

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle Pharmakologie und
Toxikologie

Institutsdirektor:

Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Funktionelle Optimierung und Ausreifung von künstlichem Herzmuskelgewebe durch kontinuierliche elektrische Stimulation

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Paul Jasper Simon Boeddinghaus
aus Hamburg

Hamburg 2014

Diese Arbeit wurde in Form eines Stipendiums unterstützt von der

WERNER OTTO STIFTUNG
STIFTUNG DES BÜRGERLICHEN RECHTS

zur Förderung des medizinisch-wissenschaftlichen Nachwuchses an der
Universität Hamburg

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Dr. Marc N. Hirt

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät am: 16.03.2015

Veröffentlicht mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

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

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Erkrankungen des Herzens	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie, Klinik und Therapieansätze	2
1.2	<i>Engineered Heart Tissue</i> (EHT)	4
1.2.1	Entwicklung des „ <i>Tissue Engineering</i> “	5
1.2.2	Dauerhafte elektrische Stimulation (<i>Pacing</i>) von EHTs	8
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Materialien	13
2.2	Geräte und Hilfsmittel	14
2.3	Chemikalien und Lösungen	15
2.3.1	Allgemein	15
2.3.2	Arbeitslösungen für den Gewebeaufschluss der Rattenherzen	17
2.3.3	Primärantikörper	17
2.3.4	Sekundärantikörper	18
2.3.5	Primerliste	18
2.4	Tierhaltung	20
2.5	Gewinnung der Zellen zur Herstellung von EHTs	20
2.5.1	Gewinnung von Herzzellen neugeborener Ratten	20
2.5.1.1	Organentnahme	20
2.5.1.2	Enzymatischer Gewebeaufschluss	20
2.5.2	Gewinnung von Kardiomyozyten aus humanen iPS-Zellen	22
2.6	Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	22
2.7	Herstellung von EHTs im <i>24-Well</i> -Format	23
2.8	Herstellung von <i>Pacing</i> -Einheiten	27

2.8.1	Draht-Elektroden mit Kunststoff-Gerüst.....	27
2.8.2	Carbon-Elektroden mit Messing-Gerüst	28
2.8.3	Carbon-Elektroden mit Edelstahl-Gerüst.....	29
2.9	Morphologie	31
2.10	Histologie	31
2.10.1	Herstellung histologischer Präparate	31
2.10.2	Entparaffinieren.....	32
2.10.3	Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)	33
2.10.4	Immunhistochemie	33
2.10.5	Immunfluoreszenz.....	34
2.11	Elektronenmikroskopie	35
2.12	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.12.1	Isolation von RNA: <i>RNeasy Kit</i> (Qiagen).....	36
2.12.2	Reverse Transkription	37
2.12.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	37
2.12.4	<i>Affymetrix-Gene-Array</i>	38
2.13	Video-optische Messungen von EHTs	39
2.14	<i>Pacing</i> von künstlichem Herzgewebe.....	43
2.14.1	Parameter für die Stimulation von rEHTs.....	44
2.14.2	Parameter für die Stimulation von hEHTs	44
2.15	Langzeit- <i>Pacing</i> von EHTs.....	45
2.16	Chemische Analyse des EHT-Mediums.....	45
2.17	Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) und Stimulation mit Isoprenalin.....	46
2.17.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK)	46
2.17.2	Stimulation mit Isoprenalin	48
2.18	Statistische Auswertungen	48
3	ERGEBNISSE.....	49

3.1	<i>Pacing</i> von künstlichem Herzgewebe.....	49
3.1.1	Etablierung eines Protokolls.....	49
3.1.1.1	Material.....	49
3.1.1.2	Toxizität	50
3.1.1.3	Spannung, Frequenz und Impulsdauer für rEHTs	52
3.1.1.4	Spannung, Frequenz und Impulsdauer für hEHTs	55
3.2	Stimulation von rEHTs.....	56
3.2.1	Funktionelle Parameter	56
3.2.1.1	Kräfte	56
3.2.1.2	Frequenzen	58
3.2.2	Morphologische Veränderungen	60
3.2.3	Histologie	61
3.2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	61
3.2.4	Immunhistochemie	62
3.2.4.1	Myosin-Leichte-Kette-2-atrial (MLC-2a) und -2-ventrikulär (MLC-2v).....	63
3.2.4.2	Connexin-43	65
3.2.5	Konfokalmikroskopie	66
3.2.6	Multiphoton-Mikroskopie	67
3.2.7	Elektronenmikroskopie	68
3.2.8	Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) und Stimulation mit Isoprenalin.....	70
3.2.9	DNA-/RNA-Technologien	72
3.2.10	Affymetrix-Gene-Array.....	72
3.3	Stimulation von humanen EHTs.....	74
3.3.1	Funktionelle Parameter	74
3.3.1.1	Kräfte.....	74
3.3.1.2	Weitere funktionelle Parameter	75

3.3.2	Histologie	75
3.3.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	76
3.3.3	Immunhistochemie	76
3.3.3.1	Myosin-Leichte-Kette-2-atrial (MLC-2a) und -ventrikulär (MLC-2v)	76
3.3.3.2	Connexin-43	78
3.3.4	Elektronenmikroskopie	78
4	DISKUSSION.....	79
4.1	Das Grundprinzip	79
4.2	Das Modell der künstlichen Herzmuskelgewebe (EHT)	79
4.3	Morphologische Eigenschaften des <i>Engineered Heart Tissues</i>	80
4.4	Entwicklung eines <i>Pacing</i> -Modells	80
4.4.1	Wahl des richtigen Materials	81
4.4.2	Video-optische Messungen	82
4.4.3	Etablierung eines <i>Pacing</i> -Protokolls.....	82
4.5	Ausreifung des künstlichen Herzmuskelgewebes	83
4.5.1	Funktionelle und physiologische Optimierung	83
4.5.2	Morphologie und strukturelle Veränderungen	84
4.5.3	Genomweite Expressionsanalyse	85
4.6	Vergleich des neuen Modells mit bereits bestehenden Ansätzen	86
4.7	Ausblick.....	89
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	93
7	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	99
8	DANKSAGUNG.....	101
9	LEBENS LAUF.....	102

Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.	Abbildung
AD	Außendurchmesser
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat

B

BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
bpm	<i>Beats per minute</i> , Schläge pro Minute

C

CEE	<i>Chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
cDNA	Komplementäre DNA
CP-P	<i>Continuous Paced – Paced</i> , kontinuierlich stimuliert, während der Messung mit Stimulation
CP-S	<i>Continuous Paced – Spontaneous</i> , kontinuierlich stimuliert, während der Messung keine Stimulation
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CV	<i>Contraction velocity</i> , Kontraktionsgeschwindigkeit

D

d	<i>Day</i> , Tag
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

E

EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration, bei welcher der halbmaximale Effekt beobachtet wird
EHT	<i>Engineered heart tissue</i> , künstliches Herzgewebe
ES	Embryonale Stammzellen
EZM	Extrazellulärmatrix

