. Die EHT-Herstellung aus den so isolierten Zellen erfolgte sofort im Anschluss.

CBFHH:

136,9 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 mM MgSO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>, 5,55 mM Dextrose, 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>, 20 mM HEPES (2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)) in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (Aqua ad iniectabilia), pH 7,5 wurde mit NaOH eingestellt. CBFHH wurde steril filtriert und bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Trypsin-Stammlösung:

100 mg Trypsin (Dico) pro ml CBFHH bei 4 °C über Nacht rotierend lösen. Vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Trypsin/DNase-Arbeitslösung:

1,3 ml Trypsin-Stammlösung, 0,6 ml DNase Stammlösung, 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin, ad 50 ml mit CBFHH (auf Eis lagern).

DNase-Stammlösung:

100 mg DNase in 50 ml PBS ansetzen. Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

DNase-Arbeitslösung:

1,7 ml FKS (inaktiviert), 0,6 ml DNase-Stammlösung, Penicillin 100 U/ml /Streptomycin 100 µg/ml, ad 50 ml mit CBFHH (auf Eis lagern).

Fetales Kälberserum (FKS), inaktiv:

FKS wurde 1 h im Wasserbad bei mehrmaligem Umschwenken auf 56 °C erhitzt.

Phosphat-gepufferte Lösung (PBS):

8 g NaCl, 0,2 KCl, 1,15 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub>, 0,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1,0 l Aqua bidest; pH 7,4; zur Sterilisierung autoklaviert

Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM):

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>), 10% (v/v) FKS (inaktiviert), Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 µg/ml, 2 mM L-Glutamin

### 2.3 Aufreinigung und Kultur von Nicht-Kardiomyozyten

Neben der Isolation sämtlicher Herzzelltypen erfolgte die Aufreinigung von Nicht-Kardiomyozyten. Dafür wurden die mittels enzymatischen Gewebeaufschlusses (s. 2.2.2) gewonnenen Herzzellen auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert (40–50 Millionen Zellen pro Schale), um ein Anhaften der Zellen zu ermöglichen. Nach einer Wartezeit von 60 min (*preplating*; NKM-Medium 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) wurde das Medium und somit auch die nicht angehafteten Zellen (v.a. Herzmuskelzellen) vorsichtig abgesaugt. Die zurückgebliebenen Zellen wurden weiter kultiviert. Bei Erreichen einer 70%igen Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe Trypsin (0,05% Trypsin/EDTA) von der Schale gelöst und auf vier neue Schalen verteilt. Die Zellen wurden für 3 bis 5 Passagen kultiviert. Ab der zweiten Passage waren keine kontrahierenden Kardiomyozyten zu identifizieren. Einer Erneuerung des Kulturmediums (NKM) erfolgte jeden zweiten Tag.

### 2.4 Herstellung von *Engineered Heart Tissue* (EHT)

Die Herstellung von EHT erfolgte analog zu der Beschreibung von Zimmermann et al. (2000, 2002).

#### 2.4.1 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

Zunächst erfolgte die Desinfektion von 120 angebrüteten Eiern (7. –9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit 70% Ethanol. Anschließend wurden die Schalen der Eier mit einer Schere eröffnet, die Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen und nach Dekapitation die Köpfe und Körper in 500 ml Flaschen überführt. Diese waren mit je 150 ml eisgekühltem CBFHH + 2% P/S (d.h. 200 U/ml Penicillin/200 µg/ml Streptomycin) vorbereitet. Es erfolgte die Homogenisierung (Polytron<sup>®</sup> Homogenisator) und die anschließende Zentrifugation (1000 g, 15 min, 4 °C) in Zellkulturflaschen (150 ml). Die Überstände wurden gesammelt. Die Pellets wurden zusammengefügt, erneut mit CBFHH auf 150 ml aufgefüllt, homogenisiert und zentrifugiert (1000 g, 15 min, 4 °C). Diese Überstände wurden wiederum gesammelt, mit den Überständen der ersten Zentrifugation vereinigt, á 14 ml aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Aus einer Präparation mit 120 Eiern konnten durchschnittlich 400–500 ml Hühnerembryonenextrakt gewonnen werden.

### 2.4.2 Herstellung von Kollagen Typ I

Zur Herstellung von Kollagen Typ I wurden sechs Schwänze ausgewachsener Wistar-Ratten verwendet. Diese wurden von den Körpern abgetrennt und bis zur Herstellung bei -20 °C gelagert. Der gesamte Prozess erfolgte steril. Die Rattenschwänze wurden zunächst aufgetaut und desinfiziert (Ethanol, 70%), anschließend der Länge nach inzidiert, zunächst die Haut und dann die bindegewebigen, Kollagen-Fasern enthaltenden Stränge mit einer Pinzette abgezogen. Diese wurden anschließend in einer Schale mit *Earle's based salt solution* (EBSS) gesammelt und zweimal mit EBSS gewaschen. Die Sehnenfäden wurden dann in einem 500 ml Glaskolben mit 300 ml Essigsäure (0,1% in *Aqua ad iniectabilia*) versetzt und im Kühlraum bei 4 °C über mehrere Tage kontinuierlich gerührt. Dabei lösten sich diese fast vollständig auf und konnten anschließend bei 20.000 g für 2 h bei 4 °C zentrifugiert werden (Ultrazentrifuge L7-65 mit Festwinkelrotor, Beckman). Der Überstand wurde gesammelt. Zur Ausfällung des Kollagens erfolgte die Anhebung der Salzkonzentration auf etwa 4%. Dies konnte durch die langsame Zugabe eisgekühlter NaCl-Lösung (25%) unter ständigem Rühren und Inkubation bei 4 °C über Nacht erreicht werden. Es erfolgte die erneute Zentrifugation (20.000 g, 30 min, 4 °C). Nach Verwerfung der Überstände wurden die Pellets in jeweils 250 ml kalter 0,1%iger Essigsäure aufgenommen und durch kontinuierliches Rühren bei 4 °C über Nacht gelöst. Anschließend erfolgte zur Reduktion des NaCl-Gehaltes die zweimalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1%). Vor der abschließenden photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry (1951), erfolgte das Lösen des Kollagens in 0,003% SDS bei 95 °C.

### 2.4.3 Herstellung von EHTs

Die Herstellung der EHTs wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um ein vorzeitiges Aushärten des Kollagens zu verhindern, erfolgten alle Schritte auf Eis unter Verwendung von gekühlten Gefäßen, Substanzen und Pipetten. Die einzelnen Bestandteile wurden stets in der gleichen Reihenfolge verwendet. Dabei wurde zunächst die erforderliche Menge Kollagen vorbereitet und mit dem gleichen Volumen zweifach konzentriertem EHT-Medium versetzt. Durch Titration mit NaOH (0,1 N) wurde der zu diesem Zeitpunkte saure pH-Wert neutralisiert. Anschließend

erfolgte die Zugabe (10% v/v) von Exsudat des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors der Maus (extrazelluläre Matrix, Matrigel), gefolgt von der volumenangepassten Zellsuspension. Nach Vermengung durch vorsichtiges, wiederholtes Trituieren wurden je 900 µl des Kollagen-Zell-Gemischs zügig in zirkuläre Gussformen pipettiert (Zimmermann et al. 2000). Die Viskosität und die Oberflächenspannung des Gemisches ermöglichten den Überschuss an Volumen (150 µl), bei geringerem Fassungsvermögen der Gussformen (~750 µl), unter Aufwölbung des Kollagen-Zell-Gemisches in den Gussformen zu platzieren (siehe Abb. 6A). Um eine leichte Aushärtung des Kollagen-Zell-Gemischs zu erreichen, wurden die Kulturschalen für 1 Stunde bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden vorsichtig 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2 EHTs) dazugegeben.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs:

Kollagen I (4,2 mg/ml)	847 µl	= 0,8 mg/EHT
2x DMEM	847 µl	
NaOH (0,1 N)	184 µl	
Matrigel	400 µl	= 10%
Zellsuspension (6,39*10 <sup>6</sup> Zellen/ml)	1722 µl	= 2,5*10 <sup>6</sup> Zellen/EHT
Gesamtvolumen:	4000 µl	

Pro EHT wurden 0,8 mg Kollagen eingesetzt. Dies machte eine Anpassung des eingesetzten Volumens des Kollagens je nach Konzentration der Charge erforderlich. Das Volumen des Mediums und der NaOH wurde der Menge an Kollagen-Lösung angepasst. Um ein Gesamtvolumen von 4 ml zu erreichen, musste das Volumen und die Zellkonzentration der Suspension entsprechend eingestellt werden. Bei hoher Viskosität des Kollagen-Zell-Gemisches wurde ein Pipettierverlust von 100 µl pro EHT kalkuliert. So wurde mit einem eingesetzten Volumen von 4 ml 4 EHTs mit einem Volumen von 900 µl pipettiert.

EHT-Medium:

*Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium* (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>), 10% Pferdeserum, 2% Hühnerembryonenextrakt, Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 µg/ml

Konzentriertes (2x) EHT-Medium:

1 ml 10x DMEM, 1 ml Pferdeserum (inaktiviert; 20%), 0,2 ml Hühnerembryonenextrakt (4%), Penicillin 200 U/ml / Streptomycin 200 µg/ml, ad 5 ml mit H<sub>2</sub>O. Vor Herstellung der EHTs frisch angesetzt.

10x DMEM:

13,3 mg DMEM Pulver (100x) in 10 ml H<sub>2</sub>O lösen und vor Gebrauch durch 0,2 µm Filter steril filtrieren. Bei 4 °C lagern.

#### **2.4.4 Herstellung von Gewebekonstrukten aus Nicht-Kardiomyozyten**

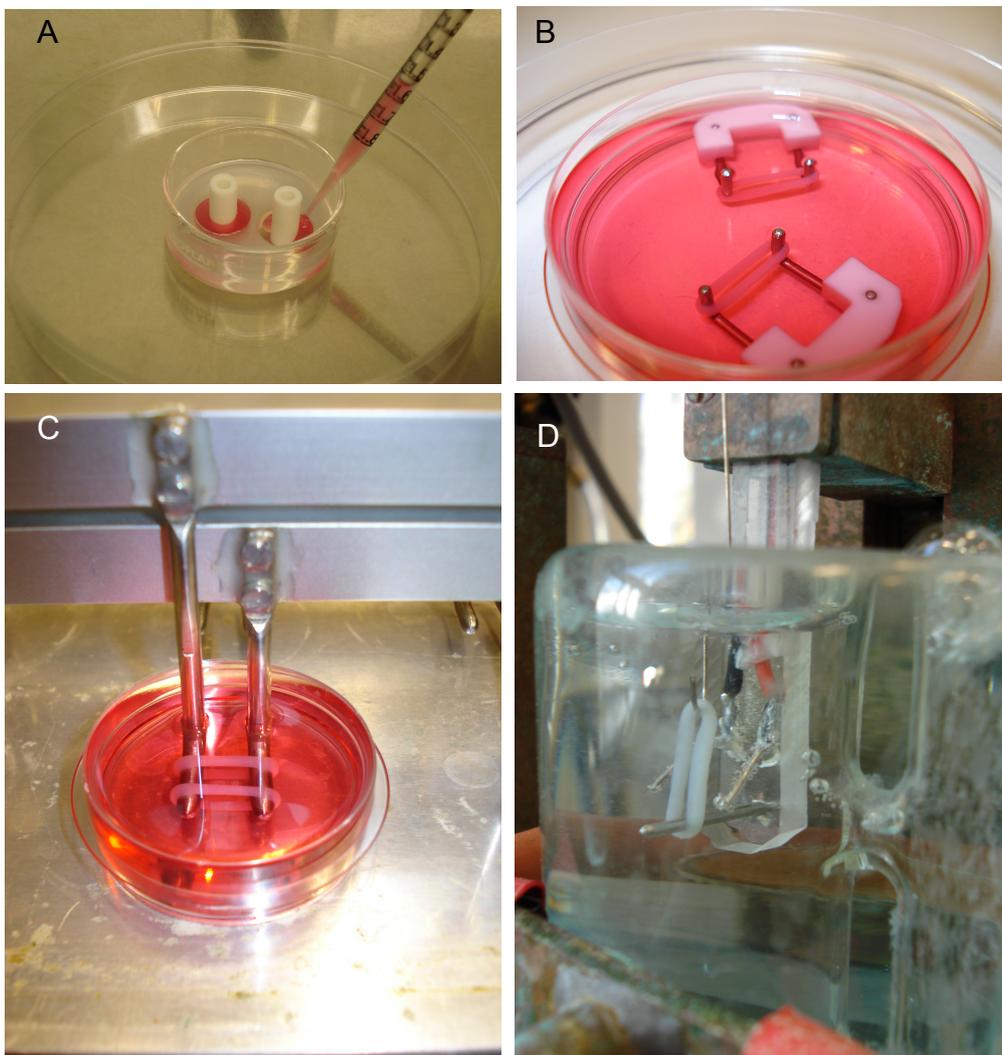
Für die Herstellung nicht-kontraktiver Kontroll-Konstrukte (*engineered connective tissue, ECT*) wurden Nicht-Kardiomyozyten aus Herzen neonataler Ratten (siehe Kapitel 2.3) verwendet. Die Generierung dieser Gewebekonstrukte erfolgte analog zu dem in Kapitel 2.4.3 beschriebenen Verfahren der EHT-Herstellung, jedoch ohne den Einsatz von Matrigel. Anstelle des Kardiomyozyten-Gemisches wurden dabei  $2,5 \cdot 10^6$  Nicht-Kardiomyozyten pro Gewebekonstrukt verwendet. Die Kultivierung erfolgte in NKM Medium analog zu den EHTs.

#### **2.5 Kulturbedingung und Interventionen**

EHTs wurden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen im Zellkulturschrank kultiviert. Der Wechsel des EHT-Mediums erfolgte erstmals nach 24 h, dann alle 48 h. Am siebten Tag der Kultivierung wurden die EHTs auf Abstandshalter überführt. Von da an fand ein Mediumwechsel bei phasisch gedehnten EHTs alle 24 h, bei statisch gedehnten EHTs alle 48 h statt. Die gesamte Dauer der Kultivierung betrug 13 Tage.

Die Intervention durch Supplementierung des Mediums mit Insulin erfolgte ab der ersten Mediumzugabe (Tag 0) und wurde bis zum Ende der Kultivierung fortgeführt. Dabei wurde Insulin (10 µg/ml) mit dem Medium vorgemischt und bei jedem Mediumwechsel erneuert.

Zur Untersuchung der Auswirkungen unterschiedlicher Dehnungsformen durch verschiedene Abstandshalter wurden EHTs am siebten Kultivierungstag auf mechanische Abstandshalter überführt. Eine statische und eine phasische Dehnungsform wurden hierbei untersucht (siehe Abb. 6B und C). Die Abstandshalter wurden so eingestellt, dass eine Dehnung von 110% der Ausgangslänge der EHTs erreicht wurde. Beim phasischen Dehnungstyp wurde eine Frequenz von 1 Hz an Tag 7 (1. Dehnungstag) gewählt, ab Tag 8 wurde die Frequenz auf 2 Hz erhöht.



**Abbildung 6: Herstellung und Kultur von EHTs.** (A) Pipettieren des viskösen Kollagen-Zell-Gemisches in Gussformen mit zentral stehenden Teflonzylinder, 2 EHTs pro Gussform. Darstellung von statisch (B) und phasisch (C) gedehnten EHTs (ab Tag 7). (D) EHT im Organbad zur Kontraktionsmessung, mit Kraftaufnehmer am oberen Pol des EHTs und Stimulationselektroden seitlich davon.

## 2.6 Kontraktionskraftmessung

Am 13. Tag der Kultivierung wurden Kontraktionsparameter der EHTs in modifizierter Tyrode-Lösung (siehe Tab. 1) in temperierten Organbädern ermittelt. Dabei wurden die EHTs zunächst ohne Vordehnung ( $L_o$ ) zwischen induktiven Kraftaufnehmern (am oberen Pol des EHTs in Abb. 6D) und Haltepolen in Organbädern mit Tyrode-Lösung mit einer Kalziumkonzentration von 1,8 mM aufgehängt (siehe Abb. 6D). Als  $L_o$  wurde die Gewebelänge der EHTs (14,5 mm) angenommen, die durch die Abstandhalter während der Kultivierung ab dem 7. Tag vorgegeben wurden. Nach einer Äquilibrationszeit von etwa 30 Minuten, in welcher die spontane Kontraktionsfrequenz der EHTs gemessen werden konnte, wurde die elektrische Stimulation eingeschaltet und die mechanische Dehnung der EHTs in Schritten von 0,1 mm von  $L_o$  auf  $L_{max}$  gesteigert. So konnte die Kraft-Längen Beziehung (Frank-Starling-Mechanismus) ermittelt werden. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Wechsel der Tyrode-Lösung und erneute Äquilibration in Tyrode-Lösung mit einer Kalziumkonzentration von 0,2 mM. Die Kontraktionsparameter der EHTs wurden nun unter zunehmenden Kalziumkonzentrationen (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 und 2,4 mM) bestimmt. Nach weiterem zweimaligem Wechsel der Tyrode-Lösung (Kalziumkonzentration 0,2 mM) erfolgten Versuche der  $\beta$ -adrenergen Stimulation und Bestimmung einer kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin (spezifischer Agonist an  $\beta$ -Adrenozeptoren;  $10^{-10}$  –  $10^{-6}$  M). Die gesamten Kontraktionsmessungen wurden unter elektrischer Stimulation (Frequenz 2 Hz, Pulsdauer 5 ms, Pulsintensität 100–150 mA, 20% über der Reizschwelle) bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) zur pH-Einstellung (pH 7,4) durchgeführt. Die durchgeführten Versuche erfolgten unter bestmöglicher Vordehnung der EHTs ( $L_{max}$ ). Die Aufzeichnung und Analyse der Kontraktionsexperimente erfolgte mit Hilfe der *Amon/Bmon-Software* (Ingenieurbüro Jäckl). Nach den Kontraktionsversuchen wurden die EHTs in PBS gewaschen und ihrer weiteren Verwendung entsprechend in TRIzol<sup>®</sup>, Lysis-Puffer oder in PBS mit 4% Formaldehyd für eine spätere Probenanalyse aufgenommen.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung der im Organbad verwendeten Tyrodelösung

Tyrode Stammlösung 1 (0,2 mM Ca <sup>2+</sup> ):		
NaCl		175 g
KCL		10 g
CaCl <sub>2</sub> -Stamm (2,25 M)		2,22 ml
MgCl <sub>2</sub> -Stamm (1,05 M)		25 ml
Aqua bidest.		Ad 1000 ml
Tyrode Stammlösung 2:		
NaHCO <sub>3</sub>		50 g
Aqua bidest.		Ad 1000 ml
Tyrode Stammlösung 3:		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)		5,8 g
Aqua bidest.		Ad 1000 ml
Tyrode-Arbeitslösung:		
Stammlösung 1		40 ml
Stammlösung 2		38 ml
Stammlösung 3		10 ml
Glucose		1 g
Na <sub>2</sub> EDTA		18,6 mg
Ascorbinsäure		50 mg
Aqua bidest.		ad 1000 ml

## 2.7 Echtzeit PCR-Analyse

Zur Erfassung der Transkriptkonzentration wurde die mRNA aus EHTs isoliert und die zu bestimmenden mRNA-Produkte mittels reverser Transkriptase (RT) durch quantitative Echtzeit-PCR untersucht.

### 2.7.1 RNA-Präparation

Die Präparation der RNA aus EHTs, nicht-kontraktile Gewebekonstrukte und nativem Gewebe erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) mit TRIzol®. Das RNA-Präzipitat wurde in DEPC-Wasser gelöst und gelagert. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch mittels

Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (NanoDrop, ND-1000 Spectrophotometer, Thermo scientific). Zur Kontrolle der Reinheit der gewonnenen RNA-Proben wurde die optische Dichte bei 280 nm bestimmt (Absorptionsmaximum für Proteine) und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet (1,8–2,0 MW:  $1,9 \pm 0,06$  bei den Versuchen,  $n=24$ ). Die Lagerung der Proben erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

DEPC-Wasser:

1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) auf 1 l H<sub>2</sub>O (0,1%) über Nacht bei RT (alternativ 1 Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) unter ständigem Rühren. Vor Verwendung autoklavieren.