F

FC	<i>Fold change</i> , das Vielfache
For	<i>Forward</i> , 5'-3' Primer
FKS	Fötales Kälberserum

G

Gusb	Glucuronidase B
------	-----------------

H

h	<i>hour</i> , Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
HS	<i>Horse serum</i> , Pferdeserum
Hz	Hertz, Schläge pro Minute: s ⁻¹

I

ID	Innendurchmesser
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
iPS	Induzierte Pluripotente Stammzellen

K

Ktrl	Kontrolle
------	-----------

L

LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> , Lipoprotein niederer Dichte
-----	--

M

M	mol/l
min	Minute
MLC-2a	<i>Myosin light chain 2 atrial</i> , Myosin-Leichte-Kette-2-atrial
MLC-2v	<i>Myosin light chain 2 ventricular</i> , Myosin-Leichte-Kette-2-ventrikulär
mN	Millinewton
mRNA	<i>messenger-ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunden

N

n	Anzahl der untersuchten Proben, Replikate
N	Newton, Kraft: $1 \text{ kg} \times \text{m} \times \text{s}^{-2}$
NaCl	Natriumchlorid

P

p	p-Wert, Signifikanzniveau
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i> , Perkutane Koronarintervention
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PMMA	Polymethylmethacrylat, Plexiglas
PPG	PCR-Produkt-Größe
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTFE	Polytetrafluorethylen,

Q

qPCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i> , quantitative Echtzeit-PCR
------	---

R

r	Radius
RefSeq	<i>NCBI Reference Sequence</i>
Rev	<i>Reverse, 3'–5' Primer</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT-qPCR	Reverse-Transkriptions-quantitative-Echtzeit-PCR
RV	<i>Relaxation velocity</i> , Relaxationsgeschwindigkeit

S

sek	Sekunde
s	Sekunde
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
Serca2a	Sarco/endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase 2, Typ P-ATPase

T

Tab.	Tabelle
T ₁	Kontraktionszeit
T ₂	Relaxationszeit
T ₃	Triiodthyronin

U

UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
-----	--

V

V	Volt, Einheit der Spannung
---	----------------------------

W

w/o	<i>without</i> , ohne
-----	-----------------------

1 EINLEITUNG

1.1 Erkrankungen des Herzens

1.1.1 Epidemiologie

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems stellen heutzutage weltweit die häufigste Todesursache dar. Insbesondere in den Industrienationen der westlichen Welt steht die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen an erster Stelle. In Deutschland waren im Jahre 2011 Krankheiten des Kreislaufsystems mit 342.233 Todesfällen (40,2%) die häufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt 2012). Gründe hierfür sind hinreichend bekannt. Eine geringe physische Aktivität, Stress, schlechte Ernährung und Nikotinkonsum sind nur einige der Risikofaktoren, die ihren Beitrag zur Manifestation einer Herzkreislauf-Erkrankung leisten. Zudem spielt das Alter eine wesentliche Rolle. 92% der in 2011 an Herzkreislauf-Erkrankungen verstorbenen Menschen waren 65 Jahre oder älter (Statistisches Bundesamt 2012). Die Erkrankung des Herzens mit der höchsten Sterblichkeitsrate ist die chronische ischämische Herzkrankheit (70.557 Fälle, 8,3% aller Todesfälle), knapp gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (52.113 Fälle, 6,1%) sowie der Herzinsuffizienz (45.428, 5,3%; vgl. Abb. 1.1; Statistisches Bundesamt 2012). In der Summe hat die Gesamtzahl der akuten Koronareignisse seit 1985 um 24% bei Männern und um 22% bei Frauen abgenommen; nach wie vor treten zwei Drittel der männlichen vor und zwei Drittel der weiblichen Herzinfarkt ereignisse nach dem 75. Lebensjahr auf. Die positiven Veränderungen der letzten Jahre sind hauptsächlich als Ergebnis einer erfolgreichen Akut- und Langzeittherapie nach Herzinfarkt zu interpretieren. Da immer noch 35% aller Patienten den ersten Postinfarkttag nicht überleben und bei bis zu 90% der Patienten die klassischen Risikofaktoren (siehe unten) vorhanden waren, bleibt die Intensivierung der Primärprävention das Thema Nummer eins (Löwel et al. 2006).

1 Einleitung

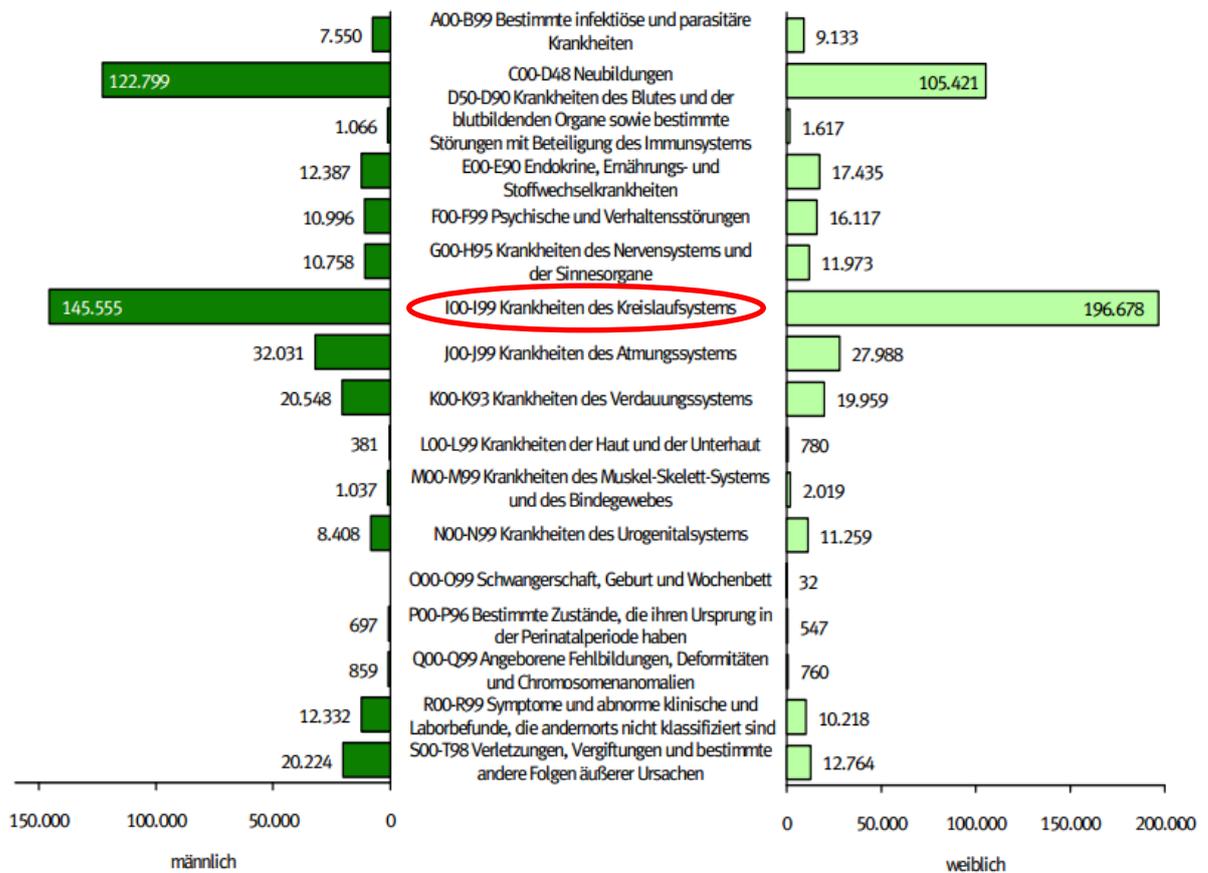


Abb. 1.1: Vergleich der Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland 2011. Geschlechterspezifische Aufschlüsselung der Todesursachen in der Bundesrepublik 2011 nach ICD-Klassifikation. Aus der Pressemitteilung des statistischen Bundesamtes vom 6. Dezember 2012 – 425/12.

1.1.2 Ätiologie, Klinik und Therapieansätze

Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren zählen hohes Alter, männliches Geschlecht (Männer sind häufiger betroffen als Frauen), Übergewicht (insbesondere das abdominelle Fett), arterieller Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nikotinkonsum, fettreiche Ernährung, mangelnde physische Aktivität sowie eine positive Familienanamnese und psychosozialer Stress. Kardioprotektiv hingegen wirkt vermutlich der tägliche Konsum geringer Mengen an Alkohol (Anand et al. 2008).

Erkrankungen des Herzens gehen letztlich alle mit einer inadäquaten Leistung des Herzens einher. Die Blut- und damit die Sauerstoffversorgung der inneren Organe sowie der Peripherie sind nicht mehr in ausreichendem Maße gewährleistet. Die Ursachen hierfür sind, je nach Grunderkrankung des Herzens, unterschiedlich. Bei einer ischämischen Myokarderkrankung erfolgt die Minderversorgung des Herzens

1 Einleitung

aufgrund einer Minderperfusion. Diese lässt sich auf eine Obstruktion der Herzkranzgefäße durch atherosklerotische Veränderungen zurückführen. Es kommt zur Entstehung einer Koronaren Herzkrankheit (KHK). Innerhalb der Koronargefäße entstehen sogenannte Plaques, die beim Aufbrechen zur Entstehung eines Thrombus und somit zum Verschluss ganzer Gefäße führen können (s.u.). Abgeschwemmte Thromben können zu Embolien führen. Beide Fälle resultieren in einer Minderperfusion des distal vom Verschluss gelegenen Myokards, sodass gesundes Herzgewebe untergeht und ein Herzinfarkt entsteht (Thygesen et al. 2007). Der Verschluss von Herzkranzgefäßen beim Myokardinfarkt vor dem Hintergrund atherosklerotischer Prozesse ist ein noch nicht hinreichend geklärt Prozess. Eine mögliche Theorie besagt, dass es zunächst zu Mikrorupturen in der Intima und den dazugehörigen Endothelzellen der großen (Makroangiopathie) und kleinen (Mikroangiopathie) Arterien kommt. In diesen Einrissen sammeln sich Blutfette (Cholesterine), insbesondere aber das *Low Density Lipoprotein* (LDL). Diese locken Makrophagen an, welche das Cholesterin mittels Phagozytose aufnehmen. Durch eine Behinderung des Abbaus kommt es zum Absterben der Makrophagen, wodurch sie zu sogenannten Schaumzellen werden. Ebenfalls eine Rolle spielen inflammatorische Zellen, die über zelluläre Adhäsionsmoleküle, die sowohl am vaskulären Endothel als auch auf zirkulierenden Leukozyten sitzen, angelockt werden und zur Entstehung der Atherosklerose und schließlich zur ischämischen Herzkrankheit beitragen (Blankenberg et al. 2003). Zum jetzigen Stand der Wissenschaft kann nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, ob es Zellen gibt, die nach einem Herzinfarkt neues Herzgewebe bilden oder sich in Kardiomyozyten differenzieren können. Auf der einen Seite wird postuliert, dass Stammzellen oder Vorläuferzellen das Potential haben, abgestorbenes Gewebe durch Neubildung zu ersetzen (Hsieh et al. 2007) oder dass es zu einer Neubildung durch Zellteilung von Kardiomyozyten kommt (Senyo et al. 2013). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass sogenannte Islet-1-positive Zellen nicht als Vorläuferzellen für Kardiomyozyten, wie zunächst angenommen, zu bewerten sind (Weinberger et al. 2012).

In vielen Fällen mündet eine chronische Herzerkrankung in einer Herzinsuffizienz. Hierbei kommt es zu systolischen und diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen mit einer verminderten Auswurfleistung des Herzes und einer verminderten Compliance

1 Einleitung

und damit einhergehend einer geringeren Füllung der Kammern. Bevor sich eine Herzinsuffizienz manifestiert, kann es zu einer Hypertrophie des Herzens kommen. Das Herz versucht durch eine Zunahme des Zellvolumens der Herzzellen (Kardiomyozyten) die physiologische Funktion aufrechtzuerhalten. Dies schafft es allerdings nur bis zu einem gewissen Schweregrad der Beeinträchtigung. Funktionelle und morphologische Veränderungen sind die Folge. Das Herz dilatiert und ist nicht mehr in der Lage, genug Blutvolumen in den Körperkreislauf zu pumpen mit der Folge, dass das Herzzeitvolumen nicht aufrechterhalten werden kann und der Herzindex (ein Parameter zur Beurteilung der Herzleistung; l/min/m²) sinkt. Zudem fibrosieren Teile des Herzens. Es kann zu gefährlichen Arrhythmien sowie zum plötzlichen Herztod kommen. Ist es erst einmal zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz gekommen, so ist diese nicht mehr vollständig reversibel (Frey et al. 2004). Einer Progredienz der Erkrankung kann man mit einer medikamentösen Therapie mit β -Blockern, ACE-Hemmern und Aldosteronantagonisten entgegenwirken, der Symptomatik mit Diuretika. Neueste Ergebnisse haben gezeigt, dass die Hemmung des Angiotensin-1-Rezeptors und der Endopeptidase Nephilysin durch den dualen Inhibitor LCZ696 im Vergleich zu Enalapril (ACE-Hemmer) zu einer geringeren Hospitalisationsrate und Mortalität von Patienten mit Herzinsuffizienz führt (McMurray et al. 2014).

1.2 **Engineered Heart Tissue (EHT)**

Unter *Engineered Heart Tissues* (EHTs) versteht man *in vitro* hergestellte dreidimensionale funktionale Herzgewebe. Sowohl die Morphologie der Gewebe (ringförmig, quadratisch, bikonkav-länglich) als auch die Herkunft der verwendeten Herzzellen (Ratte, Maus, embryonale Stammzellen, humane iPS-Zellen) sowie die Methodik ihrer Herstellung (siehe 1.2.1) sind variabel.