**2.7.2 Reverse Transkription**

Für die Umwandlung der RNA in cDNA wurde das SuperScript II Kit (*SuperScript First-Strand Syntheses for RT-PCR*, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurde 1 µg RNA je Probe eingesetzt. Die Proben wurden zunächst mit Oligo dT *primer* und dNTP mix versetzt und denaturiert ( $65^{\circ}\text{C}$  für 5 min.) und anschließend auf Eis gekühlt ( $>1\text{ min.}$ ). Zur Verbesserung der Sensitivität der PCR wurde nach Terminierung der Reaktion RNA von cDNA:RNA Hybridmolekülen durch Zugabe von RNase verdaut. Die Reaktionsschritte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Reaktionsmix:

1 µg RNA	x µl (variiert nach Konzentration)
10 mM dNTP mix	1 µl
Oligo dT	1 µl
DEPC Wasser	ad 10 µl
10x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNaseOUT	1 µl
SuperScript II RT	1 µl
RNase H	1 µl

**Tabelle 2:** Temperaturprogramm für die unspezifische reverse Transkription

Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	65	5	1
	0	>1	1
Anlagerung	42	2	1
Elongation	42	50	1
Terminierung	70	15	1
RNA-Entfernung	37	20	1
Lagerung	-20	-	-

### 2.7.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) erfolgte die Bestimmung der mRNA durch Quantifizierung der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA auf einem ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, USA) laut Herstellerhandbuch. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM 7700 *Sequence Detection System Software* Version 1.7. Für die erforderlichen Reagenzien wurde der TaqMan® Universal PCR-Master Mix (*Applied Biosystems*) verwendet. Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Calsequestrin-2 (CSQ2) oder 18S-rRNA wurden als interner Standard (Referenz-Gene, „Haushaltsgene“) verwendet. Zunächst wurde die Differenz der Ct-Werte der Standards und der Ct-Werte der zu bestimmenden cDNA errechnet ( $\Delta Ct$ ). Für die Bestimmung der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte erfolgte die Subtraktion jedes einzelnen  $\Delta Ct$ -Werts vom Mittelwert aller  $\Delta Ct$ -Werte der Kontrollgruppe. Durch Delogarithmierung (natürlicher Logarithmus mit Basis  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) wurden die Transkriptmengen im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt.

Das Pipettierschema eines Reaktionsansatzes einer einzelnen Probe ist unten dargestellt. Die Temperaturbedingungen der qPCR-Schritte sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zur Quantifizierung und Kontrolle der Expression wurde für jedes Primer-Sonden-Paar bei jedem qPCR-Lauf eine Verdünnungs-/Standardreihe erstellt. Diese bestand aus einer zu gleichen Teilen hergestellten cDNA-Mischung aller verwendeten Proben.

Die relativen Konzentrationen aus der Standardreihe wurden für jede Probe auf die relative Konzentration des internen Standards bezogen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung ausgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle (Wasser-Kontrolle, ohne cDNA) mitgeführt.

Reaktionsansatz:

H <sub>2</sub> O	3,3 µl
TaqMan-Mastermix	5 µl
<i>Forward</i> primer (20 µM)	0,3 µl
Reverse primer (20 µM)	0,3 µl
Sonde(100 µM)	0,1 µl
cDNA (1:10 verdünnt)	1 µl

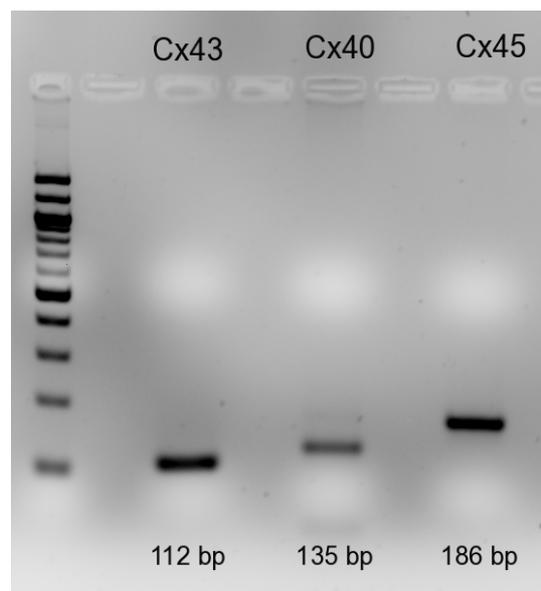
**Tabelle 3:** Temperaturbedingungen für TaqMan-PCR

Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)	Anzahl der Zyklen
Schritt 1	50	02:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3 {	95	00:15	} 45
	60	01:00	

### 2.7.4 TaqMan-Sonden und PCR-Primer Design

Die Sonden und Oligonukleotid-Fragmente (*primer*) für die Bestimmung der Connexin43, 40 und 45 Isoformen wurden anhand des Rattengenoms mit Hilfe der Software *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>, 2007) selbst entworfen (siehe Tab. 4). Um unerwünschte Amplifikationen von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die *primer* so gewählt, dass ihre Zielsequenzen innerhalb eines Exons liegen. Die Spezifität der *primer* wurde mithilfe des *BLAST*-Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2008) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA) überprüft. Es wurde darauf geachtet, eine optimierte Schmelztemperatur, Sekundärstruktur, Basenzusammensetzung und Länge des Amplikons zu erzielen. Um unspezifisches Binden an genomische DNA zu vermeiden, wurden die Sonden so gewählt, dass ihre Zielsequenzen Exon-überlappend waren (siehe Tab. 4). Oligonukleotide mit den optimierten Sequenzen

wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Zur Überprüfung der Spezifität der *Primer*-Paare wurden RT-PCR Reaktionen durchgeführt und die PCR-Produkte auf einem zweiprozentigen Agarosegel analysiert. Bei nur einer sichtbaren Bande mit der Größe des erwarteten Amplikons wurde das *Primer*-Paar als spezifisch angenommen (Abb. 7).



**Abbildung 7: RT-PCR:** PCR-Produkte selbst entworfener *primer* für die Connexin Isoformen 43, 40 und 45 mit der erwarteten Größe des Amplikons

**Tabelle 4:** Sequenzen und Startpositionen der selbst entworfenen Sonden und *primer* für RT-PCR und quantitative PCR (Angabe Startposition jeweils als Nummer des Basenpaares des Transkriptes)

Cx40	PCR-Produkt 135 bp	Exon	Start pos
Forward <i>primer</i> :	GAG CCT GAA GAA GCC AAC TC	1	38
Reverse <i>primer</i> :	GAC CGT AGA GTG CTT GTG GA	2	172
Sonde:	AGG AAG CAG AAG GCT CAG CAC CA	1-2	74
Orientierung:	5'3'sense		
<u>Ausschnitt des Transkripts:</u>			
CAAGAGCAAATAACACTGGACAGTTGAACAGCAGCCA <b>GAGCCTGAAGAAGCCA</b> <b>ACTC</b> CAGGGCGGAGGAA <b>AGGAAGCAGAAGGCTCAGCACCA</b> GTCTCCAACACTT GGCAAGATGGGTGACTGGAGCTTCTGGGGGAGTTCCTGGAGGAGG <b>TCCACA</b> <b>AGCACTCTACGGTC</b> ATCGGCAA			
Cx43	PCR-Produkt: 112 bp	Exon	Start pos
Forward <i>primer</i> :	GTC CAG AAG CTT CCC CAA G	1	2906
Reverse <i>primer</i> :	CTT CAG CCT CCA AGG AGT TC	2	3017
Sonde:	ACC CAT GTC TGG GCA CCT CTC TTT	1-2	2936
Orientierung:	5'3'antisense		
<u>Ausschnitt des Transkripts:</u>			
GCAGACTTTTAAACTTTAAACAGACAGGTCTGAGAGCCTGAACTCTCATTTTTCC TTTGA <b>CTTCAGCCTCCAAGGAGTTC</b> CACCAACTTTGGCGCGCCGGCTTCACTTT CATTAAAGTG <b>AAAGAGAGGTGCCAGACATGGGT</b> GACTGGAGTGC <b>CTTGGGGAA</b> <b>GCTTCTGGACAAGGTCCAAGCCTACTCCACCGCTGGAGGGAAGGTGTGGCTGT</b>			
Cx45	PCR-Produkt: 186 bp	Exon	Start pos
Forward <i>primer</i> :	AAA GGA GGT TTT GGG TAA CG	2	40
Reverse <i>primer</i> :	GAT GGA CTC TCC TCC TAC CG	3	225
Sonde:	TTC TGG TTA ACA GGG CAA ACC AAT TCC	2-3	64
Orientierung:	5'3'sense		
<u>Ausschnitt des Transkripts:</u>			
GTAACAAACACAGCACAGAGTCTG <b>AAAGGAGGTTTTGGGTAACG</b> GAGG <b>TTCTG</b> <b>GTTAACAGGGCAAACCAATTCC</b> ACCACCATGAGTTGGAGCTTCTGACTCGCCT GCTAGAGGAGATACACAACCATTGACGTTTGTAGGGAAGATCTGGCTCACTGT GCTGATTGTCTTTCGAATTGTCCTAACTG <b>CGGTAGGAGGAGAGTCCATC</b> TACTA			

## 2.8 Western blot Analyse

Nach Herstellung und Kultivierung (siehe Kapitel 2.4) wurden die EHTs am 13. Kultivierungstag von den Abstandhaltern genommen und das anhaftende Medium in zweimaligen Waschschritten mit PBS in einer Kulturschale entfernt. Anschließend wurden die EHTs in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, welches mit 300 µl Lysis-Puffer vorbereitet war und dann mittels Ultraschall (2 mal 10 s 30 mA Sonificator, Bandelin Electronic) auf Eis homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 12.000 g. Die im Überstand gelösten Proteine wurden in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt.

### Lysis-Puffer:

2 ml 1,5 M Tris Hcl (pH 8,8)	→ 30 mM
1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)	→ 5 mM
3 ml 1 M NaF	→ 30 mM
30 ml 10% SDS	→ 3%
10 ml Glycerol	→ 10%
54 ml Wasser	

### 2.8.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (1951) unter Einsatz des Biorad DC Protein Assay nach Angaben des Herstellers. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 750 nm. Um eine Überprüfung der Linearität des Assays zu ermöglichen, wurde bei jeder Messung eine Standardreihe erstellt.

### 2.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel. Eine gleichmäßige Beladung mit einer für den jeweiligen Antikörper geeigneten Menge (25 µg pro Tasche) wurde durch die vorangegangene Proteinbestimmung gewährleistet. Die Gele bestanden aus einem unten liegenden 10%igen Trenngel und einem darauf gegossenen, 4%igen Sammelgel mit präformierten Kammern zur Beladung der

Proben. Eine dieser Kammern wurde stets mit einem Molekulargewichtsstandard (*Precision Plus™ All Blue*, Biorad) beladen, um eine Zuordnung der Proteine zu ermöglichen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer anfänglichen Stromstärke von 10 mA, die während des Laufes auf bis zu 20 mA erhöht wurde. Ein Spannungswert von 200 V wurde nicht überschritten. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront die Unterkante des Gels erreicht hatte (nach ca. 100 min).

### **2.8.3 Western blot**

Mittels Nassblot-Verfahren wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran®, 0,45 µm Porengröße) überführt. Dieser Transfer der Proteine wurde unter konstantem Gleichstrom von 100 mA für 45 min und weiteren 45 min bei 300 mA durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S für 5 min inkubiert und gefärbt. Die Banden des Proteinstandards wurden markiert und in einer Belichtungskammer (*Bio Imaging Systems, Chemi Genius<sup>2</sup>*) fotografisch dokumentiert, um eine spätere Identifikation des Molekulargewichtes spezifisch gefärbter Banden zu ermöglichen. Die Membran wurde mit Tris-buffered saline (TBS) mit TWEEN 20 (TBST) gewaschen und somit entfärbt. Die anschließende Inkubation in einer 5%igen Milchpulver-Lösung (Milchpulver in TBS-T Puffer) für 1 h bei RT führte zu einer Blockierung unspezifischer Bindungsstellen des Antikörpers. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST für jeweils 5 min erfolgte die Inkubation mit dem primären spezifischen Antikörper. Dies wurde über Nacht unter kontinuierlicher Bewegung bei 4 °C durchgeführt. Es folgten drei weitere Waschschrte mit TBST für je 5 min und die anschließende Inkubation mit dem gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers gerichteten, sekundären Antikörper in Trockenmilch-Lösung für 1 h. Es folgten erneut drei Waschdurchgänge für je 5 min in TBST. Die Visualisierung der Antikörper erfolgte mit dem *ECL Western blotting detection system (Enhanced Chemiluminescence, Pierce)*. Dazu wurde die Membran mit den Reagenzien nach Angaben des Herstellers versetzt. Durch die Umsetzung des darin enthaltenen Substrats, durch die am sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase wurde eine Chemolumineszenz erzeugt, die in der Belichtungskammer visualisiert und fotografisch festgehalten werden konnte. Die Analyse erfolgte mittels *Gene Tool Software*. Die Quantifizierung der Schwärzungen der einzelnen Banden erfolgte mittels Densitometrie unter Berücksichtigung des für die jeweilige Bande korrespondierenden Hintergrundwertes.

Trenngel (10%):

Acrylamid (40%, Mix 37,5 : 1)	2,5 ml
Aqua bidest.	4,8 ml
Tris Hcl (1,5 M, pH 8,8)	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	4,0 µl

Sammelgel (4%) :

Acrylamid (40%, Mix 37,5 : 1)	1,275 ml
Aqua bidest.	6,025 ml
Tris Hcl (0,5 M, pH 6,8)	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	0,1 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	0,01 ml

Laufpuffer:

6,04 g Tris, 28,8 g Glycin, 2,0 g SDS, ad 2000 ml H<sub>2</sub>O

6x Lämmli-Puffer:

1,2 g SDS, 6,0 g Glycerol, 0,93 g DTT, 6 mg Bromphenolblau, 1,2 ml Tris Hcl (0,5 M, pH 6,8), ad 10 ml H<sub>2</sub>O

1x Lämmli-Puffer:

1 ml 6x Lämmli-Puffer, 5 ml H<sub>2</sub>O

Transferpuffer:

Tris 3,025 g, Glycin 14,4 g, Methanol 200 ml, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O (Lagerung bei 4 °C. Bis zu viermal verwendbar)

Ponceaurot-S-Lösung:

0,5 g Ponceaurot-S, 1 ml Essigsäure, ad 100 ml H<sub>2</sub>O, filtern durch Faltenfilter

10x TBS:

Tris ultra pure 242,3 g, NaCl 175,3 g in 2000 ml H<sub>2</sub>O, mit Hcl auf pH 7,5 eingestellt

1x TBST:

100 ml 10x TBS, 1 ml Tween 20, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

Blocklösung (Milch 5%):

5 ml Magermilchtrockenpulver, ad 100 ml TBST, frisch ansetzen

Antikörperlösung:

1 g Bovines Serumalbumin (BSA) auf 100 ml TBST,

**2.9 Immunhistologie**

EHTs wurden nach Kultivierung und Kontraktionsmessung zur Fixierung und Konservierung für 24 h bei 4 °C in 4% Formalin (Histofix, Roth) gegeben. Anschließend mehrmals mit TBS/T gewaschen und in diesem Puffer bei 4 °C gelagert. Mittels Vibratom (Leica, VT 1000S) wurden 100 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Gewebeschnitte wurden in einen 2 ml Reaktionsgefäß in TBS/T gesammelt. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4 °C in Blocklösung unter kontinuierlicher Bewegung auf einer Rollbank. Die Schnitte wurden mit anti-Ratte-Connexin43 IgG Antikörper der Maus als primärem Antikörper, Phalloidin 488 zur Darstellung von filamentärem Aktin und DRAQ 5 zur Darstellung der Zellkerne (siehe Tab. 5) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für 15 min und über Nacht, folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus Alexa 546) über Nacht und erneutes Waschen für sechs Stunden. Mowiol-488 diente als Eindeckmedium der Konservierung. Die Proben wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie (Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera, Carl Zeiss, LSM 510 *Meta* Zeiss) untersucht.

**Tabelle 5:** Antikörper und Farbstoffe für Immunhistologie

Primärantikörper	
Connexin43:	Anti- <i>rat</i> -Connexin43 IgG, Verdünnung: 1:250 (Translab)
Sekundärantikörper	
Connexin43:	Anti-Maus Alexa 546, Verdünnung: 1:800 (Invitrogen)
Aktin-Markierung:	Alexa Fluor 488 Phalloidin, Verdünnung: 1:60 (Invitrogen)
DNA-Markierung:	<i>DRAQ</i> 5, Verdünnung: 1:1000 (Biostatus)

Blocklösung:

Ziegenserum: 10%, BSA: 1%, Triton X 100: 0,5%, NaN<sub>3</sub>: 0,01% in TBS 0,05 mol/l, pH 7,45

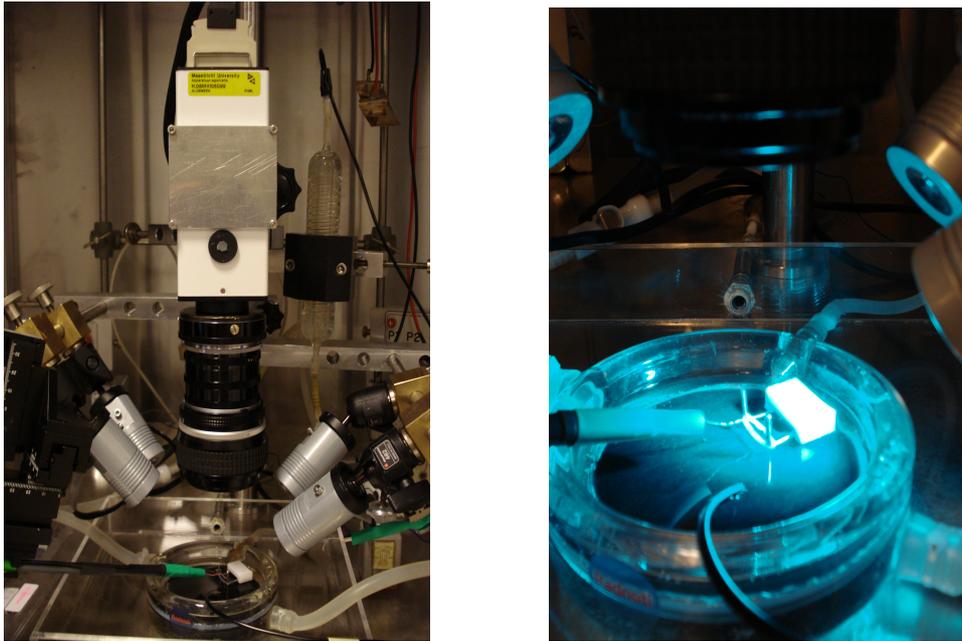
Antikörperlösung:

BSA: 1%, Triton X 100: 0,5%, NaN<sub>3</sub>: 0,01% in TBS 0,05 mol/l, pH 7,45

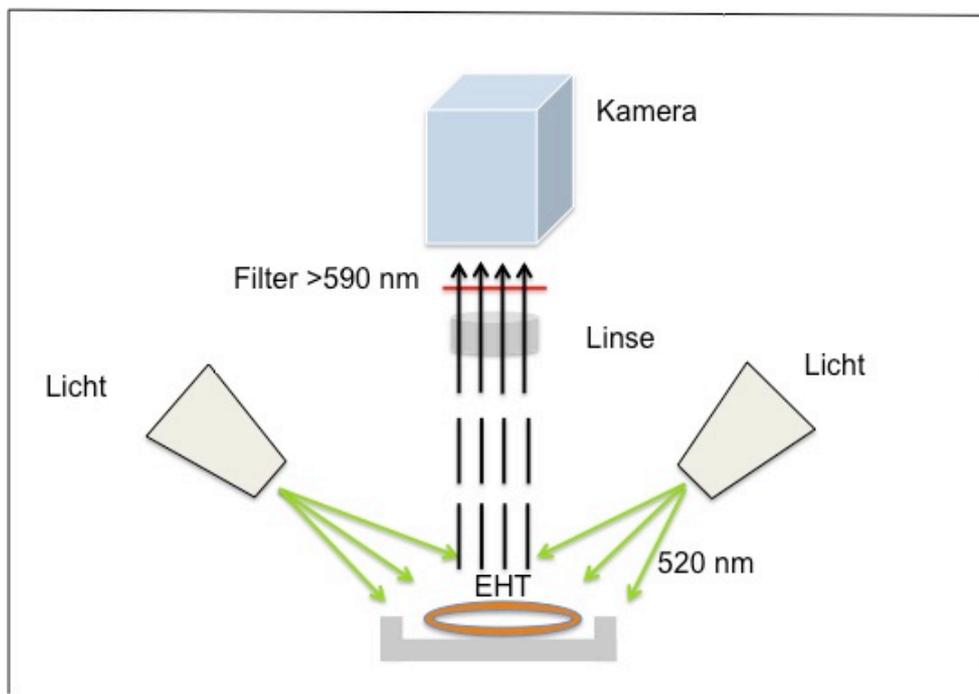
## 2.10 Analyse der Erregungsausbreitung in EHTs

Diese Experimente fanden in Kooperation mit Dr. S. Verheule (Institute of Physiology, Maastricht) statt und entsprechen dem Versuchsaufbau wie in Verheule et al. (2004) und Wu et al. (1998) beschrieben.

Durch den Einsatz schneller und hochempfindlicher Kamerasysteme (SciMedia MICAM Ultima – L Kamerasystem; CMOS Kamera, *well depth* 1,500,000 e<sup>-</sup>/pixel, 10x10 mm<sup>2</sup> Sensorgröße, räumliche Auflösung 100 x 100 Pixel, zeitliche Auflösung 0,1 ms/frame (10 kHz); Nikon AF Nikkor Kameralinse, Brennweite 50 mm, f=1,2) ist es möglich, die Ausbreitung elektrischer Erregung in Gewebe zu detektieren, visualisieren und zu analysieren. Dazu wurden EHTs auf einem statischen Abstandshalter in einer auf 37 °C wasserbeheizten Kammer unter ständiger Perfusion (12 ml/min) mit 37 °C warmer, Carbogen-begaster Tyrodelösung positioniert (siehe Abb. 8). Zur Tyrodelösung wurden Blebbistatin (60 µmol/l) und di-4-ANEPPS-Farbstoff (2 µmol/l) gegeben. Blebbistatin ist ein selektiver Hemmstoff von Myosin II (Kovács et al. 2004) und dient als elektro-mechanischer Entkoppler, welcher die Kontraktionsbewegungen des EHTs inhibiert und somit eine störungsfreie Detektion erlaubt. Di-4-ANEPPS ist ein sich in die Zellmembran integrierender Farbstoff. In wässrigen Lösungen weist er kein Fluoreszenzverhalten auf. Dies ändert sich nach Integration in eine Zellmembran. Änderungen des Membranpotentials der Kardiomyozyten, wie bei Aktionspotentialen, führen dann zu einer Konformationsänderung des Farbstoffes. Bei Exposition von di-4-ANEPPS gesättigten EHTs mit Licht (4 LED-Leuchten mit Interferenzfilter, Wellenlänge 520 nm, grün in Abb. 8) kommt es bei Aktionspotentialen durch diese Konformationsänderung zu einem Anstieg des emittierten Fluoreszenzsignals mit einer höheren Wellenlänge, dessen Intensität sich linear zum transmembranösen Potential verhält. Dieses wurde durch das Kamerasystem mit vorgeschaltetem Filter (>590 nm) erfasst und durch eine selbst entwickelte Software registriert und analysiert. Der schematische Aufbau dieser *optical mapping* Versuche ist in Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 8: Versuchsaufbau für das *optical mapping*.** Die Detektionskamera befindet sich in einem Faradayschen Käfig auf einem vibrationsfreien Tisch über der Perfusionsskammer, vier LED-Leuchten dienen als Lichtquelle (linkes Bild). Wasser-beheizte und Carbogen-begaste Perfusionsskammer mit Tyrode-Blebbistatin-Farbstoff-Perfusion. Das EHT befindet sich auf einem statischen Abstandshalter, es hat Kontakt zur Stimulationselektrode (rechtes Bild).



**Abbildung 9:** Prinzipieller Aufbau der Versuche zur Analyse der elektrischen Erregungsausbreitung in EHTs mittels *optical mapping* nach Wu et al. (1998).

Nach vollständiger Hemmung der Kontraktionsbewegungen (nach ca. 5 min) und homogener Aufnahme und Verteilung des Farbstoffs innerhalb des Gewebes (ca. 30 min) wurden durch bipolare Stromimpulse (Optimum 10 bis 35 mA, 6 bis 40 V) mittels einer Elektrode Aktionspotentiale in den EHTs erzeugt. Die sich ausbreitende Erregung innerhalb des Gewebes, mit der damit verbundenen Membranpotentialveränderung und der Änderung des Fluoreszenzsignals wurden, wie oben beschrieben, detektiert und analysiert. Hierbei wurden einzelne Impulse gesetzt, um das Verhalten und die Geschwindigkeit der elektrischen Ausbreitung im Gewebekonstrukt zu untersuchen. Die Berechnung der Ausbreitungsgeschwindigkeit elektrischer Erregung im EHT erfolgte als Strecke der optisch detektierten Erregungsausbreitung über die dafür benötigte Zeit. Bei der Bestimmung von Refraktärzeiten (effektive refraktäre Periode, ERP) wurden Serien von 5 homogenen Stromimpulsen im gleichen Abstand gefolgt von einem 6. Impuls bei Reduktion des Abstands vom vorangegangenen Impuls in Schritten von 10 ms untersucht, bis es zum Ausbleiben einer Antwort kam. Bei den hier erhobenen Messungen konnte in nur einem Insulin-behandelten EHT ein Signal erzeugt werden, welche die Aussagekraft dieser Untersuchungen limitiert.

### Tyrodelösung (0,8 mM CaCl<sub>2</sub>):

NaCl: 123 mmol/l, KCl: 4 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 22 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,3 mmol/l, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O: 0,5 mmol/l, Glucose: 5,5 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O: 2 mmol/l

## **2.11 Statistik**

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test für den Vergleich von zwei Gruppen oder ANOVA-Test mit Bonferroni *post hoc* Test für den Vergleich von mehr Gruppen bezogen auf eine Referenzgruppe ermittelt. Für die Analyse der Kontraktionskraftmessungen wurde 2-way ANOVA-Test verwendet. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen. Zur Analyse der Daten, für statische Auswertung sowie Erstellung von Graphen und Abbildungen wurde die *Software Microsoft Excel* und *PowerPoint* (Version 14.3.9 Microsoft Corporation. Redmond WA, USA) sowie *Prism5 (GraphPad Software Inc. La Jolla CA, USA)* verwendet.

## 2.12 Substanzen und Hilfsmittel

### 2.12.1 Substanzen

Agarose	Invitrogen
Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistologie	siehe Tab. 4
Aqua ad iniectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	Pharmacia & Upjohn
Ascorbinsäure	Merck
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix	Becton Dickson
Blebbistatin	Bio Connect
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> • 2 (H <sub>2</sub> O)), (MG 147,02 g/mol)	Carl Roth
Carbogengas (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Linde AG
<i>Chick embryo extract</i> , CEE, Hühnerembryonenextrakt	eigene Herstellung
Citronensäure (zur Reinigung der Organbäder)	JT Baker
Deoxyribonuklease (Dnase) II, Typ V	Sigma Chemical Co.,
Di-4-ANEPPS	Invitrogen
DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) (D-Glucose 1 g/l 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> ) F0415	Biochrom
DNA <i>ladder</i> , 100 bp	NEB
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Pulver (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> )	Invitrogen
ECL Western blotting detektion system	Pierce
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na <sub>2</sub> EDTA; Titriplex® III)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS), 0,1 µm steril filtriert	Gibco
Flüssiger Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Linde Gas
Formalin Solution Roti Histofix 4%	Carl Roth
D(+)-Glucose-Monohydrat, (MG 198,17 g/mol)	Merck
Glycerol	Sigma

[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Sigma
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck
Immersionsöl, Immersol™ 518 N	Carl Zeiss
Isopropranolol	Merck
Kaliumchlorid (KCl), (MG 74,56 g/mol)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde
Kollagen Typ I	Eigene Herstellung
Loading dye, 6x	Fermentas
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck
Minimum Essential Medium-Earle (MEM-Earle) Flüssig (1 g/l D-Glucose, 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne Glutamin)	GIBCO
Mowiol 4-88	Calbiochem
Molekulargewichtsstandard Precision Plus™ All Blue	Biorad
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Phosphate Buffered Saline, pH 7,4	Sigma
Penicillin 100 U/ml / Streptomycin 100 µg/ml	Gibco
Pferdeserum	Gibco
Phosphate Buffered Saline ohne Calciumchlorid und ohne Magnesiumchlorid (PBS; -CaCl <sub>2</sub> , - MgCl <sub>2</sub> ), pH 7,4, 10x	Invitrogen
Ponceau S	Serva
Super Skript II, Reverse Transkriptase	Invitrogen
TaqMan® Universal PCR-Master Mix	Applied Biosystems
Tris(hydroxymethyl)aminmethan (Tris Base, Trizma®Base)	Merck

Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris HCl)	Promega
TRizol®	Invitrogen
Triton-X 100	Fluka
Trypsin, Difco 250	BD
Ziegenserum	GIBCO

### 2.12.2 Hilfsmittel und Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems	Applied Biosystems
Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Amon/Bmon-Software	Ingenieurbüro Jäckl/FMI
Analysenwaage, Modell <i>Genius</i>	Sartorius
Autoklav	Wesarg
<i>BLAST</i> -Programm	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> (2008)
Brutschränke mit CO <sub>2</sub> -Zufuhr (Zellkultur), Modell <i>Hera Cell 240</i>	Heraeus
Bio Imaging Systems (Chemi Genius2)	Syngene
Centrifuge/Vortex Combi-spin FVL-2400N	Peqlab
CASY Cellcounter, Modell TT	Schärfe Systeme
Digital-pH-Meter	Knick
Digitalwaage, Modell Ohaus <i>Precision Advanced</i>	Ohaus
Elektrischer Stimulator, Modell ST.8.2	Ingenieurbüro G. Jäckel
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera	Carl Zeiss
Instrumentenschale mit Deckel	Roth
Kippwippe, Modell SM	Sarstedt
Konfokales <i>Laser Scanning</i> Mikroskop, LSM 510 META auf Axiovert 100	Carl Zeiss
Kraftaufnehmer	Ingenieurbüro G. Jäckel/FMI
Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200	Beckman
Kulturschalen	Nunc
Mikroskop für Phasenkontrastaufnahmen mit	Carl Zeiss

Kamera, Modell <i>Axioplan</i>	
Mikroskop, Labovert	Leitz
Multiply® PCR-Einzelgefäße 0,2 ml	Sarstedt
Nanodrop ND-1000	Thermo scientific
Nitrocellulosemembran, Porengröße 0,45 µm,	Whatman
Protan	
Objektträger	Marienfeld
Organbäder	Glasbläserei Brunswieg
Parafilm	American National
Pasteur Pipetten	Brand GmbH
PCR-Gerät GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
Phasische Dehnapparatur	Eigenanfertigung des Instituts
pH-Meter	Knick GmbH
Pipetten (serologisch), 1, 2, 5, 10 und 25 ml	Sarstedt
Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Sarstedt
Pipetten, 10 ml , <i>wide tip with plug</i>	Becton Dicknson
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettierhilfen, Modell <i>accu-jet® pro</i>	BRAND
Polytron® Stativ-Dispergiergerät	Kinematic
Präparationsbesteck	Hammacher
<i>Primer 3</i> , Software	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a> , 2007
Reaktionsgefäße	Sarstedt
Reaktionsgefäße, konisch	Falcon
Reaktionsgefäßständer	Roth
Schüttelrad	Eigenanfertigung des Instituts
Silikondoht	Roth
Sterilbank, Lamin Air HB 2448	Heraeus
Sterilfilter (0,2 µm), einmal Filterhalter	Schleicher & Schuell
Sterilfilter (0,22 µm), Steritop, Vakuumfilter	Millipore
Teflonscheiben	Eigenanfertigung des Instituts
Teflonzylinder	Eigenanfertigung des Instituts
Thermomixer	Eppendorf
Ultraschall-Sonifikator, UW 2200	Bandelin electronic, Berlin
Ultrazentrifuge Centricon T-2170	Kontron

Ultrazentrifuge, Modell <i>Optima L-90K</i> mit Rotor <i>SW40 Ti</i>	Beckman Coulter,
Vibratom VT 1000S	Leica
Vortex Typ REAX 1	Heidolph
Vortex, Typ <i>Reax 200</i>	Heidolph,
Waage, OHAUS GT410	Florham
Waage, PM 480 Delta Range	Mettler
Wasserbad, Modell <i>C20 CS</i> , für Kontraktionsexperimente	Lauda
Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm, 6 cm, 10 cm,)	Sarstedt
Zellsieb (100 µm), Nylon	BD Falcon
Zentrifuge, Modell <i>5810 R</i>	Eppendorf
Zentrifuge, Modell <i>EBA 12 R</i>	Hettich
Zentrifuge, Modell <i>Rotana/RP</i>	Hettich
Zentrifuge, Modell <i>Universal 30 RT</i>	Hettich
Zentrifugenröhrchen 250 ml	Becton
Zentrifugierröhrchen 15 ml, 50 ml,	Sarstedt

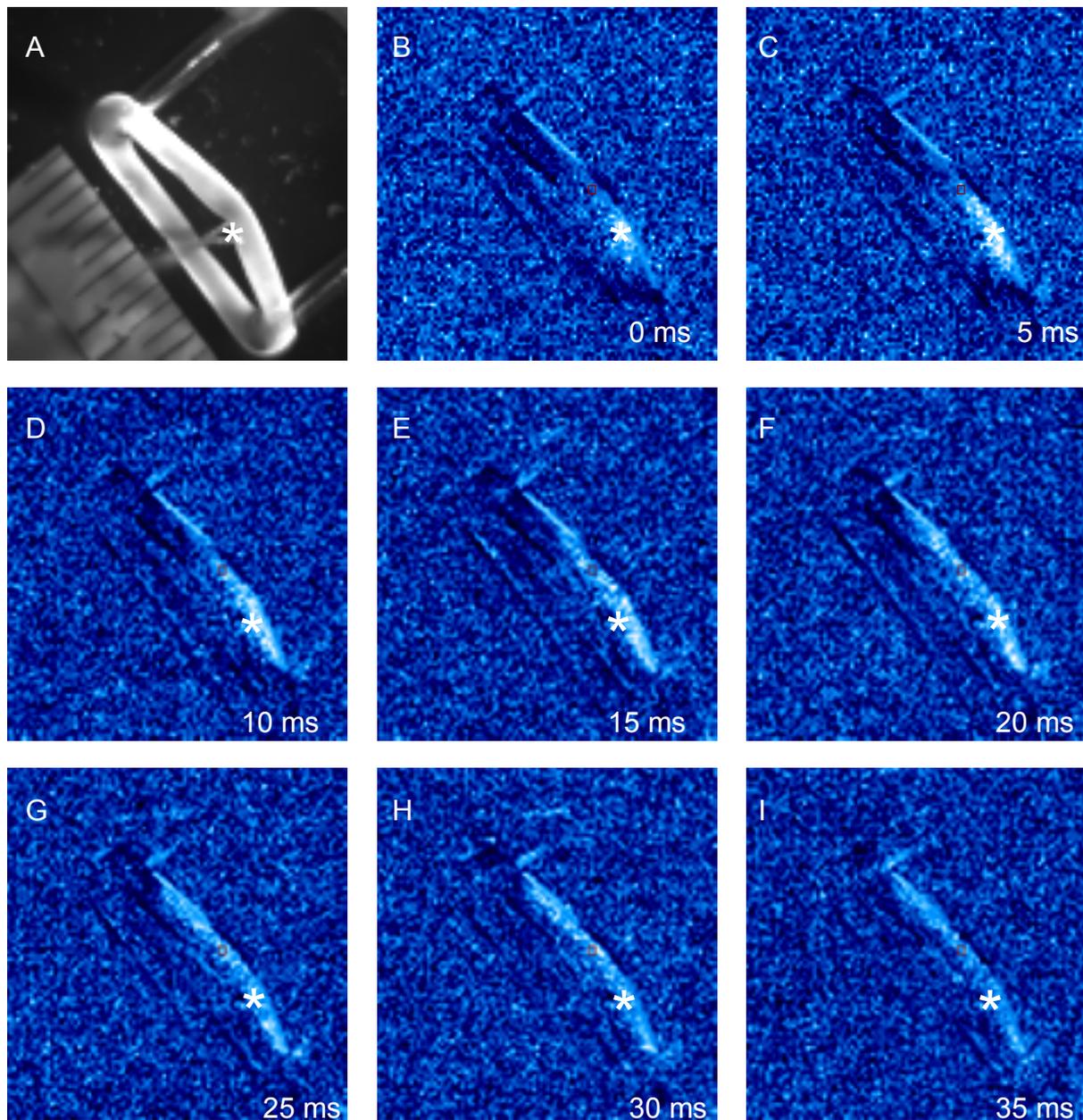
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Ausbildung von funktionellen Synzytium in EHTs

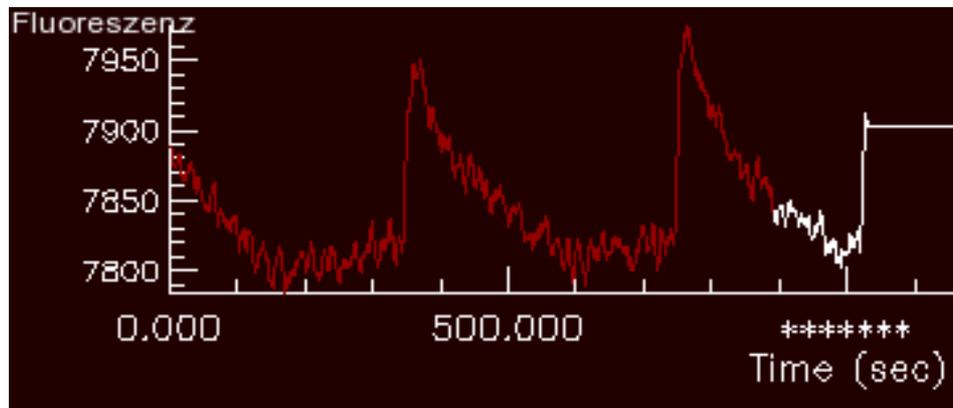
Für die koordinierte Kontraktion eines Muskelverbandes ist die geordnete Ausbreitung der elektrischen Erregung essentiell. Maßgebliche Charakteristika von Herzgewebe sind eine gerichtete Erregungsleitung sowie Refraktärzeiten mit Depolarisationsblock. Um die Frage zu klären, ob sich in EHTs ein funktionelles Synzytium mit eben diesen Eigenschaften ausbildet, wurde initial ein Experiment mittels *optical mapping* durchgeführt.

Abbildung 10 zeigt die gerichtete Erregungsausbreitung in *Engineered Heart Tissue* (EHT), nach Beladung mit di-4-ANEPPS, ausgehend vom Ort der elektrischen Stimulation (\*). Die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit war dabei  $\sim 0,24$  m/s. Zur Bestimmung der Refraktärzeit des künstlichen Herzgewebes wurden Stimulationsserien mit immer kürzeren Intervallen zwischen den Impulsen gesetzt. Bei einem Impulsintervall von 270 ms erfolgte keine Weiterleitung der Erregung und die Refraktärzeit war erreicht. In Abbildung 11 ist beispielhaft eine Signaldetektion des *optical mapping* aufgeführt mit einer *signal-to-noise ratio* von 1,9%.

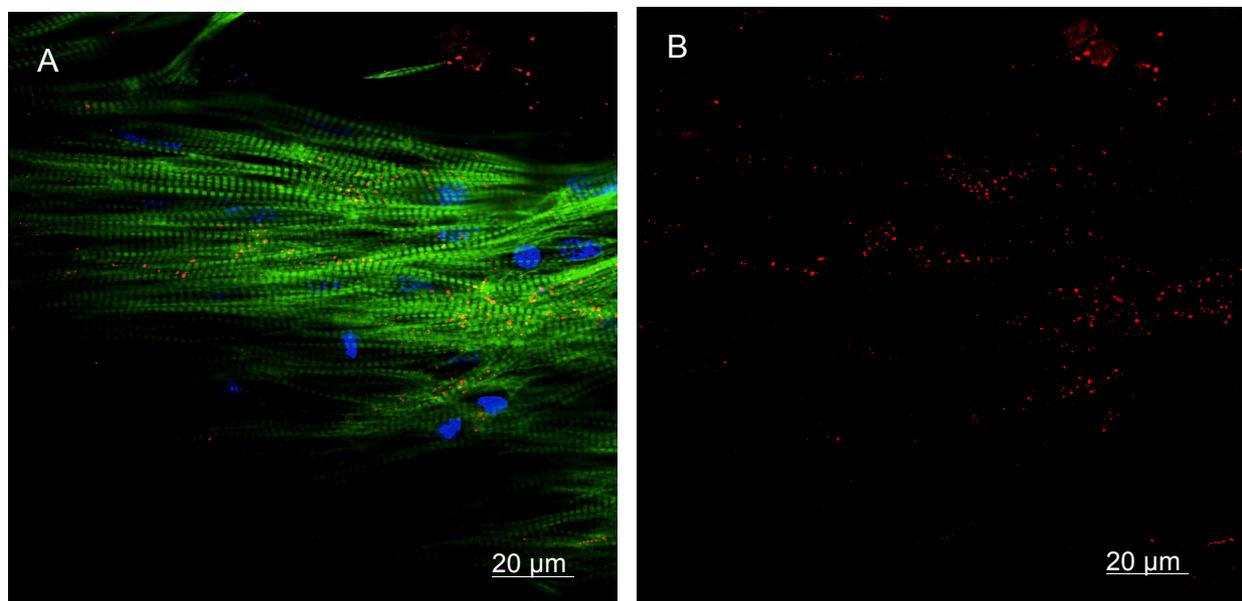
Konfokalmikroskopische Untersuchungen (Abb. 12) zeigen Muskelbündel aus einem phasisch gedehnten EHT. Punktförmige Connexin43-haltige Zell-Zell-Verbindungen konnten als strukturelles Korrelat von *gap junctions* und basale Einheit des funktionellen Synzytiums nachgewiesen werden. In der Folge wurde untersucht, welche Connexine am Aufbau eines funktionellen Synzytiums in EHTs beteiligt sind, wie dies im Vergleich zu nativem Herzgewebe einzuordnen ist und wie sich das Connexin-Muster im zeitlichen Verlauf während der EHT-Entwicklung verhält.