Aufgrund ihrer Dreidimensionalität verfügen EHTs über physiologischere Zell-Zell-Interaktionen. Eine Kontraktion der Gewebe ist in allen Ebenen möglich, wodurch sie nativem Herzgewebe um einiges ähnlicher sind als auf Plastikschaalen kultivierte Herzmuskelzellen. Wie oben beschrieben ist es weiterhin unklar, inwiefern untergegangenes Myokard nach einem Herzinfarkt zur partiellen Regeneration fähig ist. Das langfristige Ziel bei der Herstellung von künstlichem Herzgewebe ist daher dessen klinischer Einsatz zur Unterstützung von infarziertem und untergegangenen Myokard.

1.2.1 Entwicklung des „*Tissue Engineering*“

Der Begriff des „*Tissue Engineering*“ wurde erstmals 1987 von Mitgliedern der *US National Science Foundation* (NSF) in Washington D.C. eingeführt. Ein Jahr später definierten sie auf einer von der NSF organisierten Konferenz in *Lake Tahoe*, Kalifornien, den Begriff „*Tissue Engineering*“ wie folgt: „*Application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure–function relationship in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain, or improve functions*“ (Eschenhagen und Zimmermann 2005).

Die ersten künstlich generierten dreidimensionalen Herzgewebe wurden allerdings lange Zeit vor der Definition des „*Tissue Engineering*“ hergestellt. Ende der 1950er Jahre generierte Moscona Aggregate aus Herzzellen embryonaler Hühner, indem er frisch isolierte Zellen in sich drehenden Erlenmeyerkolben kultivierte (Moscona 1959). Es dauerte nur wenige Stunden, bis sich Aggregate mit bis zu 200 Zellen bildeten. Das Modell wurde vielfach adaptiert und viele Forscher kamen zu der Erkenntnis, dass die dreidimensionalen Konstrukte dem nativen Herzgewebe funktionell um einiges ähnlicher waren als zweidimensionale *Monolayer*-Kulturen. Durch diese frühen Arbeiten konnte bewiesen werden, dass isolierte Zellen aus unreifen Herzen die Fähigkeit behalten, Herz-ähnliche Gewebe unter bestimmten Kulturbedingungen zu bilden (Eschenhagen und Zimmermann 2005).

Im September 1994 wurden durch Eschenhagen erste Schritte auf dem Gebiet des *Cardiac Tissue Engineering* mit der Herstellung von EHTs gemacht. Ventrikelzellen von neun bis elf Tage alten Hühnerembryos wurden durch Zellverdau gewonnen und anschließend in einer Matrix aus Kollagen I zu EHTs gegossen (Eschenhagen et al. 1997). Wenige Jahre später kam es zur Herstellung von Konstrukten aus Herzzellen von Rattenembryonen (16 Tage post conceptionem). Nach der Gewinnung der Zellen wurde eine definierte Anzahl auf einem Grundgerüst aus Alginat kultiviert (Leor et al. 2000). Ein weiterer Ansatz sah vor, isolierte Kardiomyozyten auf einem thermosensitiven Kunststoff zu kultivieren, der eine temperaturabhängige Ablösung der Kardiomyozytenschicht ermöglichte. Durch Schichtung mehrerer „Kardiomyozytenteppiche“ übereinander konnte dann ein dreidimensionales Gewebe generiert werden, welches untergangenes Herzgewebe potenziell durch

1 Einleitung

Transplantation ersetzen könnte (Shimizu 2002). Bei einer vollkommen anderen Herangehensweise wurden Rattenherzen durch antegrade Koronarperfusion mit drei unterschiedlichen Lösungen dezellularisiert, sodass lediglich das Gerüst des Herzens erhalten blieb. Dieses diente dann als natürliche Matrix und konnte mit neu gezüchteten Herzzellen besiedelt werden. Vorteil dieses Verfahrens war, dass die Herzzellen in ihrer natürlichen Umgebung blieben. Die Perfusion des Herzens war fortbestehend, sodass die neu eingebetteten Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wurden und kein artifiziiell hergestellter Bioreaktor mit Nährmedien von Nöten waren (Ott et al. 2008). In weiteren Studien wurde auf die Einbettung von Kardiomyozyten in Matrices gesetzt, wie es schon von Eschenhagen et al. (2007) praktiziert wurde. Möglichkeiten bestanden hierbei im Einsatz von aggregationsfähigen Substanzen wie Kollagen I und Matrigel (Zimmermann et al. 2000), in der alleinigen Verwendung von Matrigel (Morritt et al. 2007) sowie von Fibrin (Hansen et al. 2010). Die Herzzellen wurden mit den jeweiligen Substanzen vermischt. Durch Aggregation kam es zur Ausbildung gelartiger Konstrukte. Das Gel ermöglichte die Perfusion vom Nährmedium zu den Zellen, es gewährleistete die Entstehung von Zell-Zell-Interaktionen und erlaubte durch seine Flexibilität Kontraktionen des gesamten Gewebes.

Bevor an eine Transplantation der funktionalen Konstrukte zu denken ist, muss es zur Etablierung standardisierter und stabiler Kulturbedingungen kommen. Diesbezüglich zeigt das von Hansen et al. (2010) publizierte Protokoll zur Herstellung Fibrin-basierter EHTs viele Vorteile: Durch den Einsatz von Fibrinogen und Thrombin kommt es innerhalb weniger Minuten zur Aggregation und Bildung von Fibrin. Die eingebetteten Zellen haben somit keine Zeit, um abzusinken. Daraus resultiert eine deutlich gleichmäßigere Verteilung der Kardiomyozyten in der Gel-Matrix (im Gegensatz zu den Zellen in den Gel-Matrices aus Kollagen I und Matrigel). Durch die Aufhängung der Konstrukte zwischen zwei Silikonvorrichtungen kommt es zur Entstehung eines dauerhaften Widerstandes, gegen den die EHTs bei jeder Kontraktion Arbeit verrichten müssen. Die Kardiomyozyten orientieren sich entlang der dadurch entstehenden Kraftlinien innerhalb des EHTs und richten sich somit longitudinal aus. Darüber hinaus werden die EHTs in standardisierter Weise in 24-Well-Zellkulturschalen kultiviert. Durch die Herstellung eines auf dieses Format angepassten Analyse-Systems ist es möglich, exakte video-optische Aufnahmen zur

1 Einleitung

Bestimmung etlicher kontraktile Parameter durchzuführen. Eine Vielzahl an Untersuchungen, zum Beispiel von Arzneimittelwirkungen auf das künstliche Herzgewebe, können somit realisiert werden (Hansen et al. 2010). Ein weiteres Beispiel zur Anwendbarkeit der EHTs zeigte die Entwicklung von Hirt et al. (2012): Durch Modifikation des etablierten EHT-Modells wurde ein Protokoll zur Nachlasterhöhung und der damit einhergehenden pathologischen Hypertrophie der Herzgewebe realisiert. Sowohl funktionell als auch molekularbiologisch (Transkriptom) und histologisch zeigten sich hierbei Veränderungen, wie sie auch *in vivo* bei pathologischer kardialer Hypertrophie zu sehen sind (Hirt et al. 2012).