**Abbildung 10: *Optical mapping* eines EHTs.** Ausbreitung der elektrischen Erregung im Sinne eines funktionellen Synzytiums in einem EHT nach punktueller Stimulation. (A) EHT auf statischem Abstandshalter nach homogener Aufnahme des Farbstoffes di-4-ANEPPS in der Perfusionskammer mit Stimulationselektrode am rechten Arm des EHTs. Als Ausgangspunkt der Erregung ist der Kontaktpunkt der Elektrode mit dem EHT erkennbar (\*). Der jeweilige Zeitabstand zwischen den einzelnen Bildern (B) – (I) betrug 5 ms.



**Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung einer Signaldetektion des *optical mappings*.** Die Ordinate zeigt die detektierten Änderungen der Fluoreszenzintensität durch die Kamera, die Abszisse den Zeitverlauf. Der steile Anstieg des Fluoreszenzsignals mit langsamem Abfall entspricht dem Ablauf von Aktionspotentialen gemessen im EHT. *Signal-to-noise ratio* 1,9%



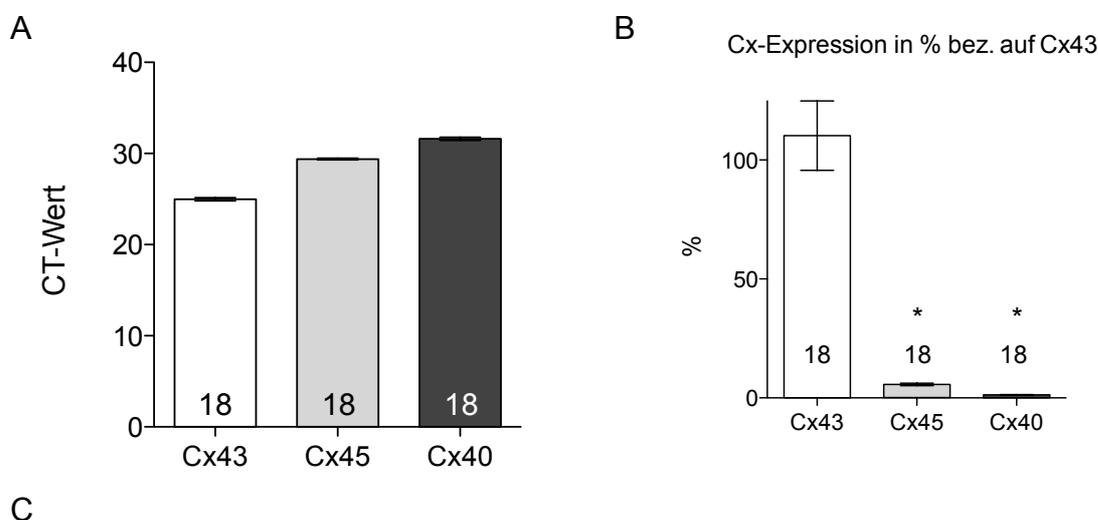
**Abbildung 12: Konfokalmikroskopische Untersuchung eines EHTs.** (A) Fusionsbild: Längsorientierter Kardiomyozytenstrang eines EHTs mit sarkomerischer Aktin-Querstreifung in einzelnen Kardiomyozyten, Connexin43 Signale markieren Zell-Zell-Kontakte. (B) Darstellung antikörpermarkierter Cx43 Proteine. Grün: Filamentäres Aktin, blau : Zellkerne, rot : Connexin43; 63x Vergrößerung.

### 3.2 Connexine in EHTs

Zur primären Charakterisierung der Connexin-Komposition in EHTs erfolgte zunächst eine Analyse der basalen mRNA-Transkription der im nativen Herzgewebe vorrangig vorkommenden Connexin-Isoformen in EHTs (3.2.1). In weiteren Analysen wurde vergleichend das Expressionsmuster im nativen Herzgewebe (3.2.2) und die Connexin-Ausbildung während der EHT-Entwicklung im zeitlichen Verlauf (3.2.3) untersucht.

#### 3.2.1 Connexin-Isoformen in EHTs

Im nativen Herzen dominieren die Connexin-Isoformen Connexin43, -40 und -45. qPCR Analysen bestätigten, dass alle drei Connexin-Isoformen auch in EHTs exprimiert werden. Dabei zeigte Connexin43 die höchste Transkriptmenge, gefolgt von Connexin45 und Connexin40, welche jeweils mit 4,7% bzw. 1% bezogen auf die Connexin43-Expression wesentlich niedriger exprimiert wurden (Abb. 13).



**Abbildung 13: Analyse der basalen mRNA-Transkription der Cx-Isoformen in EHTs.** (A) und (B) graphische und (C) tabellarische Darstellung der Ct-Werte der Connexin-Isoformen 43, 45 und 40 in EHTs sowie das Verhältnis der Connexin-Expression in % bezogen auf Cx43 (n=18). \* $p < 0.05$  vs. Cx43 (ANOVA-Test mit Bonferroni *post hoc* Test)

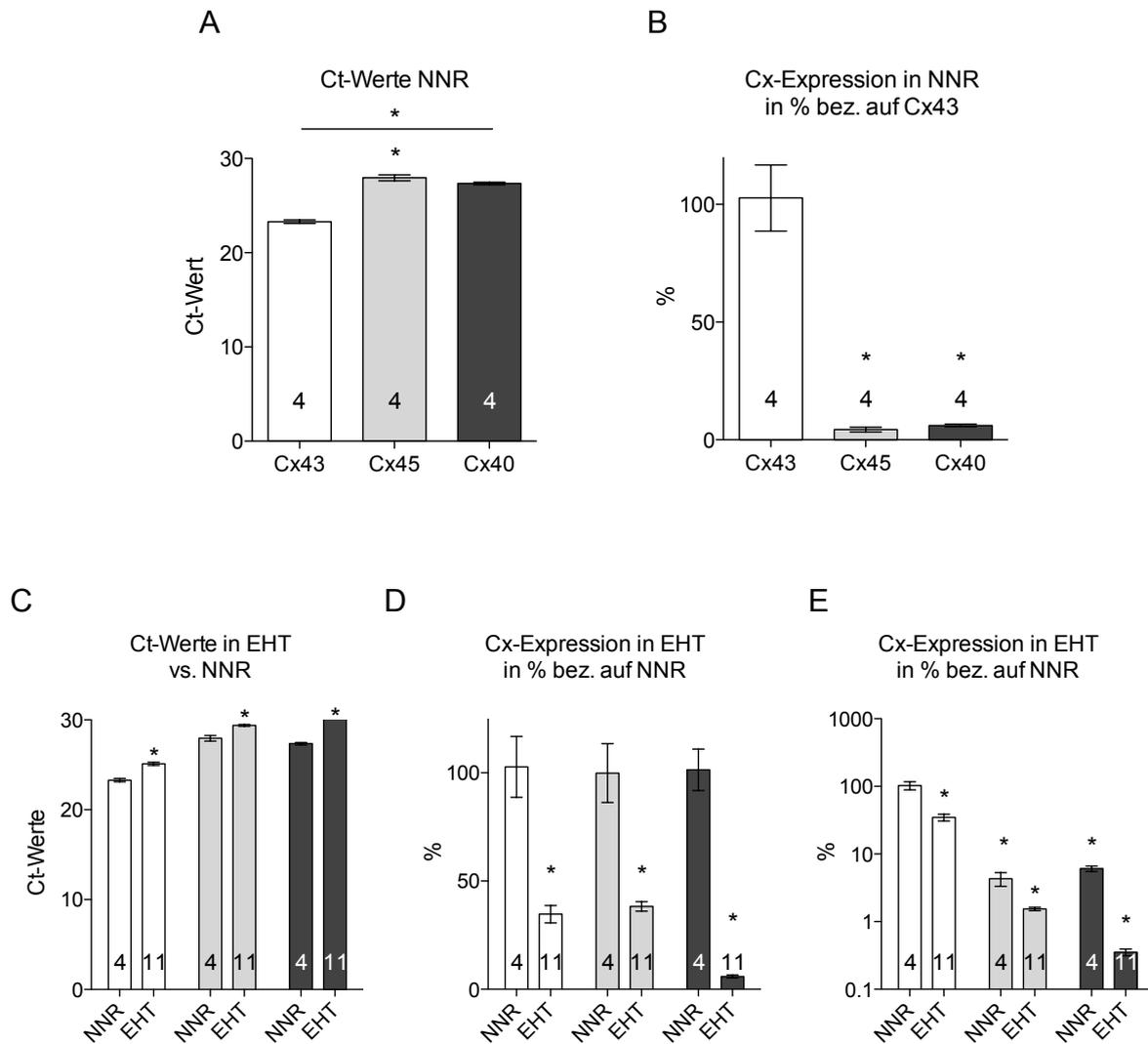
### 3.2.2 Connexin-Expression in EHTs und neonatalem Herzgewebe

Um zu überprüfen, ob das Muster der Connexin-Expression in EHTs den Verhältnissen im nativen neonatalen Ventrikelgewebe (NNR; 0-3 Tage alt) entspricht, erfolgte eine vergleichende Untersuchung der Connexin-mRNA-Expression. Die EHTs entstammten drei verschiedenen Serien, sie wurden phasisch gedehnt.

Insgesamt wurde eine geringere absolute mRNA-Expression der Connexin-Isoformen in den EHTs gegenüber dem nativen Gewebe gemessen (Abb. 14). Connexin43 stellte im nativen Herzgewebe, wie im EHT jeweils die dominierende Isoform dar. Connexin40 wurde im nativen Herzgewebe höher exprimiert als Connexin45. In EHTs verhielt sich dies gegensätzlich, mit einer höheren Expression von Cx45 gegenüber Cx40. Aus den gemessenen Ct-Wert Unterschieden zwischen EHTs und nativem Gewebe ließ sich folgende quantitative Aussage machen: Die Expression von Cx43 lag im nativen Gewebe um ein 3,2-faches über dem in EHTs. Bei Cx40 lag diese um 18,3-fach höher und bei Cx45 um 2,6-fach höher.

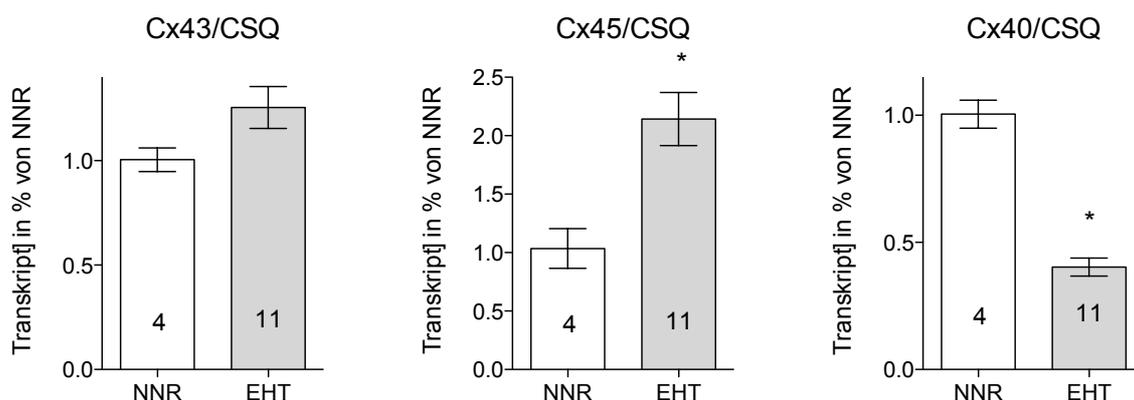
**Tabelle 6** Vergleich der Ct-Werte in NNR und EHTs für die unterschiedlichen Connexin-Isoformen.

Cx-Isoform	Ct-Wert NNR (n=4)	Ct-Wert EHT (n=11)	Relativ höhere Expression in NNR	Cx-Expression in EHTs in % von NNR
Cx43	23,3±0,2	25±0,2	$(2^{0,996})^{1,7} = 3,2$	31,3
Cx45	28±0,3	29,4±0,1	$(2^{0,995})^{1,4} = 2,6$	38,5
Cx40	27,4±0,1	31,6±0,2	$(2^{0,999})^{4,2} = 18,3$	5,5



**Abbildung 14: Analyse der absoluten mRNA-Expression der einzelnen Connexin-Isoformen innerhalb neonatalen Herzgewebes (NNR) und verglichen mit EHTs.** (A) absolute Ct-Werte in NNR, (B) in % bezogen auf Cx43. (C) Vergleich der absoluten Cx-Ct-Werte in NNR und EHTs und (D) in % bezogen auf NNR. (E) Zur besseren Übersicht erfolgte die logarithmische Darstellung der Expression der Cx-Isoformen von NNR und EHT in % bezogen auf Cx43 in neonatalem Herzgewebe. \* $p < 0,05$  vs. NNR (t-Test; ungepaart, zweiseitig, bzw. ANOVA-Test mit Bonferroni *post hoc* Test).

Aufgrund der präferenziellen Expression der untersuchten Connexin Isoformen in Herzmuskelzellen wurden die Ct-Werte auf das Herzmuskelzell-House-Keeping Transkript Calsequestrin2 (CSQ2) bezogen. Diese Auswertung legt eine etwa gleich hohe Connexin43-Transkriptmenge in neonatalem Herzgewebe und in EHTs nahe. Die Connexin45-Transkriptmenge war in EHTs demnach etwa doppelt so hoch wie im nativen Herzgewebe, bei Connexin40 hingegen nur etwa halb so hoch (Abb. 15).

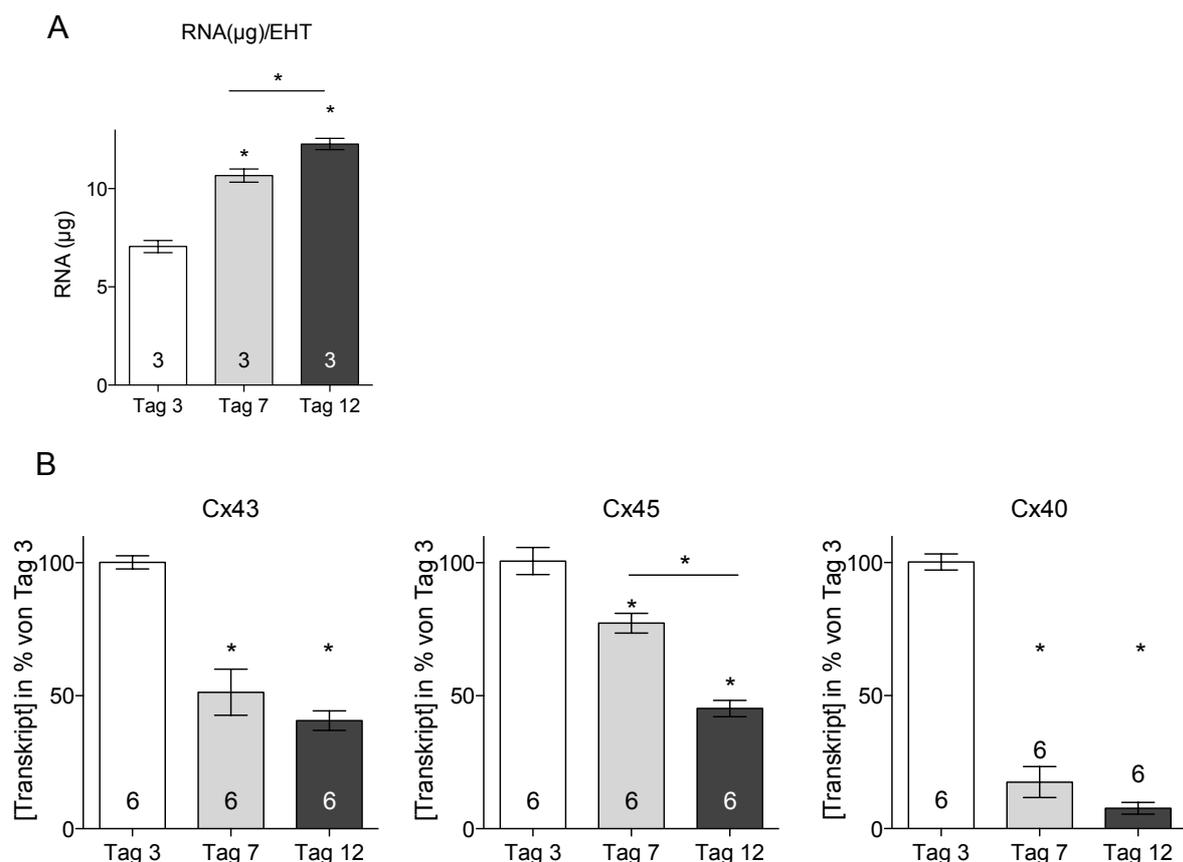


**Abbildung 15: Calsequestrin2 korrigierter Vergleich der Expression der Connexin-Isoformen in EHTs und nativem Herzgewebe (NNR).** CSQ2 gilt als Herzmuskelzell-spezifisches House-Keeping Transkript (Tiburcy et al. 2011) (n=4 bzw. 11). \*p<0,05 vs. NNR (t-Test; ungepaart, zweiseitig)

### 3.2.3 Ausbildung der Connexine während der EHT-Entwicklung

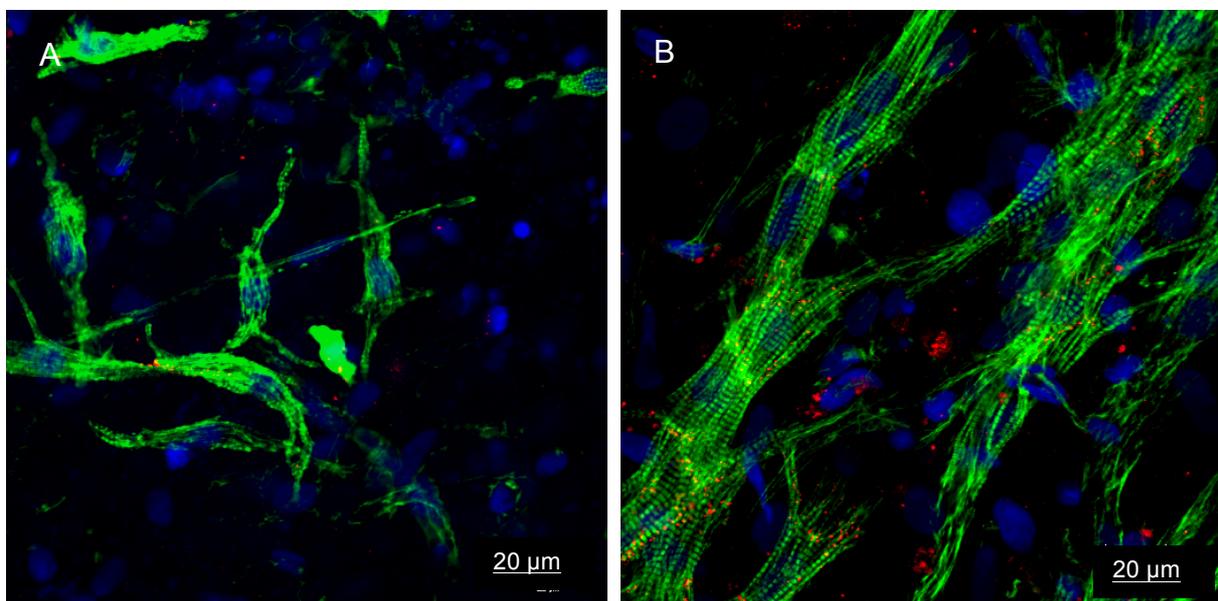
Zur genaueren Analyse der Connexin-Ausbildung und des Connexin-Musters während der Entwicklung der EHTs, wurde die mRNA-Expression an den Tagen 3, 7 und 12 untersucht. Außerdem erfolgten immunhistologische Untersuchungen zur morphologischen Darstellung.

Im Verlauf der EHT-Entwicklung zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme des Gesamtgehaltes an RNA pro EHT (Abb. 16 A). Der Connexin-mRNA-Gehalt fiel bei allen Isoformen während der EHT-Entwicklung ab (Abb. 16 B). Den größten Konzentrationsabfall zeigte dabei Cx40 (Cx43: Tag 7 auf  $51 \pm 6\%$ , Tag 12 auf  $41 \pm 4\%$ ; Cx40: Tag 7 auf  $18 \pm 6\%$ , Tag 12 auf  $12,8 \pm 2,2\%$ ; Cx45: Tag 7 auf  $77 \pm 4\%$ , Tag 12 auf  $45 \pm 3\%$  des Niveaus von Tag 3; n=6). Von Tag 7 zu Tag 12 war lediglich bei Cx45 ein weiterer signifikanter Abfall der Konzentration zu finden.



**Abbildung 16: Analyse der mRNA-Expression in EHTs während der Entwicklung.** (A) Zunahme des gesamten RNA-Gehaltes im Verlauf der EHT-Entwicklung (n=3). (B) Die mRNA-Expression der Connexin43, 40 und 45 Isoformen in EHTs sinkt im Laufe der EHT-Entwicklung (n=6). Alle Werte sind CSQ2 korrigiert und in % auf Tag 3 bezogen. \*p<0,05 per ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test.

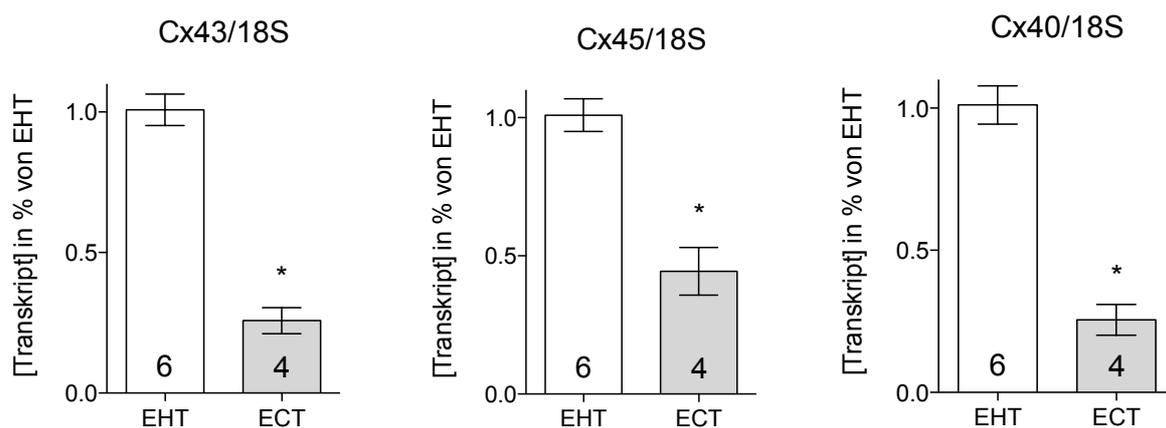
Morphologische Analysen erfolgten mittels konfokaler Mikroskopie zu den Zeitpunkten Tag 7 und Tag 12. Die mangelnde Kondensierung an Tag 3 verhinderte die Aufarbeitung der Proben zu diesem Zeitpunkt. Nach siebentägiger Kultivierung zeigten sich einzelne kurze Kardiomyozyten, ohne erkennbare Ausrichtung. Die Querstreifung war schwach ausgeprägt und nur vereinzelte, punktförmige Connexin43-vermittelte Zell-Zell-Kontakte waren erkennbar (Abb. 17 A). An Tag 12, nach 5-tägiger mechanischer Dehnung vom phasischen Typ, bildeten sich kräftige Kardiomyozytenstränge aus. Die einzelnen Kardiomyozyten wiesen dabei eine differenzierte Aktin-Querstreifung auf, waren längs orientiert, gestreckt und bildeten aus mehrerer Zellschichten bestehenden Muskelstränge. Sie formierten ein Netzwerk ausgeprägte interzelluläre Connexin43 Verbindungen (Abb. 17 B). Weiterhin sind einige perinukleäre Cx-Signale erkennbar.



**Abbildung 17: Immunohistologische Analyse von EHTs während der Entwicklung.** (A) EHT, 7 Tage alt, nicht orientierte Kardiomyozyten mit vereinzelten, punktförmigen Cx43 Zell-Zell-Kontakten. (B) EHT, 12 Tage alt, longitudinal orientierte, vernetzte Kardiomyozytenstränge mit gerichteter Querstreifung und intensiven Cx43-Verbindungen. Grün: Filamentäres Aktin, blau: Zellkerne, rot: Connexin43 (63-fache Vergrößerung).

### 3.3 Connexin-Expression in Nicht-Kardiomyozyten

Um zu überprüfen, ob Nicht-Kardiomyozyten tatsächlich keine oder eine stark reduzierte Connexin Transkriptmenge enthalten wurde die mRNA-Expression der Connexin43, -45 und -40-Isoformen in nicht-kontraktile Gewebekonstrukten (ECTs, *Engineered Connective Tissue*; ohne Kardiomyozytenanteil siehe 2.4.5) vergleichend zu EHTs untersucht. Dabei war die Expression von Connexin43, 40 und 45-Isoformen nachweisbar, aber deutlich niedriger als in Kontroll-EHTs:  $26\pm 5\%$  für Cx43;  $26\pm 5\%$  für Cx40 und auf  $44\pm 9\%$  für Cx45 ( $n=4$ ) (Abb. 18).



**Abbildung 18: Niedrige Connexin-mRNA Expression in Kardiomyozyten-freien Gewebekonstrukten.** Alle Werte sind 18S-rRNA korrigiert und in % auf insulinbehandelte EHTs bezogen ( $n=6$  bzw.  $4$ );  $*p<0,05$  vs. EHT (t-Test; ungepaart, zweiseitig).

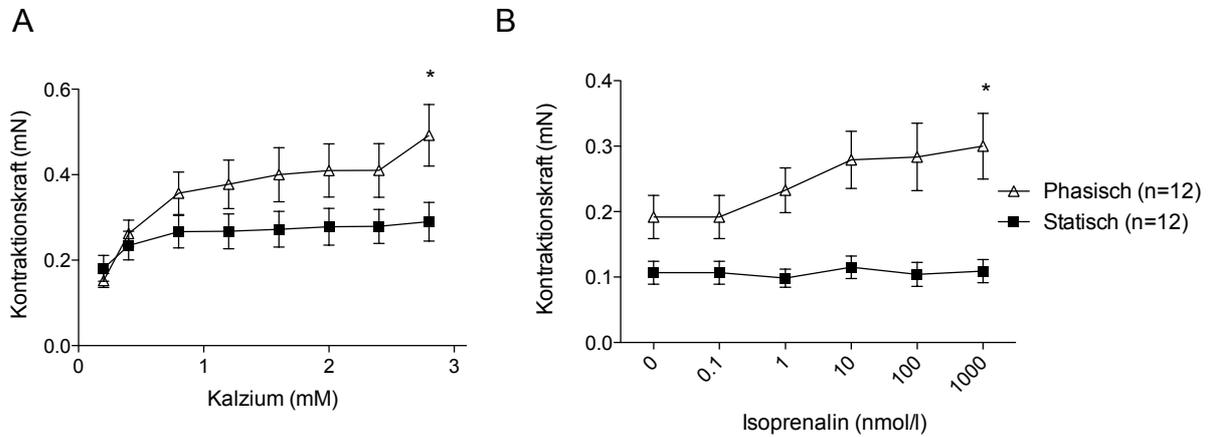
### **3.4 Einfluss von phasischer und statischer mechanischer Dehnung auf Connexin-Expression in EHTs**

Die Entwicklung von EHTs wird durch mechanische Dehnung gefördert (Fink et al. 2000, Zimmermann et al. 2000). Unter der Annahme, dass eine verbesserte Kontraktion durch eine verbesserte Verknüpfung der Herzmuskelzellen in EHTs bedingt sein könnte, wurde der Einfluss von phasischer und statischer mechanischer Dehnung während der Kultivierung (siehe 2.5 und Abb. 6) auf Unterschiede der Connexin-mRNA-Expression hin untersucht.

#### **3.4.1 Höhere Kontraktionskraft unter phasischer Dehnung**

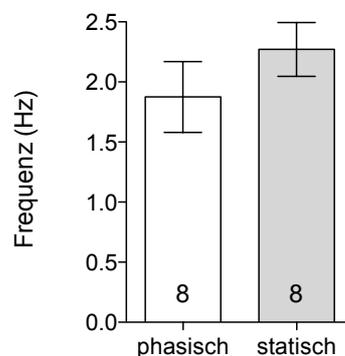
EHTs wurden statischer und phasischer Dehnung und schließlich Kontraktionskraftmessungen unterzogen. Dabei zeigten phasisch gedehnte EHTs höhere maxiale Kräfte unter Calcium (Abb. 19A) und Isoprenalin (Abb. 19B) Stimulation.

Neben Messungen der Kontraktionskraft unter elektrischer Stimulation im Organbad, wurden während der Äquilibrierungszeit, am Versuchsbeginn, die spontanen Kontraktionsfrequenzen der EHTs, ohne elektrische Stimulation aufgezeichnet und analysiert. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Abb. 20).



**Abbildung 19: Höhere Kontraktionskraft phasisch gedehnter EHTs.** (A) Messung der absoluten Kontraktionskraft (mN) unter steigenden Kalziumkonzentrationen. Die Erhöhung erfolgte kumulativ von 0,2 auf 2,4 mM. (B) Messung bei kumulativer Isoprenalin-Konzentrationserhöhung bei einer Kalziumkonzentration von 0,2 mM (n=12). \* $p < 0,05$  vs. statisch (2-way ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

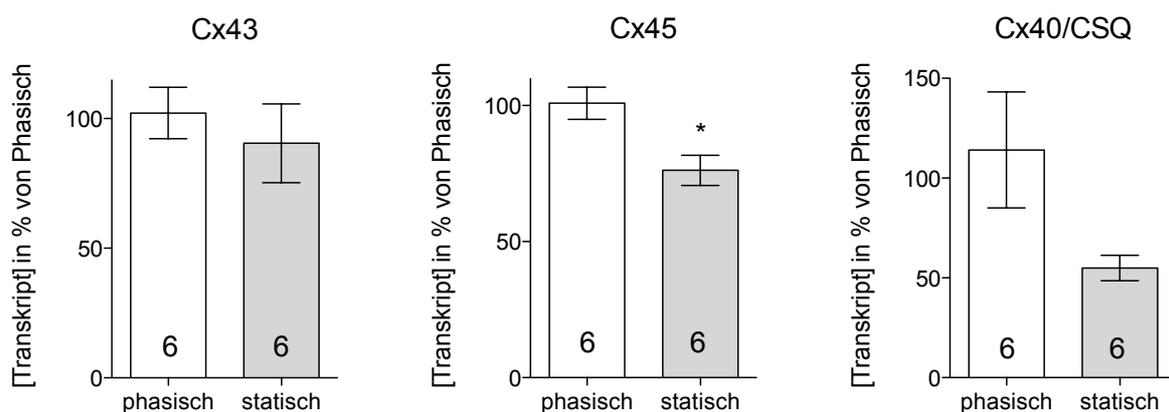
spontane Kontraktionsfrequenz



**Abbildung 20: Spontane Kontraktionsfrequenzen phasisch und statisch gedehnten EHTs.** Keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Gruppen (n=8); \* $p < 0,05$  vs. phasische Dehnung (t-Test; ungepaart, zweiseitig).

### 3.4.2 Erhöhte Cx45-Transkriptkonzentration unter phasischer Dehnung

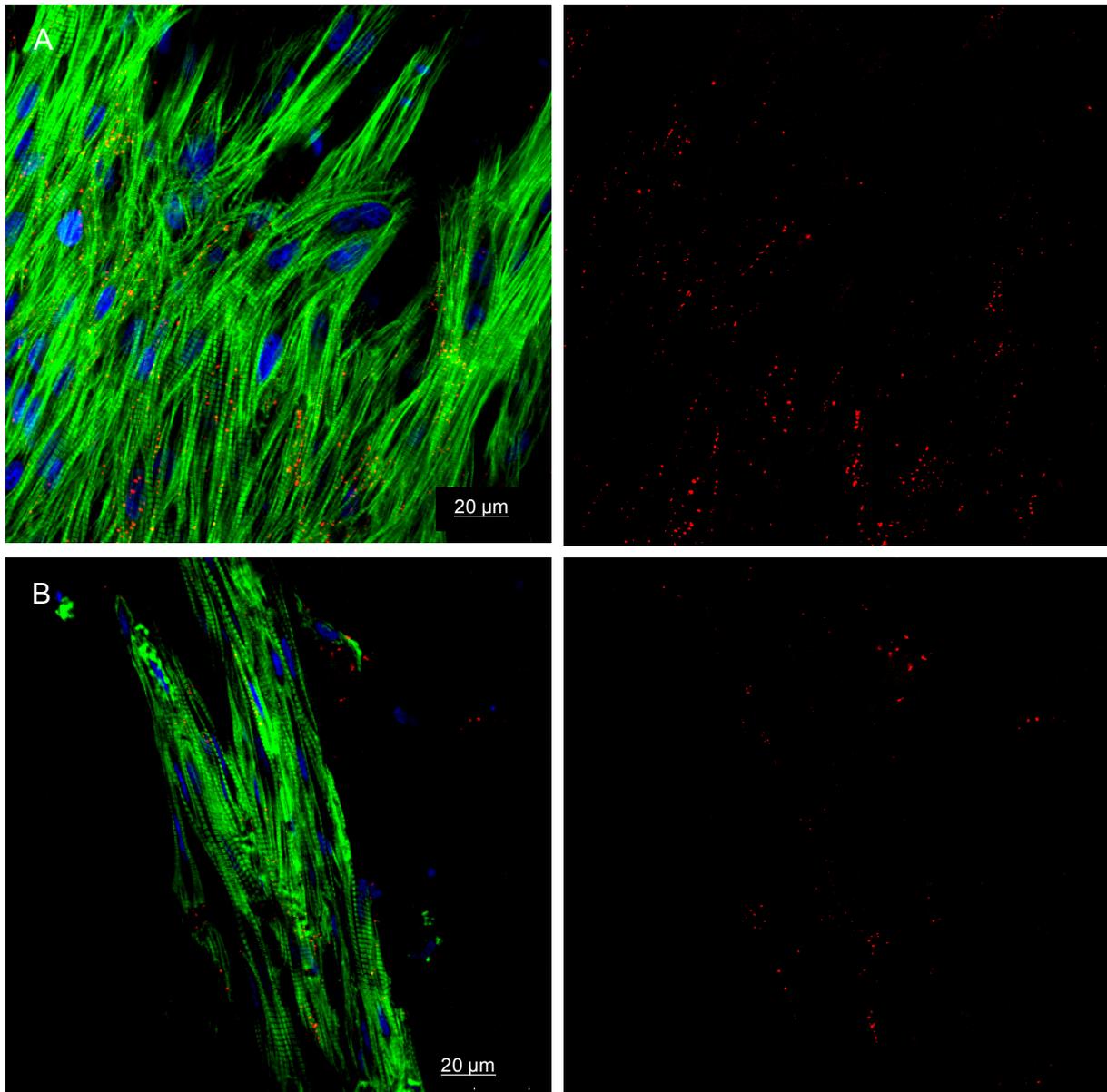
Die mRNA-Expression der untersuchten Connexin-Isoformen phasisch gedehnter EHTs war tendenziell höher, als die der statisch gedehnten Gruppe. Ein signifikanter Unterschied wurde bei Connexin45 gemessen. Connexin43 zeigte ein nahezu gleiches Niveau, während bei Connexin40 ein Trend zu verminderter Expression unter statischer Dehnung zu sehen war (Abb. 21). Auffällig war hier die hohe Streubreite in der Gruppe der phasischen Dehnung.



**Abbildung 21: Erhöhte Connexin mRNA-Expression unter phasischer Dehnung.** Die Expressionswerte sind auf CSQ2-mRNA bezogen (n=6). \* $p < 0,05$  vs. phasisch (t-Test; ungepaart, zweiseitig).

### **3.4.3 Optimierte Myogenese unter phasischer Dehnung**

Zur Analyse möglicher morphologischer Unterschiede der EHTs wurden diese konfokalmikroskopisch untersucht. Phasisch gedehnte EHTs zeigten längsorientierte Muskelstränge mit einer klaren sarkomerischen Querstreifung. Nach Connexin43 Antikörpermarkierungen zeigten sich gut ausgebildeten Connexin43 Verbindungen (rot) zwischen den Herzmuskelzellen. Die Connexin43-Signale im phasisch gedehnten EHT wiesen dabei eine Anordnung in Gruppen auf. Dabei schienen zellendständige und laterale Connexin-Verbindungen etabliert worden zu sein. Das in Abbildung 22B dargestellte Präparat eines statisch gedehnten EHTs zeigt einen weniger stark ausgebildeten, längsorientierten Kardiomyozytenstrang mit Querstreifung. Die Connexin-Verbindungen schienen in diesem Modell weniger intensiv ausgeprägt. Eine eindeutige Aussage über Unterschiede in der Quantität oder im morphologischen Cx43-Verteilungsmuster zwischen den Gruppen ließ sich jedoch nicht treffen.



**Abbildung 22: Förderung der Myogenese unter phasischer Dehnung.** (A) phasisch gedehntes EHTs, (B) statisch gedehntes EHT. Darstellung der Einzelaufnahmen der Antikörper-markierten Connexin43-Proteine neben den Fusionsbildern. Hier zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede im Connexin-Verteilungsmuster der beiden untersuchten Gruppen. Grün: Filamentäres Aktin, blau: Zellkerne, rot: Connexin43 (63-fache Vergrößerung).

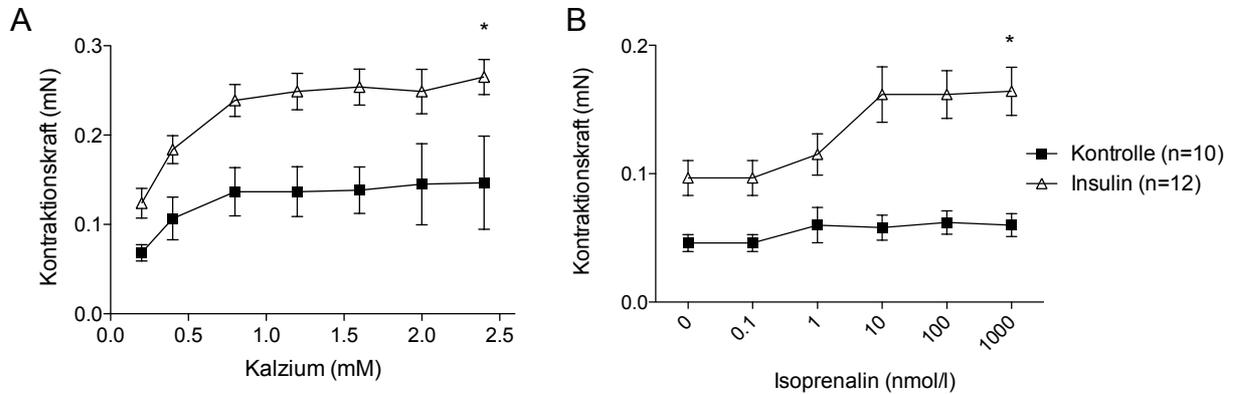
### 3.5 Modulierung der Connexin-Expression durch Insulin

Neben verschiedenen Dehnungsformen können die kontraktile, morphologischen und molekulare Eigenschaften von EHTs durch Supplementierung des Kulturmediums mit Wachstumsfaktoren beeinflusst werden (Zimmermann et al. 2002, Naito et al. 2006). Dabei zeigte Insulin einen besonders ausgeprägten positiven Effekt auf die Kontraktionskraft. Analog zur Analyse verschiedener Dehnungsverfahren während der EHT-Entwicklung, erfolgte unter der Annahme einer verbesserten Kontraktionsfähigkeit durch eine verbesserte Verknüpfung der Herzmuskelzellen unter Insulinsupplementierung, die Untersuchung der Connexin-Expression auf Unterschiede der mRNA- und zusätzlich der Protein-Konzentration sowie morphologische Analysen. Die EHTs (Kontrollgruppe und insulinbehandelte-Gruppe) wurde während der Kultivierung phasisch gedehnt.

#### 3.5.1 Erhöhte Kontraktionskraft insulinbehandelter EHTs

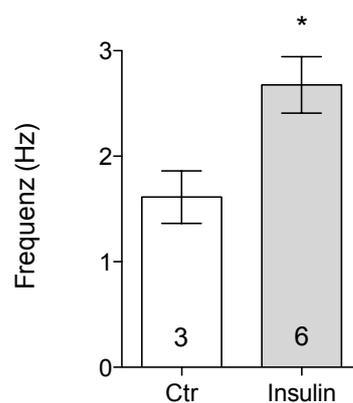
Bei der Messung der Kontraktionskraft wurde eine höhere Kraftentwicklung in insulinbehandelten EHTs analog zu publizierten Daten von Zimmermann et al. (2002, 2006) und Naito et al. (2006) beobachtet. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Messung der Kontraktionskraft unter Steigerung der Kalziumkonzentration in der Tyrodelösung (A) und Isoprenalin-Zugabe (B). Dabei wiesen insulinbehandelte EHTs eine erhöhte absolute Kontraktionskraft, unter kumulativer Erhöhung der Kalziumkonzentration, und ein verbessertes Ansprechen auf den  $\beta$ -Adrenorezeptoragonisten Isoprenalin auf.