Ein nächster Meilenstein des *Cardiac Tissue Engineering* war die Herstellung von künstlichem Herzgewebe aus menschlichen embryonalen und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen; Zhang et al. 2009; Schaaf et al. 2011; Tulloch et al. 2011; Streckfuss-Bömeke et al. 2013). Seit es zum ersten Mal gelungen ist, ausdifferenzierte Zellen (Hautzellen, Fibroblasten) zu induzierten pluripotenten Stammzellen zu reprogrammieren, ist die Herstellung von humanem künstlichem Herzgewebe durch Ausdifferenzierung der Stammzellen zu Kardiomyozyten immer weiter in den Fokus der Wissenschaft gerückt (Takahashi et al. 2007). Die Verwendung von humanen EHTs ermöglicht neben der Toxizitätsanalyse neuer Medikamente auch die gezielte Überexpression oder den *Knock-Out* interessanter menschlicher Gene, die untersucht werden sollen (Schaaf et al. 2011). Kann man EHTs, die aus Rattenherzen produziert wurden, aufgrund der Abstoßungsgefahr keinesfalls in einen menschlichen Organismus transplantieren, so ergibt sich theoretisch durch die Herstellung von künstlichem Herzgewebe aus iPS-Zellen die Möglichkeit, humane autologe EHTs in Form eines *Patches* zu verwenden, um infarziertes und arbeitsunfähiges Myokard zu ersetzen beziehungsweise dessen Restfunktion zu unterstützen. Zusammenfassend verfügt das *Tissue Engineering* heutzutage über das Potential, ergänzende Informationen bei *in vitro* durchgeführten Medikamentenstudien beizutragen oder auch anhand der künstlichen Gewebe Krankheitsmodelle zu studieren sowie untergegangenes Herzgewebe potenziell zu ersetzen (Hirt et al. 2014).

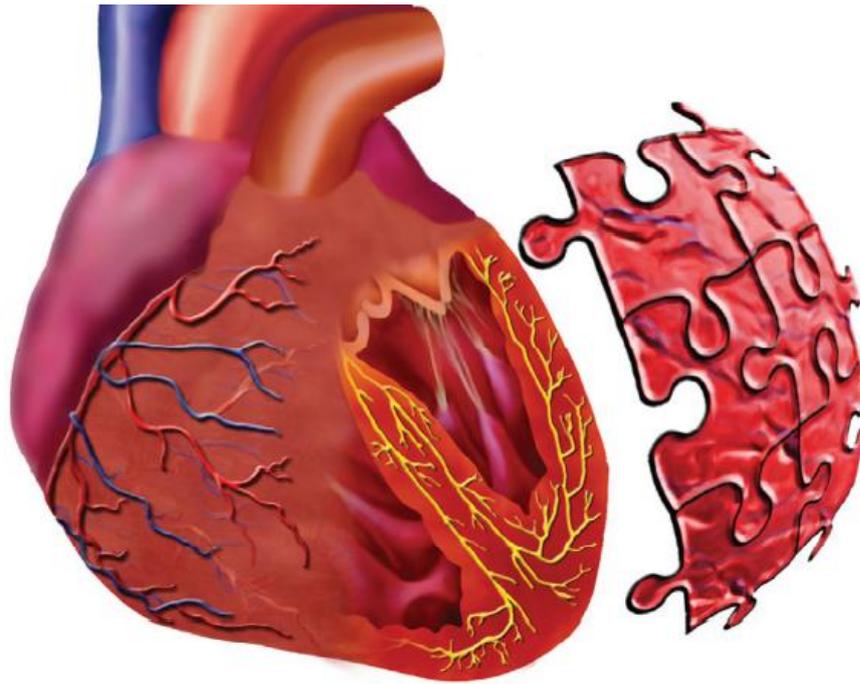


Abb. 1.2: Abstrakte graphische Darstellung einer kardialen Gewebstransplantation. Wie ein „Puzzleteil“ könnten neu hergestellte *Patches* zerstörtes Herzgewebe ersetzen. Nach Vunjak-Novakovic et al. (2011).

1.2.2 Dauerhafte elektrische Stimulation (*Pacing*) von EHTs

Die heutzutage hergestellten EHTs unterscheiden sich in Bezug auf Morphologie, Funktionalität und Physiologie noch erheblich von nativem Herzgewebe. Ein Grund dafür sind die unreifen Eigenschaften, die die künstlichen Gewebe aufweisen und von denen einige im Folgenden dargestellt werden. Im Vergleich zum physiologisch intakten Herzen, schlagen die nach Hansen et al. (2010) hergestellten Ratten-EHTs (rEHTs) spontan, jedoch zum Teil arrhythmisch und mit Pausen. Der Grund für dieses Phänomen ist nach wie vor ungeklärt, jedoch entscheidend, da ausgereifte ventrikuläre Kardiomyozyten einen Stimulus benötigen, um adäquat zu schlagen und Leistung zu bringen. Ein weiteres Zeichen der mangelnden Ausreifung der Konstrukte ist die geringe Kraftentwicklung. Frisch isoliertes humanes Muskelgewebe erreicht eine Kraft von über 50 mN/mm^2 (van der Velden et al. 1998), während EHTs aus Rattenherzzellen selten mehr als 1 mN/mm^2 erreichen (sehr dünne Konstrukte teilweise über 5 mN/mm^2). Humane EHTs zeigen sogar eine noch geringere Kraftentwicklung, auch wenn die Gruppe von Bursac kürzlich von höheren Kräften berichtete (Zhang et al. 2013).

1 Einleitung

Untersucht man die Wirkung steigender externer Kalzium-Konzentrationen auf die Kraftentwicklung von Ratten-EHTs, zeigt sich, dass diese ihre maximale Kraft schon bei sehr geringen Kalzium-Konzentrationen erreichen. Es besteht also eine Hypersensitivität gegenüber dem externen Kalzium mit einer EC_{50} (= mittlere effektive Konzentration, bei welcher der halbmaximale Effekt beobachtet wird) von 0,15 mM und 1,05 mM in rEHTs und hEHTs (Stoehr et al. 2014). Demgegenüber stehen Werte von 2,1 mM (Harding et al. 1988) und 3,0 mM (Cain et al. 1998) in adulten Ratten- und humanen Muskelstreifen. Auch diese Tatsache, so wird vermutet, ist dem unreifen Zustand der EHTs geschuldet (Hansen et al. 2010; Tulloch et al. 2011; Hirt et al. 2012).