Bei Analyse der spontanen Kontraktionsfrequenzen der EHTs, ohne elektrische Stimulation, zeigte sich eine höhere Spontanfrequenz in der insulinbehandelten Gruppe von  $2,7 \pm 0,3$  Hz (n=6) gegenüber  $1,6 \pm 0,3$  Hz (n=3) in der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 24).



**Abbildung 23: Chronische Insulinstimulation steigert die Kontraktionskraft von EHTs.** (A) Messung der absoluten Kontraktionskraft (mN) unter kumulativ steigender Kalziumkonzentrationen. (B) Messung bei kumulativer Isoprenalinkonzentrationserhöhung bei einer Kalziumkonzentration von 0,2 mM. Die Messungen erfolgten unter isometrischen Bedingungen und elektrischer Feldstimulation mit 2 Hz bei  $L_{max}$  (n=10 bzw. 12). \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (2-way ANOVA).

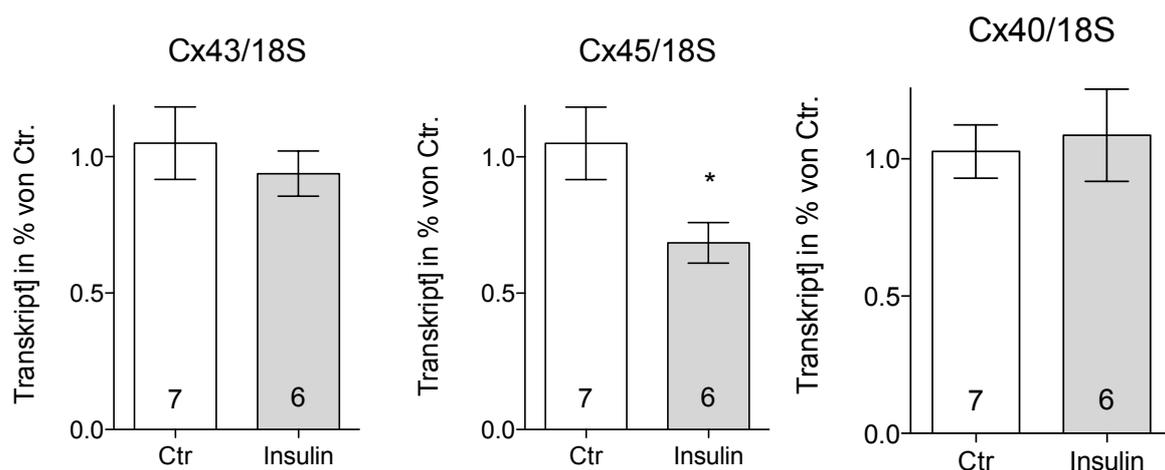
spontane Kontraktionsfrequenz



**Abbildung 24: Insulinstimulation fördert spontane Kontraktionsfrequenz von EHTs.** Insulin-behandelte EHTs (n=6) zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctr.; n=3) eine höhere spontane Kontraktionsfrequenz. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe (t-Test; ungepaart, zweiseitig).

### 3.5.2 Reduktion der Connexin45-Transkriptkonzentration unter Insulin

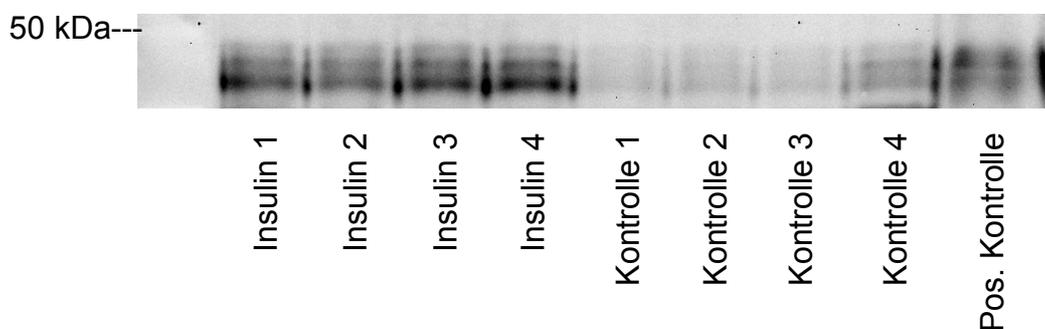
Weiterhin erfolgte die Analyse der Connexin mRNA-Expression. Supplementierung des Kulturmediums mit Insulin während der gesamten EHT-Kultur führte zu einer signifikanten Reduktion der Cx45 mRNA-Expression. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren diese um 44,3% (Cx45 auf  $55,7 \pm 0,3\%$ ;  $n=6$ ) vermindert (Abb. 25). Die Cx43 und Cx40 mRNA-Expression blieb unverändert.



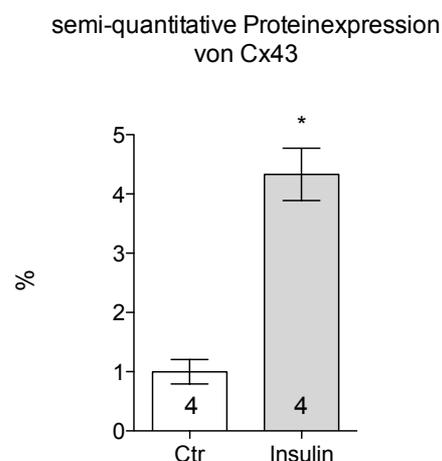
**Abbildung 25: Insulin vermindert die Connexin45-mRNA-Mengen in EHTs.** Cx-Transkriptmengen wurden mittels qPCR bestimmt und auf 18S bezogen ( $n=6$  bzw. 7). \* $p < 0,05$  vs. Ctr. (t-Test; ungepaart, zweiseitig).

### 3.5.3 Zunahme des Connexin43-Proteingehaltes unter Insulin

Aufgrund des umfassenden Effektes von Insulin auf funktionelle, morphologische und molekulare Eigenschaften von EHTs erfolgte die Analyse der Cx43-Proteinkonzentration. Hierbei zeigte sich eine deutliche Erhöhung in der insulinbehandelten Gruppe. In Abbildung 26 ist ein repräsentativer *western blot* insulinbehandelter EHTs und einer unbehandelten Kontrollgruppe (phasisch gedehnt) dargestellt. Bei gleicher Menge an beladenem Protein je Tasche (25 µg), war eine deutlich stärkere Schwärzung auf der erwarteten Höhe im *blot* in den insulinbehandelten Proben zu erkennen (n=4; Abb. 26 und 27). Das beobachtete Bandenmuster ist aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierungszustände typisch für Cx43 (Abb. 26).



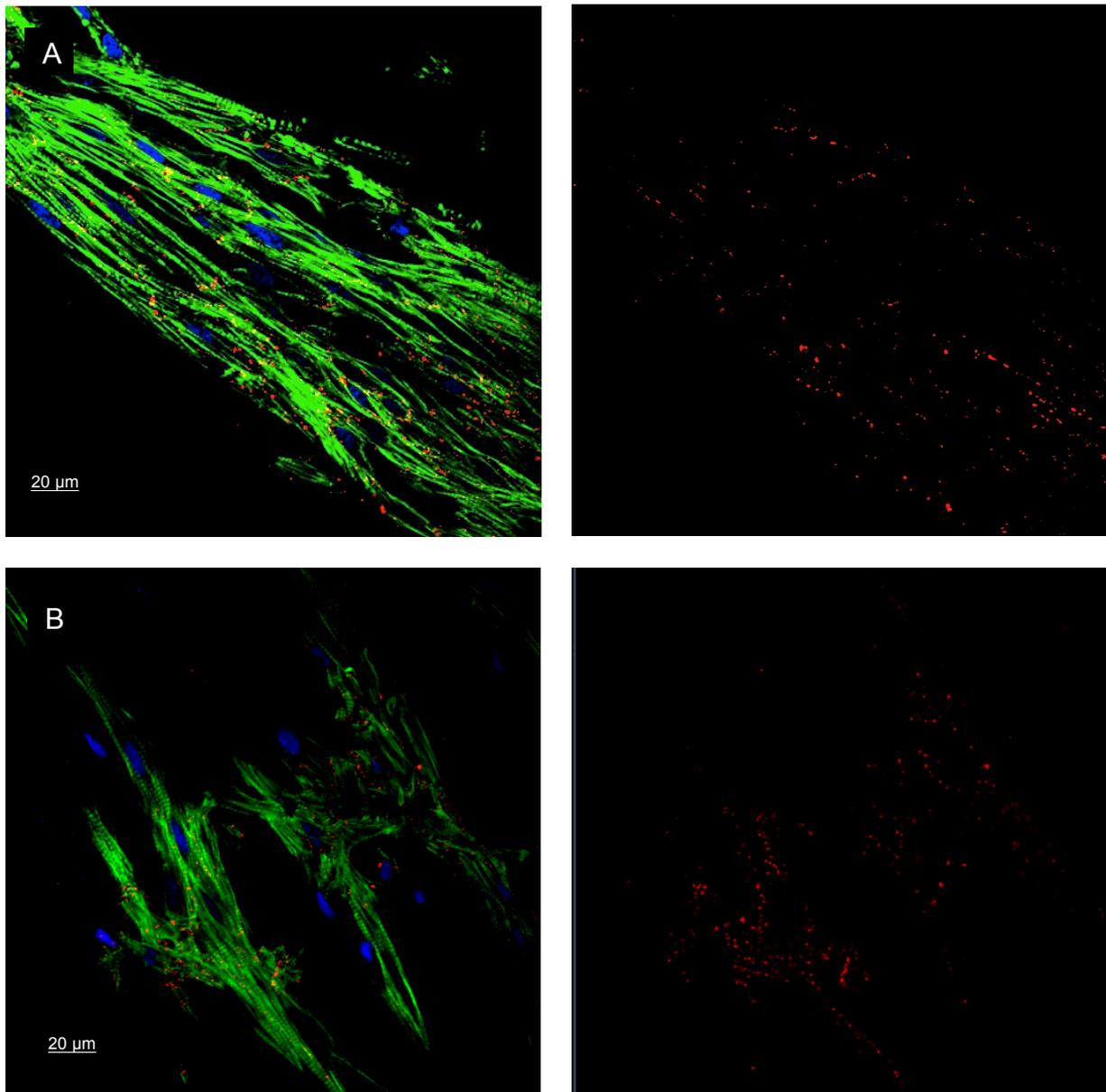
**Abbildung 26: Erhöhte Cx43-Proteinexpression in EHTs unter Insulinsupplementierung.** Repräsentativer *Immunoblot* eines 10%igen SDS PAGE-Gels mit gleichmäßiger Beladung von 25 µg Protein je Spur. Verglichen wurde die Cx43-Expression in Insulin-behandelten EHTs und einer unbehandelten, phasisch gedehnten EHT-Kontrollgruppe.



**Abbildung 27: Densitometrische Messung der *Western Blot* Analyse zeigten eine höhere Cx43-Expression insulinbehandelter EHTs.** Die Schwärzungen der Banden aus Abb. 26 wurden mit Hilfe der *Gene Tool Software* ausgewertet und gegen den Hintergrund der Ponceau-Färbung korrigiert. Die Werte der Insulingruppe beziehen sich gemessen in % auf die Kontrollgruppe (Ctr) (n=4). \*p<0,05 vs. Ctr. (t-Test; ungepaart, zweiseitig).

### 3.5.4 Optimierte Myogenese unter Insulin

In den vorausgegangenen Untersuchungen konnten Unterschiede in der Cx45 mRNA- und Cx43-Proteinexpression sowie der Kontraktionskraft und der spontanen Kontraktionsfrequenz insulinbehandelter EHTs und der Kontrollgruppe gezeigt werden. Durch konfokalmikroskopische Analysen wurde untersucht, ob sich ein morphologisches Korrelat im Sinne eines veränderten Cx43-Expressions- und Verteilungsmuster unter Insulinbehandlung entwickelte. Die insulinbehandelten EHTs zeigten morphologisch besser ausgebildete längsorientierte Kardiomyozytenstränge (Abb. 28), bestehend aus mehreren Zellschichten. An den Zell-Zell-Kontakten konnte die Ausbildung von Cx43-enthaltenden gap junction nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe schienen die Kardiomyozytenstränge dünner, allerdings mit morphologisch ähnlicher Ausbildung von gap junctions. Unterschiede im Cx43-Verteilungsmusters waren nicht feststellbar.



**Abbildung 28: Förderung der Myogenese unter chronischer Insulinstimulation.** Keine Unterschiede im Cx43-Verteilungsmuster in EHTs mit und ohne Insulinstimulation. (A) zeigt eine typische Muskelstrangmorphologie in Insulin-behandelten EHTs; (B) zeigt die typische Muskelstrangmorphologie in unbehandelten EHTs. Grün: Filamentäres Aktin, blau: Zellkerne, rot: Connexin43 (63-fache Vergrößerung).

#### 4. Diskussion

*Gap junctions* und ihre strukturbildenden Proteine, die Connexine, sind für die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums im Herzen von zentraler Bedeutung. Diese Verknüpfungen einzelner Kardiomyozyten über *gap junctions* bilden die Grundlage für eine geordnete und synchrone Erregungsausbreitung und somit für eine koordinierte und effiziente Kontraktion des Herzens. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Connexin-Expression, das morphologische Organisationsmuster und die Modulation der Connexin-Expression durch mechanische sowie pharmakologische (Insulin) Stimuli in künstlichem Herzgewebe - *Engineered Heart Tissue* (EHT) - untersucht. Wesentliche Ergebnisse dieser Untersuchungen sind:

1. EHTs bilden mit zunehmender Entwicklung ein differenziertes funktionelles Synzytium mit intensiven Connexin43-vermittelten Zell-Zell-Kontakten aus und weisen dabei mit einer Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit von  $\sim 0,24$  m/s und einer Refraktärzeit von  $\sim 270$  ms maßgebliche funktionelle Eigenschaften nativen Myokards auf.
2. Die drei für die Erregungsausbreitung im Herzen relevanten Connexin-Isoformen - Cx43, -40 und -45 - werden in EHTs exprimiert. Cx43 stellt in EHTs, wie im nativen Herzgewebe, die vorherrschende Isoform dar. Cx45 wird in EHTs als zweithäufigste Isoform exprimiert.
3. Die mRNA-Expression von Cx45 ist in EHTs etwa doppelt so hoch wie im nativen Herzgewebe. Die Expression von Cx40 nur etwa halb so hoch.
4. Während der EHT-Entwicklung sinkt die mRNA-Konzentration aller Connexin-Isoformen. Dabei kommt es zu einem unterschiedlich starkem Abfall der einzelnen Connexin-Isoformen (Cx40>Cx43>Cx45).
5. Verglichen mit statischer Dehnung zeigen phasisch gedehnte EHTs eine höhere Cx45-Konzentration sowie eine in der Tendenz erhöhte mRNA-Expression von Connexin43 und -40. Phasisch gedehnte EHTs entwickeln eine höhere Kontraktionskraft und kräftigere Muskelstränge. Ein verändertes Cx43 Organisationsmuster war morphologisch nicht eindeutig feststellbar.

6. Unter Insulinsupplementierung ist die mRNA-Konzentration von Cx45 vermindert. Der Proteingehalt von Cx43 ist um ein 4-faches erhöht. Es zeigen sich höhere Kontraktionskräfte und spontane Kontraktionsfrequenzen sowie kräftige Muskelstränge. Ein verändertes Cx43-Organisationsmuster in insulinbehandelten EHTs war morphologisch nicht eindeutig feststellbar.

#### 4.1 Ausbildung eines funktionellen Synzytiums

EHTs werden durch die Vermengung einzelner, enzymatisch isolierter neonataler Herzzellen mit Kollagen-Matrix und Wachstumsfaktoren generiert (Zimmermann et al. 2000). Während der Entwicklung bildet sich ein hoch differenziertes Gewebe mit morphologischen und funktionellen Eigenschaften nativen, reifen Herzgewebes (Zimmermann et al. 2002, Tiburcy et al. 2011). In dieser Arbeit wurde die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über *gap junctions* untersucht.

Mittels *optical mapping* konnten wesentliche funktionell-elektrophysiologische Eigenschaften von nativem Herzmuskelgewebe in EHTs nachgewiesen werden. Nach punktueller elektrischer Stimulation zeigte sich eine bidirektionale, anisotrope Erregungsausbreitung. Durch Stimulationsserien konnten Refraktärzeiten mit Depolarisationsblock nachgewiesen werden. Immunhistologische Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten während der EHT-Entwicklung zeigten auf, dass es mit zunehmender Differenzierung der Kardiomyozyten und des Gewebes zur Ausbildung ausgeprägter Connexin43 vermittelter Kontakte kommt (Abb. 17). Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass EHTs ein funktionelles Synzytium mit wesentlichen Eigenschaften von nativem Herzgewebe ausbilden.

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Erregung wurde mit  $\sim 0,24$  m/s bestimmt. Dies entspricht in etwa der Geschwindigkeit, die von Sun et al. (1993) in septalen Abschnitten unreifer, 10 Tage alter nativen Rattenherzen gemessen wurde (0,27 m/s). Untersuchungen an künstlich generierten Herzmuskelkonstrukten mittels *optical mapping* lieferten Erregungsleitungsgeschwindigkeiten von  $\sim 14$  cm/s (Radisic et al. 2009). Diese Konstrukte wurden durch Besiedelung von Kollagenschwämmen mit Kardiomyozyten hergestellt. Die Messungen erfolgten nach 8-tägiger Kultivierung. Zu späteren Zeitpunkten (10 Tage Kultivierung) zeigten sich höhere Werte von  $\sim 20$  cm/s. Diese Daten zeigen, dass die „elektrische“ Entwicklung ein

zeitabhängiger Prozess ist. Implantationsexperimente konnten darüber hinaus zeigen, dass sich EHTs in einem *in vivo* Milieu weiter entwickeln und dabei Erregungsausbreitungsgeschwindigkeiten von normalem Arbeitsmyokard ( $\sim 0,55$  m/s) entwickeln (Zimmermann et al. 2006).

Die physiologische Refraktärzeit nativen Ventrikelmyokards der Ratte beträgt frequenzabhängig etwa 55 – 85 ms (bei Körpertemperatur) (Ympa 1972) und unterscheidet sich somit stark von dem hier gemessenen Wert ( $\sim 270$  ms), welcher sich eher im Bereich menschlicher Refraktärzeiten befindet (ca. 300 – 400 ms, Klinke, Pape, Kurtz, Silbernagl. Physiologie, 2009, Seite 149). Dabei ist zu berücksichtigen, dass das Rattenherz physiologisch mit einer Frequenz von ca. 300 – 400 Schläge/min kontrahiert. EHTs weisen bei Messungen im Organbad eine deutlich geringe Kontraktionsfrequenz von ca. 120 Schläge/min bzw. ca. 160 Schläge/min (insulinbehandelt) auf. Typischerweise zeigen Herzen bei niedriger Herzfrequenz eine längere Refraktärzeit. Es sei an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen, dass die dargestellten und durch *optical mapping* erhobenen Werte an nur einem EHT erhoben wurden und weiterführende Untersuchungen nötig sind, um die Erregungsausbreitung im EHT-Modell detailliert zu studieren.

EHTs entwickeln bereits nach wenigen Tagen spontane Kontraktionen. Dies lässt darauf schließen, dass EHTs Schrittmacherzentren und -zellen enthalten. Da bei der EHT-Herstellung nur ventrikuläres Gewebe verwendet wird und somit Zellen der primären Schrittmacherzentren in den Vorhöfen des nativen Herzens nicht in der Zellkomposition der EHTs enthalten sind, muss davon ausgegangen werden, dass die entstehenden Schrittmacherzellen der EHTs ventrikulären Ursprungs sind. Dies lässt vermuten, dass es zu einer Anpassungsreaktion während der EHT-Entwicklung kommt, und die Schrittmacherfunktion von einigen Zellen übernommen wird. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass Zellen des ventrikulären Erregungsleitungssystems die Schrittmacherfunktion übernehmen. Bei der Analyse der Connexin-Komposition in EHTs fiel im Vergleich zu nativem Ventrikelgewebe eine höhere Cx45-Konzentration in EHTs auf. Cx45 wird im nativen Herzen besonders im Reizleitungssystem – hier vor allem im Sinus- und AV-Knoten – exprimiert (Desplantez et al. 2007; Severs et al. 2008). Insulin-behandelte EHTs zeigten eine höhere spontane Kontraktionsfrequenz bei geringerer Cx45-mRNA-Expression. Eine verminderte Cx45-mRNA-Konzentration spricht gegen eine

bedeutende Beteiligung von Zellen des Reizleitungssystems bei der Ausbildung von Erregungsleitungszentren. Die Ursache dafür muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. Auf Proteinebene wurden die RNA-Daten allerdings auch aufgrund eines Mangels an guten Cx45-Antikörpern nicht überprüft.

#### **4.2 Connexin-Isoformen in EHTs**

Die Determinanten der elektrischen Fortleitung im Herzen sind komplex und umfassen unter anderem die Quantität der vorhandenen Connexin-Kanäle, die Isoform, die Leitfähigkeit, die Zusammensetzung von verschiedenen Connexin-Typen (Co-Expression verschiedener Typen) sowie das Muster der Connexin-Verteilung (Harris 2001, Desplantez et al. 2007, Solan und Lampe 2009). Die drei Connexin-Isoformen (Cx43, Cx40, Cx45), die maßgeblich für die Erregungsförderung im Herzen verantwortlich sind, werden auch in EHTs exprimiert. Der absolute Gehalt der exprimierten Connexin-mRNA liegt in EHTs bei allen Isoformen unter dem des nativen neonatalen Ventrikelgewebes. Die scheinbare Abnahme der absoluten Cx-Konzentration in EHTs während der EHT-Entwicklung könnte durch den beobachteten Verlust an Kardiomyozyten erklärt werden (Tiburcy et al. 2011). Um dieses zu kompensieren und eine Aussage der Cx-Expression in Herzmuskelzellen zu ermöglichen, wurde die Cx-Expression auf das Herzmuskelzell-spezifische Housekeeping-Gen CSQ2 bezogen (Tiburcy et al. 2011). Dabei zeigte sich eine gleich hohe Expression von Connexin43 und eine erhöhte Cx45-Expression in EHTs. Lediglich Cx40 zeigt ein niedriges RNA Niveau bei ca. 40% des nativen Herzgewebes. Bei der Einordnung dieser Ergebnisse sind Untersuchungen von Fishman et al. (1991) hilfreich. Hier konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von Cx43-mRNA im nativen reifenden Rattenherz in der ersten postnatalen Woche ihr Maximum erreicht und fortan abfällt, um im adulten Herzen eine Expressionsrate von etwa 50% der maximal gemessenen Werte zu erreichen.

Ein interessanter Aspekt bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ist das Verhalten der Cx45-Konzentration. Es ist bekannt, dass die Connexin-Isoformen ihren strukturspezifischen physiologischen Anforderungen entsprechend, unterschiedliche Eigenschaften in der Erregungsförderung aufweisen. Das native Arbeitsmyokard der Ventrikel, mit Connexin43 als prädominante Isoform, weist dabei eine geringere Leitfähigkeit auf, als das schnell leitende Cx40, welches vor allem im

Erregungsleitungssystem zu finden ist (Desplantez et al. 2007; Severs et al. 2008). Cx45 wird vornehmlich im leitungsverzögernden AV-Knoten und Sinusknoten exprimiert und weist dabei die geringste Leitfähigkeit auf (Desplantez et al. 2007). Die führende Connexin-Isoform in EHTs bildet Cx43, gefolgt von Cx45. Im nativen Gewebe des Ventrikelmyokards ist Cx43, gefolgt vom schneller leitenden Cx40, am häufigsten exprimiert. Diese auffällige Verschiebung der Proportionen mit erhöhter Cx45-Expression in EHTs erscheint zunächst paradox, da die Bereiche, in welchen Cx45 vornehmlich exprimiert wird (Sinus- und AV-Knoten) durch Abtrennung der Vorhöfe und Gefäßstiele vor Enzymverdau nicht in der Zellpräparation enthalten sind. Dabei ist zu beachten, dass sich neonatales Rattenmyokard noch in der Entwicklung befindet und es neben der strukturspezifischen Connexin-Verteilung ein entwicklungspezifisches Connexin-Expressionsmuster gibt (Coopen et al. 2003). Cx45 ist in der Herzentwicklung der Maus von essentieller Bedeutung. Es ist mit Beginn der Kontraktion die erste detektierbare Isoform und kommt ubiquitär verteilt im Herzen vor (Coopen et al. 2003). Die kontinuierlichen Abnahme von Cx45 im Arbeitsmyokard und dessen Ersatz durch Cx43 im weiteren Verlauf der Entwicklung wurde von Alcolea et al. (1999), Kumai et al. (2000) und Coppen et al. (2001) beschrieben. Beim Menschen scheint dieser Prozess in ähnlicher Weise zu verlaufen (Coppen et al. 2003). Unter der Annahme, dass die Situation in der Ratte analog ist, könnte ein höherer Cx45-Gehalt in EHTs ein Anzeichen für einen frühen Entwicklungsprozess darstellen und dabei auf ein noch unvollständig ausgereiftes elektrisches Netzwerk hinweisen. Da bei der Isolierung der Kardiomyozyten und der anderen Zelltypen des Herzens während der enzymatischen Zellpräparation interzelluläre Kontakte verloren gehen, müssen sich diese neu ausbilden, wobei dieser Prozess ähnlich wie in fetalem Gewebe ablaufen könnte (erst Bildung von Cx45, dann Ersatz durch Cx43). Dies könne auch eine Erklärung für die geringere Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit in EHTs im Vergleich zu ausgereiftem Myokard sein.

Es ist aber auch nicht ausgeschlossen, dass Fibroblasten Cx43 und Cx45 exprimieren und dadurch zu einer erhöhten Cx45-Expression beitragen, insbesondere vor dem Hintergrund einer kontinuierlichen Zunahme des Fibroblastenanteils während der EHT-Entwicklung auf bis zu 70% (Tiburcy et al. 2011). Aufgrund der deutlich höheren Connexin-Expression in Herzmuskelzellen ist

jedoch davon auszugehen, dass die gemessenen Veränderungen in diesen Versuchen im Wesentlichen auf Veränderung in Kardiomyozyten zurückzuführen sind.

### **4.3 Modulierung der Connexine in EHTs durch mechanische Dehnung**

Fink et al. (2000; für Huhn) und Zimmermann et al. (2000; für Ratte) konnten zeigen, dass die funktionellen Eigenschaften von EHTs durch mechanische Dehnung beeinflusst werden und durch Variation der Dehnungsform die kontraktilen Eigenschaften der EHTs weiter verbessert werden können (Zimmermann et al. 2006). Mechanische Dehnung induziert dabei eine Hypertrophie der Kardiomyozyten. Weiterhin unterstützt sie v.a. die Differenzierung von Kardiomyozyten und vereinheitlicht die Zellorientierung. Dies führt insgesamt zu einer Verbesserung der kontraktilen Eigenschaften. Die hier gemessene höhere Kraftentwicklung phasisch gedehnter EHTs gegenüber der statischen Dehnungsform geht mit Ausbildung gut erkennbarer Connexin43-haltiger Herzmuskelstränge einher. Auch unter phasischer Dehnung scheint die Erhöhung der Cx45-mRNA auf die besondere Rolle dieser Cx-Isoform in EHTs hinzuweisen. Eine höhere Cx43- und Cx40-mRNA-Konzentration ist in der Tendenz erkennbar. Gleichartige Ergebnisse hinsichtlich der Cx43-Expression werden von Kensah et al. (2011) beschreiben. Dabei scheint eine frühe Reaktion der Cx43-Expression der mechanischen Stimulation zu folgen. Salameh et al. (2010) wiesen eine Erhöhung der Cx43-mRNA und -Proteinexpression in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nach pulsatilem Dehnung über 24 Stunden nach. Weitere Dehnung (>48h) führte zu einem Abfallen Cx43-Expression. Dies könnte eine Erklärung dafür bieten, weshalb keine deutlicheren Unterschiede in der Cx43-Expression phasisch gedehnter EHTs (6 Tage Dehnung) gegenüber statischer Dehnung zu sehen waren. Untersuchungen von Zhuang et al. (2000) zeigten, dass die pulsatile Dehnung von Mono-Zellschichten neonataler Ratten-Kardiomyozyten bereits nach kurzer Exposition (1-6 h) zu einem stärkeren Anstieg der Cx43-Proteinkonzentration und schnelleren Erregungsleitungsgeschwindigkeiten führt als statische Dehnung. Phasische Dehnung bewirkt dabei erhöhte Konzentrationen von Protoonkogenen und kontraktilen Proteinen sowie der Aktivierung von MAPKs, Thyrosinkinase, Proteinkinase C und Phospholipasen C und D. Weiterhin wird der Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II, VEGF und TGF- $\beta$  aus Kardiomyozyten, eine Rolle bei diesem Effekt zugesprochen (Saffitz und Kléber

2004). Ein entsprechendes Geschehen phasisch gedehnter EHTs könnte zu einem gesteigerten Gehalt an Connexin-Proteinen führen und durch Aktivierung der o.g. Enzyme die Regulation der Connexine beeinflussen. Dies muss aber in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Die Daten von Salameh et al. (2010) zeigen darüber hinaus eine Akzentuierung von Cx43-Proteinen zusammen mit N-Cadherin an den Zellpolen elongierter Kardiomyozyten. Es ist bekannt, dass das lokale Verteilungsmuster der Connexin-Proteine innerhalb der Kardiomyozyten für eine adäquate Funktion des funktionellen Synzytiums von Bedeutung ist und es bei pathologischen Zuständen zu einer intrazellulären Verlagerung von Cx43-Proteinen aus den Regionen der *Disci intercalares* kommen kann (Severs et al. 2008, Duffy 2012). Es erscheint naheliegend, dass phasische Dehnung auch in EHTs Einfluss auf die lokale Anordnung der Connexine nimmt. Die Induktion einer physiologischen Hypertrophie sowie eine verbesserte mechanisch-strukturelle Integration der Kardiomyozyten in EHTs könnte die räumliche relevante Etablierung von Connexin-Verbindungen bedingen und begünstigen. Dieser Prozess würde analog zu den Beobachtungen der Entwicklung im fetalen Herzen ablaufen, bei der die Etablierung interzellulärer Connexin-Verbindungen eng mit der Ausbildung mechanischer Kontakte verbunden ist. So kommt es zunächst zur mechanischen Stabilisierung durch Desmosomen und *fascia adherentes* und der anschließenden Verknüpfung durch Connexin (Angst et al. 1997). Diese Annahmen müssten durch detailliertere morphologische Analysen und Messungen der Erregungsleitung beispielsweise mittels *optical mapping* überprüft werden.

#### 4.4 Modulation der Connexine in EHTs durch Insulin

Bei der Generierung von EHTs zeigte sich, dass die Supplementierung mit Insulin einen günstigen Effekt auf die funktionellen Eigenschaften hat (Zimmermann et al. 2006, Naito et al. 2006). In den hier untersuchten EHTs konnte die Steigerung der kontraktile Funktionen reproduziert werden. Immunhistologischen Analysen zeigten entsprechend stärker ausgebildete Muskelstränge und eine höhere Anzahl von Kardiomyozyten mit differenzierter Aktin-Querstreifung in Insulin behandelten EHTs. Die Herzmuskelzellen waren dabei durch Connexin-Proteine bzw. *gap junctions* verbunden.

Bei der Bestimmung des Connexin-mRNA-Gehaltes unter Insulinsupplementierung und in den zuvor beschriebenen Versuchen wurde Calsequestrin2 (CSQ2) als Referenzgen („*housekeeping-Gen*“) herangezogen. Tiburcy et al. (2011) konnten zeigen, dass CSQ2 von Kardiomyozyten auf einem gleichbleibenden Niveau exprimiert wird und sich daher besonders für diese Untersuchungen eignet. Eigene Befunde ließen jedoch vermuten, dass CSQ2 auch unabhängig von der Herzmuskelzellzahl Insulin-reguliert sein könnte. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), das ebenfalls häufig bei Standardisierung von Expressionsdaten verwendet wird, eignet sich hier in keinem Fall, da es maßgeblich an der Glukoseregulation beteiligt ist (Alexander et al. 1988, Barroso et al. 1999). Aufgrund dieser Überlegungen wurde für die Insulin-Experimente 18S rRNA als alternativer Referenzwert verwendet. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Cx45-mRNA. Cx45 kann sowohl heterotypische als auch heteromere Kanäle mit Cx43 bilden (Elenes et al. 2001, Desplantez et al. 2004). Untersuchungen von Grikscheid et al. (2008) weisen darauf hin, dass die Co-Expression von Cx45 und Cx43 die Größe von *gap junctions* vermindert. Betsuyaku et al. (2006) zeigten, dass eine Überexpression von Cx45 in Mäuse-Ventrikeln zu verminderter *gap junction*-Verknüpfung und erhöhter Induzierbarkeit von Arrhythmien führte. Ein vermindertes Cx45/Cx43-Verhältnis Insulin-supprimierter EHTs könnte funktionell verbesserte verknüpfte Kardiomyozyten repräsentieren und die verminderte Cx-45-Expression auf einen höheren Grad der Ausreifung des elektrischen Netzwerkes hinweisen. Da Cx45 eine langsam leitende Isoform darstellt, wäre zu erwarten, dass sich die Erregungsausbreitung in Insulin behandelten EHTs beschleunigt. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte ebenfalls per *optical mapping* erfolgen.

Gegenüber der unveränderten Cx43-mRNA Expression zeigte sich eine Zunahme der Cx43-Proteinkonzentration. Eine entsprechende Diskrepanz zwischen Cx43-mRNA und Protein wurde von anderen Gruppen beobachtet (Salameh et al. 2010a). Dies könnte auf einen erhöhten Wirkungsgrad der Translation unter parakriner Stimulation zurückzuführen sein, wie es unter kardialer Hypertrophie von Hannan et al. (2003) beschrieben wurde.

Im *Western Blot* fielen vor allem in der Insulin-behandelten Gruppe multiple Cx43-Phosphorylierungszustände auf. Cx43 ist ein bekanntes Phosphoprotein. Solan und Lampe (2009) fassten die Cx-Phosphorylierungen im nativen Myokard zusammen: Die unterste, am schnellsten wandernde Bande entsprach der unphosphorylierten Form (P0), gefolgt von einer an Ser<sup>365</sup> phosphorylierten Form (P1) und der dritten dreifach phosphorylierten Form (P2) an Ser<sup>325</sup> /Ser<sup>328</sup> /Ser<sup>330</sup>. Cx43-Phosphorylierungen spielen für intrazelluläre Transportvorgänge, Connexon-Permeabilität und Cx-Lebenszyklus eine zentrale Rolle (Solan und Lampe 2009). Cx43-Dephosphorylierungen werden bei verschiedenen pathologischen Zuständen beobachtet und unter anderem bei lokalen Umverteilungsprozessen der Cx43-Kanäle von den Glanzstreifen in laterale Membranabschnitte der Kardiomyozyten beobachtet (Lampe et al. 2006). Die Analyse des Migrationsverhalten der Cx43-Banden im *Western Blot* erscheint auf Grund komplexer Funktionszustände der Cx-Proteine zur verlässlichen Beurteilung der Cx-Eigenschaften als ungeeignet (Lampe und Lau 2004, Duffy 2012). So werden detaillierter Studien benötigt, um eine fundierte Interpretation der *Western Blots* dieser Arbeit zu erlauben. Die alleinige Sicht auf die Quantität der Cx43-Proteine erscheint jedenfalls ungenügend um Aussagen über die Qualität der interzellulärer Cx-Verknüpfungen zu erheben.

#### 4.5 Ausblick und Limitationen

Die hier erhobene Studie beschreibt die Ausbildung eines elektrischen Netzwerkes in *Engineered Heart Tissue* (EHT) unter besonderer Berücksichtigung der Beteiligung von Connexin-Proteinen. Mittels *optical mapping* konnte ein Verfahren etabliert werden, welches die Analyse der Erregungsausbreitung in EHTs ermöglicht. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob die beobachteten Änderungen der Connexin-Zusammensetzung in EHTs in der Entwicklung, sowie unter mechanischer und Insulin Stimulation zu einem veränderten Erregungsausbreitungsverhalten führen. Dabei scheint auch wichtig die Auswirkung unterschiedlicher Dehnungsformen sowie Insulinkonzentrationen systematisch zu untersuchen. Eine klare Limitation dieser Arbeit war, dass keine spezifischen Cx45- und Cx40-Antikörper zur Verfügung standen, um im Kulturverlauf eine komplette Übersicht über die Connexin-Veränderungen erhalten zu können. Neben der Modifikation durch Insulin und mechanische Dehnung wird in weiterführenden Untersuchungen die Rolle der elektrischen Stimulation im Rahmen der EHT-Bildung überprüft. Dies schließt auch detailliertere histomorphologische Analysen unter Verwendung ganzer EHT-Präparate (*whole mount*) ein, um die räumlichen Cx-Verteilung besser beurteilen zu können.

## 5. Zusammenfassung

Durch diese Arbeit soll das Verständnis Connexin-vermittelter interzellulärer Verbindungen in EHTs, welche die basale Einheit eines funktionellen Synzytiums bilden und die Grundlage für die wesentliche Funktion von Herzgewebe – die geordnete Kontraktion auf Basis einer geordneten Erregungsausbreitung – darstellt, vertieft werden. Dazu wurden Connexin-mRNA- und Protein-Expressionen mittels qPCR und *western blots* untersucht, immunhistologische Analysen erstellt und mittels *optical mapping* eine funktionelle Untersuchungstechnik der Erregungsausbreitung in EHTs demonstriert. Es konnte gezeigt werden, dass sich aus isolierten Herzzellen während Kultivierung und Entwicklung der EHTs ein Gewebeverbund bildet, der sich durch die zunehmende Etablierung eines morphologisch differenzierten Netzwerkes Cx(43)-haltiger Zell-Zell-Kontakte auszeichnet. Mittels *optical mapping* wurden elektrophysiologische Eigenschaften des funktionellen Synzytiums demonstriert und dabei eine richtungsabhängige Erregungsausbreitung von  $\sim 0,24$  m/s ermittelt. Die drei bestimmenden Cx-Isoformen des Herzens Cx43, Cx40 und Cx45 werden auch in EHTs exprimiert. Cx43 bildet dabei, wie im nativen Herzgewebe die dominierende Isoform. Eine gesteigerte Cx45-Expression in EHTs während der Reifung könnten Hinweise für einen fortlaufenden Reifungsprozess des elektrischen Netzwerkes in EHTs, entsprechend dem Verlauf im nativen Herzgewebe liefern. Eine Modulierung der Cx-Expression konnte durch mechanische Dehnung und Insulinsupplementierung erreicht werden. Eine Erhöhung des Cx43-Proteingehaltes und eine Verminderung der mRNA-Expression der langsam leitenden Cx45-Isoform weisen darauf hin, dass Insulin einen Einfluss auf die Cx-Expression und dabei besonders auf den Cx43-Proteinumsatz hat. Pulsatile Streckung mittels phasisch-mechanischer Dehnung der EHTs führt zu einer Steigerung der mRNA-Expression aller Isoformen und scheint somit ebenfalls Einfluss auf die Cx-vermittelte Zell-Zell-Kommunikation in EHTs zu nehmen. Weitere morphologische und funktionelle Studien werden nötig sein, um das Verständnis über die Ausbildung eines funktionellen Synzytiums in EHTs zu vertiefen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
ADH	Antidiuretisches Hormon
AT <sub>1</sub>	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrio-Ventrikulär
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBFHH	Kalzium- und Bicarbonat-freier Hanks Puffer mit HEPES
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementär DNA
CEE	<i>chicken embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
cm	Zentimeter
CSQ	Calsequestrin
Ct	<i>cycle threshold</i> , Zyklus Schwellenwert
Cx	Connexin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	<i>enhanced Chemiluminescence</i>
ECT	<i>engineered connective tissue</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i>
et al.	und andere
ES	embryonale Stammzellen
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
Hz	Hertz (1Hz = 60/min)
InsP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
l	Liter
L <sub>max</sub>	EHT-Dehnung bei maximaler Kontraktionskraft
L <sub>0</sub>	EHT ohne Vordehnung
M	Mol/Liter
m	Meter
MAPK	Mitogenaktiverte Proteinkinase
min	Minute
n	Anzahl
N	Mol/l H <sub>2</sub> O oder Newton
NKM	Nicht-Kardiomyozyten-Medium
OD	Optische Dichte
p	Wahrscheinlichkeit
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
(q)PCR	(Quantitative Echtzeit) <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-BB	Platelet-derived-growth-factor-BB
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> - Ionenkonzentration
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-

	Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler
Ser	Aminosäure Serin
SI	Internationales Einheitensystem (Système international d'unités)
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TT	<i>twitch tension</i> ; Kontraktionskraft
U	Unit (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
V	Volt
VAD	<i>ventricular assist device</i>

#### SI-Einheiten-Präfixe

k	Kilo ( $10^3$ )
m	Milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
n	Nano ( $10^{-9}$ )