Die einfachste Idee zur Ausreifung der Herzgewebe ist Abwarten. Die Kultivierung sowohl von Ratten- als auch von humanen Geweben führt mit der Zeit (einige Monate) zu einer gesteigerten Maturierung (Tiburcy et al. 2011; Eschenhagen et al. 2012). Dieser Prozess wird dadurch erleichtert, dass die Kardiomyozyten innerhalb der dreidimensionalen Konstrukte mit Fibroblasten und extrazellulärer Matrix interagieren können (Zeng et al. 2013) und die biomechanischen Bedingungen vorteilhaft sind (Tulloch et al. 2011; Hirt et al. 2012). Allerdings ist eine solch lange Kultivierung arbeitsintensiv, teuer und erhöht das Risiko von Infektionen. Kulturzusätze wie Triiodthyronin (T3; Naito et al. 2006), Neuregulin-1 β (Zhu et al. 2010) oder der *Insulin-like growth factor* (IGF; McMullen et al. 2004) und hohe Sauerstoffkonzentrationen (Carrier et al. 2002; Zimmermann et al. 2006) unterstützen die Ausreifung ebenfalls. Ein weiterer Ansatz ist die dauerhafte elektrische Stimulation, das sogenannte *Pacing*, der EHTs. Elektrische Felder mit Feldstärken im Bereich von 0,01-2 V/cm scheinen auch in natürlichen Geweben eine wichtige Rolle zu spielen (Nuccitelli 1992). Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine kontinuierliche Erregung der Gewebe mit Kontraktions- und Relaxationsphasen der physiologische Zustand des Herzens simuliert wird, wodurch es innerhalb der EHTs zu einer longitudinalen Anordnung der Myozyten, sowie einer besseren Zell-Zell-Interaktion durch einen Anstieg der Expression von Connexin-43 kommt (Radisic et al. 2004; Lasher et al. 2012). In dem von Tandon et al. (2009) publizierten Protokoll zur elektrischen Stimulation künstlich hergestellten Herzgewebes erfolgt das *Pacing* über einen externen Stimulator, der über Platindrähte elektrische Impulse an zwei sich gegenüberliegende Carbon-Elektroden

1 Einleitung

abgibt, zwischen denen dreidimensionale Herzgewebe liegen. Eine wichtige Voraussetzung für die dauerhafte Stimulation von künstlichem Herzgewebe ist neben der richtigen Frequenz, der Dauer der Impulse und der Höhe der Spannung, die Wahl des richtigen Elektrodenmaterials. Im Vergleich zu den Materialien Titan, Stahl und mit Titannitrid beschichtetem Titan zeigt Graphit (Carbon) die besten Eigenschaften. Es ist resistent gegenüber chemischen Reaktionen, die bei elektrischer Stimulation im Medium auftreten können und zeigt eine geringe Korrosion. Außerdem weist es eine absorbierende Wirkung auf, sodass insbesondere toxische Oxidationsprodukte der hypochlorigen Säure (HClO), die beim *Pacing* anfallen, vom Graphit aufgenommen und die Gewebe geschützt werden können.

Reaktionsgleichungen zur Entstehung hypochloriger Säure (HClO) durch Elektrolyse:

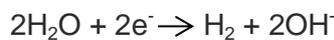
Reaktionen an der Kathode:



Reaktion an der Anode:



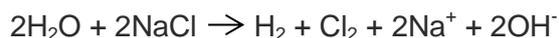
Gesamtreaktion im Kathodenraum:



Gesamtreaktion im Anodenraum:



Gesamtreaktion in der Lösung:



Die Hydroxidionen reagieren schließlich mit dem Chlorgas und bilden Hypochloritionen, die in der Lösung als hypochlorige Säure vorliegen:



In keiner der bisher durchgeführten Studien wurde untersucht und objektiviert, inwiefern sich die Kraft der EHTs durch das kontinuierliche *Pacing* verändert, noch wurde darauf eingegangen, wie sich die Spontanfrequenz der Konstrukte, die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten sowie die Kontraktions- und Relaxationszeiten unter Stimulation verhalten. Bisher bleibt weiterhin unklar, wie sich die Genexpression der Herzgewebe (zum Beispiel kardiale Ionenkanäle) durch das *Pacing* verändert. Unklar ist ebenfalls, ob es durch die dauerhafte Stimulation zu

1 Einleitung

einer veränderten, möglicherweise physiologischeren Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve kommt, die sich gegebenenfalls der von nativem Herzgewebe annähert. Des Weiteren ist die Frage nach der Anordnung der Zellen und der Connexine innerhalb der Konstrukte noch nicht ausreichend beantwortet.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zur dauerhaften Stimulation von künstlichem Herzgewebe zu entwickeln. Als Grundlage hierfür dienten die Fibrin-basierten EHTs im 24-Well-Format nach Hansen et al. (2010).

Folgende Fragen galt es zu beantworten:

- Lassen sich geeignete *Pacing*-Einheiten für das etablierte 24-Well-Format herstellen?
- Welches Elektroden-Material ist unter Zellkultur-Bedingungen am besten geeignet?
- Reagieren die Fibrin-basierten EHTs auf die applizierten elektrischen Impulse?
- Kann das Medienwechselprotokoll (dreimal pro Woche) trotz der Entstehung hypochloriger Säure beibehalten werden?
- Sind die Konstrukte auch nach Einsatz der *Pacing*-Einheiten mit dem video-optischen System kompatibel?
- Führt ein Langzeit-*Pacing* zur Ausreifung der künstlichen Herzgewebe?
 - Wie verändern sich die funktionellen Parameter?
 - Verändert sich das Schlagmuster und kommt es zu einer Abnahme der Spontankontraktionen?
 - Kommt es zu morphologischen Veränderungen?
 - Zeigt sich eine physiologischere Kalzium-Konzentrations-Wirkungskurve?
 - Verändert sich die Genexpression der EHTs?
 - Wie stellt sich die Anordnung der Kardiomyozyten und des Connexin-43 innerhalb des Konstruktes dar?
 - Welche ultrastrukturellen Veränderungen zeigen sich in der Elektronenmikroskopie?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Alle verwendeten Substanzen wurden mindestens mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* (analysenrein) verwendet. Materialien und Methoden beziehen sich, falls nicht explizit erwähnt, sowohl auf die Herstellung von künstlichem Herzgewebe aus Herzzellen neugeborener Ratten als auch auf die Herstellung aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen.

Material	Hersteller	Bestellnummer
Carbon CG1290	CGC Klein	CG1290
DIN 84 A2 Edelstahl Rostfrei M1 x 6 mm Zylinderkopfschraube mit Schlitz	Rosentaler Schrauben Handels GmbH	0200084010006
DIN 84 A2 Edelstahl Rostfrei M1 x 10 mm Zylinderkopfschraube mit Schlitz	Rosentaler Schrauben Handels GmbH	02000840100010
DIN 84 A2 Edelstahl Rostfrei M2 x 6 mm Zylinderkopfschraube mit Schlitz	Rosentaler Schrauben Handels GmbH	0200084020006
Edelstahl-Stangen 1.4301 3 mm x 3 mm x 79,5 mm	Koch + Krupitzer Metall- Fachgroßhandel	-
Kupferlackdraht, Ø 0,3 mm	Conrad	605348 - 62
Lötzinn, bleifrei, Ø 1 mm	Stannol	65215/456
M2 Messingmuttern, metrisch	Conrad	248778 - 05
Messingschrauben M1 x 10 mm, metrisch	Conrad	248765 - 62
Messing-Vierkant-Stange 3 mm x 3 mm x 500 mm	Conrad	297933 - 62