## 7. Literaturverzeichnis

- Alcolea, S., M. Theveniau-Ruissy, T. Jarry-Guichard, I. Marics, E. Tzouanacou, J.P. Chauvin, J.P. Briand, A.F. Moorman, W.H. Lamers, and D.B. Gros. 1999. Downregulation of connexin 45 gene products during mouse heart development. *Circ Res.* 84:1365-1379.
- Alexander, M.C., M. Lomanto, N. Nasrin, and C. Ramaika. 1988. Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:5092-5096.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.B., Starke, K. 2009. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Seite 418. Urban und Fischer-Verlag. Auflage 10.
- Angst, B.D., L.U. Khan, N.J. Severs, K. Whitely, S. Rothery, R.P. Thompson, A.I. Magee, and R.G. Gourdie. 1997. Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res.* 80:88-94.
- Barroso, I., B. Benito, C. Garci-Jimenez, A. Hernandez, M.J. Obregon, and P. Santisteban. 1999. Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during Brown adipocyte differentiation. *Eur J Endocrinol.* 141:169-179.
- Beardslee, M.A., J.G. Laing, E.C. Beyer, and J.E. Saffitz. 1998. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res.* 83:629-635.
- Beardslee, M.A., D.L. Lerner, P.N. Tadros, J.G. Laing, E.C. Beyer, K.A. Yamada, A.G. Kleber, R.B. Schuessler, and J.E. Saffitz. 2000. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res.* 87:656-662.
- Bennett, M.V., and D.A. Goodenough. 1978. Gap junctions, electrotonic coupling, and intercellular communication. *Neurosci Res Program Bull.* 16:1-486.
- Berthoud, V.M., M.L. Ledbetter, E.L. Hertzberg, and J.C. Saez. 1992. Connexin43 in MDCK cells: regulation by a tumor-promoting phorbol ester and Ca<sup>2+</sup>. *Eur J Cell Biol.* 57:40-50.
- Betsuyaku T., Nnebe N. S., Sundset R., Patibandla S., Krueger C. M., Yamada K. A. (2006). Overexpression of cardiac connexin45 increases susceptibility to

- ventricular tachyarrhythmias *in vivo*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290:H163–H171.
- Beyer, E.C., D.L. Paul, and D.A. Goodenough. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *J Membr Biol.* 116:187-194.
- Bradford, M.M. 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.
- Carrier, R.L., M. Papadaki, M. Rupnick, F.J. Schoen, N. Bursac, R. Langer, L.E. Freed, and G. Vunjak-Novakovic. 1999. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng.* 64:580-589.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Cooper, C.D., and P.D. Lampe. 2002. Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem.* 277:44962-44968.
- Coppen, S.R., R.G. Gourdie, and N.J. Severs. 2001. Connexin45 is the first connexin to be expressed in the central conduction system of the mouse heart. *Exp Clin Cardiol.* 6:17-23.
- Coppen, S.R., R.A. Kaba, D. Halliday, E. Dupont, J.N. Skepper, S. Elneil, and N.J. Severs. 2003. Comparison of connexin expression patterns in the developing mouse heart and human foetal heart. *Mol Cell Biochem.* 242:121-127.
- Desplantez, T., D. Halliday, E. Dupont, and R. Weingart. 2004. Cardiac connexins Cx43 and Cx45: formation of diverse gap junction channels with diverse electrical properties. *Pflugers Arch.* 448:363-375.
- Desplantez, T., E. Dupont, N.J. Severs, and R. Weingart. 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol.* 218:13-28.
- Dewey, M.M., and L. Barr. 1962. Intercellular Connection between Smooth Muscle Cells: the Nexus. *Science.* 137:670-672.
- Duffy H. S. 2012. The molecular mechanisms of gap junction remodeling. *Heart Rhythm* 9:1331–1334.
- Ek-Vitorin, J.F., T.J. King, N.S. Heyman, P.D. Lampe, and J.M. Burt. 2006. Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res.* 98:1498-1505.

- Elenes S., Martinez A. D., Delmar M., Beyer E. C., Moreno A. P. (2001). Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys. J.* 81:1406–1418
- Eschenhagen, T., C. Fink, U. Remmers, H. Scholz, J. Wattchow, J. Weil, W. Zimmermann, H.H. Dohmen, H. Schafer, N. Bishopric, T. Wakatsuki, and E.L. Elson. 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb J.* 11:683-694.
- Eschenhagen, T., and W.H. Zimmermann. 2005. Engineering myocardial tissue. *Circ Res.* 97:1220-1231.
- Eurotransplant International Foundation (2011). Jährliche Zahlen in Eurotransplant, 2010. <http://www.eurotransplant.org/?id=jaehrliche> (2011)
- Fallon, R.F., and D.A. Goodenough. 1981. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol.* 90:521-526.
- Fink, C., S. Ergun, D. Kralisch, U. Remmers, J. Weil, and T. Eschenhagen. 2000. Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Faseb J.* 14:669-679.
- Fishman, G.I., E.L. Hertzberg, D.C. Spray, and L.A. Leinwand. 1991. Expression of connexin43 in the developing rat heart. *Circ Res.* 68:782-787.
- Fox, K.F., M.R. Cowie, D.A. Wood, A.J. Coats, J.S. Gibbs, S.R. Underwood, R.M. Turner, P.A. Poole-Wilson, S.W. Davies, and G.C. Sutton. 2001. Coronary artery disease as the cause of incident heart failure in the population. *Eur Heart J.* 22:228-236.
- Gaietta, G., T.J. Deerinck, S.R. Adams, J. Bower, O. Tour, D.W. Laird, G.E. Sosinsky, R.Y. Tsien, and M.H. Ellisman. 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science.* 296:503-507.
- Girao, H., S. Catarino, and P. Pereira. 2009. Eps15 interacts with ubiquitinated Cx43 and mediates its internalization. *Exp Cell Res.* 315:3587-3597.
- Goldberg, G.S., V. Valiunas, and P.R. Brink. 2004. Selective permeability of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta.* 1662:96-101.
- Goodenough, D.A., J.A. Goliger, and D.L. Paul. 1996. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 65:475-502.
- Grikscheit K., Thomas N., Bruce A. F., Rothery S., Chan J., Severs N. J., et al. 2008. Coexpression of connexin 45 with connexin 43 decreases gap junction size. *Cell Commun. Adhes.* 15, 185–193.

- Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y. 2003. Cardiac hypertrophy: a matter of translation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30: 517–527
- Harris, A.L. 2001. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 34.
- Harris, A.L. 2007. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Prog Biophys Mol Biol*. 94:120-143.
- Harris, A.L., Locke, D. 2009. Connexins a guide. Auflage 1. Humana Press, Springer-Verlag GmbH, ISBN 978-1934115466
- Hesketh, G.G., M.H. Shah, V.L. Halperin, C.A. Cooke, F.G. Akar, T.E. Yen, D.A. Kass, C.E. Machamer, J.E. Van Eyk, and G.F. Tomaselli. 2010. Ultrastructure and regulation of lateralized connexin43 in the failing heart. *Circ Res*. 106:1153-1163.
- Jordan, K., R. Chodock, A.R. Hand, and D.W. Laird. 2001. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci*. 114:763-773.
- Jozwiak, J., and S. Dhein. 2008. Local effects and mechanisms of antiarrhythmic peptide AAP10 in acute regional myocardial ischemia: electrophysiological and molecular findings. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 378:459-470.
- Kelm, J.M., E. Ehler, L.K. Nielsen, S. Schlatter, J.C. Perriard, and M. Fussenegger. 2004. Design of artificial myocardial microtissues. *Tissue Eng*. 10:201-214.
- Kensah G, Gruh I, Viering J, et al. 2011. A novel miniaturized multimodal bioreactor for continuous in situ assessment of bioartificial cardiac tissue during stimulation and maturation. *Tissue Eng*. 17(4):463–473.
- Kirklin, J.K., D.C. Naftel, R.C. Bourge, D.C. McGiffin, J.A. Hill, R.J. Rodeheffer, B.E. Jaski, P.J. Hauptman, M. Weston, and C. White-Williams. 2003. Evolving trends in risk profiles and causes of death after heart transplantation: a ten-year multi-institutional study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 125:881-890.
- Kjolbye, A.L., M. Dikshteyn, B.C. Eloff, I. Deschenes, and D.S. Rosenbaum. 2008. Maintenance of intercellular coupling by the antiarrhythmic peptide rotigaptide suppresses arrhythmogenic discordant alternans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294:H41-49.
- Kjolbye, A.L., K. Haugan, J.K. Hennen, and J.S. Petersen. 2007. Pharmacological modulation of gap junction function with the novel compound rotigaptide: a

- promising new principle for prevention of arrhythmias. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 101:215-230.
- Klinke, R., H.-C. Pape, A. Kurtz, S. Silbernagl. Physiologie. Thieme-Verlag, 2009.
- Kostin, S., M. Rieger, S. Dammer, S. Hein, M. Richter, W.P. Klovekorn, E.P. Bauer, and J. Schaper. 2003. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem.* 242:135-144.
- Kostin, S., S. Dammer, S. Hein, W.P. Klovekorn, E.P. Bauer, and J. Schaper. 2004. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res.* 62:426-436.
- Kovacs, M., J. Toth, C. Hetenyi, A. Malnasi-Csizmadia, and J.R. Sellers. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem.* 279:35557-35563.
- Kumai, M., Nishii, K., Nakamura, K., Takeda, N., Suzuki, M., Shibata, Y. 2000. Loss of connexin45 causes a cushion defect in early cardiogenesis. *Development.* 127: 3501–3512
- Laing, J.G., and E.C. Beyer. 1995. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem.* 270:26399-26403.
- Laing, J.G., P.N. Tadros, K. Green, J.E. Saffitz, and E.C. Beyer. 1998. Proteolysis of connexin43-containing gap junctions in normal and heat-stressed cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 38:711-718.
- Laird, D.W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J.* 394:527-543.
- Lampe, P.D. 1994. Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *J Cell Biol.* 127:1895-1905.
- Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. 2004. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(7):1171–1186
- Lampe, P.D., C.D. Cooper, T.J. King, and J.M. Burt. 2006. Analysis of Connexin43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci.* 119:3435-3442.
- Lawrence, T.S., W.H. Beers, and N.B. Gilula. 1978. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature.* 272:501-506.
- Lauf, U., B.N. Giepmans, P. Lopez, S. Braconnot, S.C. Chen, and M.M. Falk. 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and

- accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:10446-10451.
- Leithe, E., and E. Rivedal. 2004. Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem*. 279:50089-50096.
- Leithe, E., and E. Rivedal. 2007. Ubiquitination of gap junction proteins. *J Membr Biol*. 217:43-51.
- Li, R.K., T.M. Yau, R.D. Weisel, D.A. Mickle, T. Sakai, A. Choi, and Z.Q. Jia. 2000. Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 119:368-375.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.
- Murdoch, D.R., M.P. Love, S.D. Robb, T.A. McDonagh, A.P. Davie, I. Ford, S. Capewell, C.E. Morrison, and J.J. McMurray. 1998. Importance of heart failure as a cause of death. Changing contribution to overall mortality and coronary heart disease mortality in Scotland 1979-1992. *Eur Heart J*. 19:1829-1835.
- Murray, S. A., Nickel, B. M. and Gay, V. L. 2004. Endocytosis of connexin protein in adrenal cells. *Endocr. Res*. 30,:647-654
- Musil, L.S., and D.A. Goodenough. 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell*. 74:1065-1077.
- Musil, L.S. 2000. Regulation of Connexin Degradation As a Mechanism to Increase Gap Junction Assembly and Function. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 25207-25215
- Naito, H., I. Melnychenko, M. Didie, K. Schneiderbanger, P. Schubert, S. Rosenkranz, T. Eschenhagen, and W.H. Zimmermann. 2006. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*. 114:172-78.
- Ott, H.C., T.S. Matthiesen, S.K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, and D.A. Taylor. 2008. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 14:213-221.

- Owan, T.E., D.O. Hodge, R.M. Herges, S.J. Jacobsen, V.L. Roger, and M.M. Redfield. 2006. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 355:251-259.
- Paulson, A.F., P.D. Lampe, R.A. Meyer, E. TenBroek, M.M. Atkinson, T.F. Walseth, and R.G. Johnson. 2000. Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 17):3037-3049.
- Peters, N.S., N.J. Severs, S.M. Rothery, C. Lincoln, M.H. Yacoub, and C.R. Green. 1994. Spatiotemporal relation between gap junctions and fascia adherens junctions during postnatal development of human ventricular myocardium. *Circulation.* 90:713-725.
- Radisic, M., H. Park, H. Shing, T. Consi, F.J. Schoen, R. Langer, L.E. Freed, and G. Vunjak-Novakovic. 2004. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:18129-18134.
- Radisic, M., V.G. Fast, O.F. Sharifov, R.K. Iyer, H. Park, and G. Vunjak-Novakovic. 2009. Optical mapping of impulse propagation in engineered cardiac tissue. *Tissue Eng Part A.* 15:851-860.
- Robertson, J.D. 1963. The Occurrence of a Subunit Pattern in the Unit Membranes of Club Endings in Mauthner Cell Synapses in Goldfish Brains. *J Cell Biol.* 19:201-221.
- Rubart, M., K.B. Pasumarthi, H. Nakajima, M.H. Soonpaa, H.O. Nakajima, and L.J. Field. 2003. Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation. *Circ Res.* 92:1217-1224.
- Saffitz, J.E., and A.G. Kleber. 2004. Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart. *Circ Res.* 94:585-591.
- Salameh, A., Wustmann, A., Karl, S., Blanke, K., Apel, D., Rojas-Gomez, D., Franke, H., Mohr, F., W. Janousek, J., Dhein, S. 2010. Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circ Res.* 62: 1592-1602
- Salameh A. Karl S. Djilali H. Dhein S. Janousek J. Daehnert I. 2010. Opposing and synergistic effects of cyclic mechanical stretch and alpha- or beta-adrenergic stimulation on the cardiac gap junction protein Cx43. *Pharmacol Res.* 62:506

- Schannwell, C.M., M.G. Hennersdorf, and B.E. Strauer. 2007. [Hypertension and cardiac failure]. *Internist (Berl)*. 48:909-920.
- Sepp, R., N.J. Severs, and R.G. Gourdie. 1996. Altered patterns of cardiac intercellular junction distribution in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 76:412-417.
- Severs, N.J., S. Rothery, E. Dupont, S.R. Coppen, H.I. Yeh, Y.S. Ko, T. Matsushita, R. Kaba, and D. Halliday. 2001. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system. *Microsc Res Tech*. 52:301-322.
- Severs, N.J., A.F. Bruce, E. Dupont, and S. Rothery. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res*. 80:9-19.
- Shimizu, 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*. 90:40e-48.
- Shimizu, T., H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi, and T. Okano. 2006. Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb J*. 20:708-710.
- Solan, J.L., and P.D. Lampe. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J*. 419:261-272.
- Solan, J.L., L. Marquez-Rosado, P.L. Sorgen, P.J. Thornton, P.R. Gafken, and P.D. Lampe. 2007. Phosphorylation at S365 is a gatekeeper event that changes the structure of Cx43 and prevents down-regulation by PKC. *J Cell Biol*. 179:1301-1309.
- Soonpaa, M.H., G.Y. Koh, M.G. Klug, and L.J. Field. 1994. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*. 264:98-101.
- Sosinsky, G.E., and B.J. Nicholson. 2005. Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*. 1711:99-125.
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2011). Sterbefälle insgesamt 2009 nach den 10 häufigsten Todesursachen.  
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt,templateld=renderPrint.psml> (2011)

- Sun, L.S., M.J. Legato, T.S. Rosen, S.F. Steinberg, and M.R. Rosen. 1993. Sympathetic innervation modulates ventricular impulse propagation and repolarisation in the immature rat heart. *Cardiovasc Res.* 27:459-463.
- Tiburcy, M. Didié, M. Boy, O. Christalla, P. Döker, S. Naito, H. Karikkineth, BC. El-Armouche, A. Grimm, M. Nose, M. Eschenhagen, T. Zieseniss, A. Katschinski, DM. Hamdani, N. Linke, WA. Yin, X. Mayr, M. Zimmermann, WH. 2011. Terminal differentiation, advanced organotypic maturation, and modeling of hypertrophic growth in engineered heart tissue. *Circ Res.* 28;109(10):1105-14.
- van Kempen, M.J., C. Fromaget, D. Gros, A.F. Moorman, and W.H. Lamers. 1991. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res.* 68:1638-1651.
- van Kempen, M.J., I. ten Velde, A. Wessels, P.W. Oosthoek, D. Gros, H.J. Jongsma, A.F. Moorman, and W.H. Lamers. 1995. Differential connexin distribution accommodates cardiac function in different species. *Microsc Res Tech.* 31:420-436.
- Vantler, M., B.C. Karikkineth, H. Naito, M. Tiburcy, M. Didie, M. Nose, S. Rosenkranz, and W.H. Zimmermann. 2010. PDGF-BB protects cardiomyocytes from apoptosis and improves contractile function of engineered heart tissue. *J Mol Cell Cardiol.* 48:1316-1323.
- Verheule S, E. Wilson, S. Banthia, TH Everett 4th, S. Shanbhag, HJ. Sih, J. Olgin. 2004. Direction-dependent conduction abnormalities in a canine model of atrial fibrillation due to chronic atrial dilatation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(2):H634-44.
- Webster, K.A., D.J. Discher, and N.H. Bishopric. 1993. Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 268:16852-16858.
- Wieselthaler, G.M., O.D. G, P. Jansz, A. Khaghani, and M. Strueber. 2010. Initial clinical experience with a novel left ventricular assist device with a magnetically levitated rotor in a multi-institutional trial. *J Heart Lung Transplant.* 29:1218-1225.
- Wu J, M. Biermann, M. Rubart, DP. Zipes. 1998. Cytochalasin D as excitation-contraction uncoupler for optically mapping action potentials in wedges of ventricular myocardium. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 9(12):1336-47.

- Ypma, J.F. 1972. Adaptation of refractory period of rat ventricle to changes in heart rate. *Am J Physiol.* 223:894-897.
- Zhuang, J., K.A. Yamada, J.E. Saffitz, and A.G. Kleber. 2000. Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes. *Circ Res.* 87:316-322.
- Zimmer, D.B., C.R. Green, W.H. Evans, and N.B. Gilula. 1987. Topological analysis of the major protein in isolated intact rat liver gap junctions and gap junction-derived single membrane structures. *J Biol Chem.* 262:7751-7763.
- Zimmermann, W.H., C. Fink, D. Kralisch, U. Remmers, J. Weil, and T. Eschenhagen. 2000. Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng.* 68:106-114.
- Zimmermann, W.H., K. Schneiderbanger, P. Schubert, M. Didié, F. Münzel, J.F., Heubach, S. Kostin, W.L. Neuhuber and T. Eschenhagen. 2002. Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res.* 90:223-230.
- Zimmermann, W.H., I. Melnychenko, G. Wasmeier, M. Didie, H. Naito, U. Nixdorff, A. Hess, L. Budinsky, K. Brune, B. Michaelis, S. Dhein, A. Schwoerer, H. Ehmke, and T. Eschenhagen. 2006. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med.* 12:452-458.
- Zimmermann, W.H. 2008. [Heart tissue from embryonic stem cells]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 51:1021-1025.
- Zimmermann, W.H. 2009. Remuscularizing failing hearts with tissue engineered myocardium. *Antioxid Redox Signal.* 11:2011-2023.
- Zimmermann, W.H. 2011. Embryonic and embryonic-like stem cells in heart muscle engineering. *J Mol Cell Cardiol.* 50:320-326.
- Zoidl, G., and R. Dermietzel. 2010. Gap junctions in inherited human disease. *Pflugers Arch.* 460:451-466.

## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Hubertus Zimmermann und Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe und Betreuung der Promotionsarbeit mit diesem sehr interessanten und herausfordernden Thema. Weiterhin danke ich für die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion sowie für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen und insbesondere für die geduldige Korrektur dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Bijoy Chandapillai Karikkineth für die praktische Anleitung und Einführung in das gesamte Projekt, insbesondere die EHT-Generierung, -Kultivierung und -Kontraktionskraftmessungen sowie in die RNA- und Proteinbestimmungen.

Ich bedanke mich bei Monika Nose, Malte Tiburcy, Michale Didié, Stephan Döker, Arne Hansen, Marlene Bönstrup, Sebastian Schaaf und Alexandra Eder für ihre Hilfe, Unterstützung und tolle Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Sander Verheule (Maastricht) für seine großzügige Hilfe bei den Experimenten des *optical mappings*.

Ich danke meinen Eltern sowie Barbara und Peter, meinen Geschwistern Helena, Maximilian und Johannes sowie Esther, Yang-Sin und Arved für Ihre immerwährende, uneingeschränkte Unterstützung und Rückhalt während der Doktorarbeit und des Studiums.

Mein besonderer Dank gilt Lea für ihre Liebe und Geduld.

## **9. Lebenslauf**

**entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**

## **10. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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.

Hamburg, den 02. März 2014