2 Material und Methoden

PlastiDip Flüssigkeitsisolation Farbe Schwarz 61001153 100g	Conrad	888187 - 62
Polymethylmethacrylat (PMMA; Plexiglas)	L. Buck & Sohn (GmbH & Co.) KG	-
Sechskantmuttern DIN 934 A2 Edelstahl Rostfrei M1	Rosentaler Schrauben Handels GmbH	0200934010
Schlauch hart (PTFE; AD: 4 mm, ID: 2 mm)	L. Buck & Sohn (GmbH & Co.) KG	-
Schlauch weich (Silikon; AD: 2 mm, ID: 0,5 mm)	J. Lindemann GmbH	-
VALO-SPF-Eier (Vakzine Lohmann, <i>Specific Pathogen Free</i>)	Lohmann Tierzucht GmbH	-
Zylinderschraube mit Schlitz ähnlich DIN 84, Polyamid 6.6 natur M2 x 10 mm	GHW Modellbauerversand	330084 M210

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Gerät oder Hilfsmittel	Hersteller
ABI PRISM 7900HT <i>Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems
<i>Affymetrix GeneChip® Rat Gene 1.0 ST Array</i>	Affymetrix
Analytikwaage	Sartorius AG
Basler Kamera Typ A602f	Basler
<i>Biosphere®</i> Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt
CO ₂ /O ₂ Brutschrank (Zellkultur)	Sanyo
Digitalwaage Ohaus <i>Precision Advanced</i>	Ohaus
EHT-Messsystem	eigene Herstellung, Software von CTMV
Einwegspritzen, Injekt (10 ml, 20 ml, 50 ml)	B. Braun
Elektronenmikroskop, LEO 912AB mit Omega- Energie-Filter	Zeiss
Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
<i>Fastscan</i> CCD Kamera	Tietz
<i>Femtosecond-pulsed-Titanium-Sapphire-Laser</i>	Spectra Physics

2 Material und Methoden

<i>Fluorescence System Interface</i>	IonOptix
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss
Gewebekulturplatten, 24-Well	Nunc
<i>IonOptix</i> Mehrkomponentensystem	IonOptix
Kamera, Zeiss AxioCam	Zeiss
LaVision Biotec Trim Scope Mikroskop	LaVision Biotec
Lichtmikroskop, Zeiss AxioPlan IM-35	Zeiss
Magnetrührer COMBIMAG RET	Janke & Kunkel
<i>Myocam</i>	IonOptix
<i>Nanodrop™</i> ND-1000	Thermo Fisher Scientific
Optisches Emissionsspektroskop Optima 7000 DV mit induktiv gekoppeltem Argonplasma	PerkinElmer
<i>GeneAmp® PCR System 9700</i>	Applied Biosystems
Paraffinausgießstation, Leica EG1150 H	Leica
Pipetten (serologisch), 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf/Peqlab
Pipettenspitzen	Sarstedt
Rotationsmikrotom, Leica RM2125 RTS	Leica
<i>S88X Dual Output Square Pulse Stimulator</i>	GRASS Technologies
Vortex Reax 200	Heidolph
Zentrifuge <i>Centrifuge 5415 C</i>	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon/Sarstedt

2.3 Chemikalien und Lösungen

2.3.1 Allgemein

Chemikalie oder Lösung	Hersteller	Bestellnummer
2,3-Butandionmonoxim, BDM	Roth	3494.1
Agarose (UltraPure™)	Invitrogen	15510-019
Aprotinin, 2 mg/ml (<i>Aqua ad injectabilia</i>)	Sigma-Aldrich	A1153
<i>Aqua ad injectabilia</i> (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	Baxter GmbH	001428

2 Material und Methoden

Bovines Fibrinogen, 200 mg/ml + 0,5 µg Aprotinin/mg Fibrinogen (0,9% NaCl)	Sigma-Aldrich	F8630
Desoxyribonuklease II, Typ V, Rindermilz	Sigma-Aldrich	D8764
DRAQ5 (DR50050)	Biostatus Limited	DR50200
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM, mit 1 g/l D-Glukose und 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin mit Phenolrot)	Gibco	F0415
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM, mit 584 mg/l L-Glutamin und 15 mg/l Phenolrot, ohne Glukose, HEPES und C ₃ H ₃ NaO ₃)	Gibco	11966-025
Ethanol (96%)	Geyer	2286.1000
Eukitt®	Sigma-Aldrich	03989
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Invitrogen	S0615
Glukose	Sigma-Aldrich	49159
Glutathion	Sigma-Aldrich	G4251
<i>Hanks Buffered Salt Solution, HBSS</i>	Gibco	14025050
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich	51260 / H9627
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems	4368814
Hühnerembryonenextrakt	Eigene Herstellung	-
Insulin human	Sigma-Aldrich	I9278
Isoprenalin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich	I5627
Isopropanol	Merck	107022
Kohlendioxid	Linde Gas	-
Matrigel (10%)	BD-Bioscience	356235
Methanol	Roth	HN41.2
Natriumchlorid, NaCl	Merck	106404
Natrium L-Laktat (4 mM)	Sigma-Aldrich	71718
Penicillin/Streptomycin (100x)	Gibco	10378-016 15140
Pferdeserum, Hitze inaktiviert	Gibco	26050-070
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Gibco	10010-023

2 Material und Methoden

Proteinase K, >600 mAU/ml	Qiagen	19133
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen	74104
Roti-Histofix	Roth	P087.5
<i>TaqMan® Universal PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems	4368813
Thrombin, 100 U/ml (PBS, Aqua ad injectabilia)	Sigma-Aldrich	T7513
Toluidin Blau	Chroma	-
Trypsin <i>crude extract</i>	Gibco	-

2.3.2 Arbeitslösungen für den Gewebeaufschluss der Rattenherzen

Lösung	Zusammensetzung
CBFHH	in mM: 34,2 NaCl, 5,4 KCl, 0,81 MgSO ₄ · 7 H ₂ O, 0,34 NaH ₂ HPO ₄ · H ₂ O, 5,6 Glucose, 20 HEPES pH 7,4
HEPES	[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure]
DNase-Arbeitslösung	0,5 ml P/S; 0,6 ml DNase-Stammlösung**; 1,7 ml fötales Kälberserum; 47,2 ml CBFHH.
Trypsin-Arbeitslösung	0,5 ml P/S; 1,3 ml Trypsin-Stammlösung*; 0,6 ml DNase-Stammlösung**; 47,6 ml CBFHH; Trypsin <i>crude extract</i> ; DNase II, Typ V, Rindermilz.

*Trypsin-Stammlösung: 100 mg/ml in CBFHH

**DNase-Stammlösung: 2 mg/ml in PBS

2.3.3 Primärantikörper

Verwendete Antikörper zum Nachweis von Proteinen in der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz (pk: polyklonal; mk: monoklonal; Anti-m: Anti-Maus; Anti-r: Anti-Hase (rabbit); IgG: Immunglobulin G; Alexa 488: konjugiert mit Alexa 488; Alexa 514: konjugiert mit Alexa 514; Alexa 546: konjugiert mit Alexa 546) sind im Folgenden gelistet.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
<i>α-sarcomeric actinin</i> (mk)	1:250	Sigma-Aldrich	A7811

2 Material und Methoden

Connexin-43 (mk)	1:250	BD Transduction Laboratories™	610061
4',6-diamidino-2-phenylindol, DAPI	1:1000	Sigma-Aldrich	D9542
DRAQ5	1:1000	Biostatus Limited	DR50200
Dystrophin	1:250	Millipore	MAB1645
MLC-2a	1:200	Synaptic Systems	311 011
MLC-2v	1:200	Synaptic Systems	310 111

2.3.4 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-m-IgG-Alexa 488	1:800	Molecular Probes	A-11001
Anti-r-IgG-Alexa 488	1:800	Molecular Probes	A-11008
Anti-m-IgG-Alexa 514	1:800	Molecular Probes	A-31555
Anti-r-IgG-Alexa 546	1:800	Molecular Probes	A-11035

2.3.5 Primerliste

Eingesetzte Primer in der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR).

Gen	Beschreibung	RefSeq Nummer	Primer	PPG*
Gja1	Connexin-43	NM_012567.2	For: CAGCCTCCAAGGAGTTCCACCA Rev: CCACACCTTCCCTCCAGCGG	148
Hcn4	<i>Hyper-polarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4, funny current</i>	NM_021658.1	For: GGGCCAGAGCGGCTTCATGCA Rev: CCATCAGCAACAGCATCGTCA GGT	197
Irx4	<i>Iroquois homeobox protein 4</i>	NM_00110733 0.1	For: CCCATCCTCCACACTGGCCCT Rev: ATGGCGGGCGCAGCCTAAG	139

2 Material und Methoden

Kcnn4	<i>Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4, IK-1</i>	NM_023021.1	For: GCAGGAAGCTGGCTGAGCACC Rev: TCCGATGCCAGTTCCCGCCA	150
Myl2	Myosin-Leichte-Kette-Typ-2-ventrikulär	NM_00103525 2.2	For: AGGGCGGAAGCTCCAACGTG Rev: TCGTCCGAGGGCAGCAAACG	143
Myl7	Myosin-Leichte-Kette-Typ-2-atrial	NM_00110601 7.1	For: GCAAGAGGGGAAGGGCCCA Rev: CACAACCTCCCTGGCCGCTCG	133
N2B	Titin <i>adult</i>	XM_00106595 5.4	For: CCAACGAGTATGGCAGTGTCA Rev: TGGGTTTCAGGCAGTAATTTGC	93
N2BA	Titin <i>fetal</i>	XM_00106595 5.4	For: CGGCAGAGCTCAGAATCGA Rev: GTCAAAGGACACTTCACACTCA AAA	110
Nppa	Atriales natriuretisches Peptid (ANP)	NM_012612.2	For: CCTCGGAGCCTGCGAAGGTCA Rev: TGTGACACACCGCAAGGGCTTG	156
Nppb	<i>Brain natriuretic peptide</i> (BNP)	NM_031545.1	For: GACGGGCTGAGGTTGTTTTA Rev: ACTGTGGCAAGTTTGTGCTG	195
TnnI1	Langsames skelettales Troponin I	NM_017184.1	For: CGCCATGCTCCGAGCCCTAC Rev: TGCCAGACATGGCCTCCACG	149

2 Material und Methoden

TnnI3	Kardiales Troponin I	NM_017144.1	For: CCGAGCCTATGCCACCGAGC Rev: CGTCGCTCCTCTGCCTCACG	129
Gusb	Glucuronidase B	NM_017015.1	For: CCCGCATGTCCCCAAGACGG Rev: CGGCACGGAAGCTCCACAGG	129

* PPG = PCR-Produkt-Größe

2.4 Tierhaltung

Die verwendeten Lewis- und Wistar-Ratten stammten aus eigener Zucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff®) sowie Leitungswasser gehalten. Alle Tierschutzrichtlinien wurden eingehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neugeborene (postnatal 1.-3. Tag) Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Zulassungsnummer A6/516).

2.5 Gewinnung der Zellen zur Herstellung von EHTs

Die Erschließung der Zellen zur Herstellung der EHTs ist im Folgenden zunächst für die künstlichen Herzgewebe aus Rattenherzzellen beschrieben. Anschließend wird auf die Gewebe eingegangen, die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen generiert wurden.

2.5.1 Gewinnung von Herzzellen neugeborener Ratten

2.5.1.1 Organentnahme

Die Tiere (min. 20, max. 60) wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach Spreizung der Thoraxwand wurde das Herz mit dem Gefäßstiel komplett entnommen und umgehend in eine Schale mit sterilem, eisgekühltem kalzium- und bikarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES (siehe 2.3.2) überführt.

2.5.1.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss

Nach der Entnahme der Herzen erfolgte die Zellpräparation unter sterilen Bedingungen. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen (siehe 2.3.2) wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das

2 Material und Methoden

Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) wurde ebenfalls steril verwendet. Die Rattenherzzellen wurden mittels eines fraktionierten DNase/Trypsin-Verdau, modifiziert nach Webster et al. (1993) isoliert. Zunächst wurden die entnommenen Herzen in eisgekühltem CBFHH (siehe 2.3.2) gewaschen. Nach Abtrennung der Gefäßstiele sowie der Vorhöfe wurden die Herzen erneut dreimal mit 10 ml CBFHH gewaschen. Anschließend wurden die Herzen in circa 2 ml CBFHH aufgenommen und mit einer gebogenen, feinen Schere zerkleinert (max. 10 min), bis die Gewebestücke kleiner als 1 mm^3 waren. Mithilfe einer CBFHH-benetzten, weitlumigen Pipette konnten die Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß überführt, mit CBFHH erneut gewaschen und anschließend der Gewebeaufschluss begonnen werden. Für den Gewebeaufschluss wurde eine angepasste Menge der Trypsin-Arbeitslösung (siehe 2.3.2) zu den zerkleinerten Gewebestücken gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Kippschüttler inkubiert. Anschließend konnte nach Sedimentation des Gewebes der Überstand aus dem Vorverdau verworfen werden. Erneut wurde Trypsin-Arbeitslösung zu dem Gewebe gegeben und inkubiert, bis sich der Überstand zu trüben begann. Sofort wurde eine angepasste Menge DNase-Arbeitslösung (siehe 2.3.2) zugegeben und 30x mit einer weitlumigen 10 ml Pipette titriert. Nach Sedimentation des Gewebes wurde der Überstand in ein dafür vorgesehenes Sammelröhrchen mit einem vorgelegten Volumen an aktivem fötalem Kälberserum (FKS; auf Eis) transferiert. Das aktive FKS diente hierbei zur Inaktivierung des Trypsins. Die Prozedur wurde so oft wiederholt, bis nur noch Bindegewebsfasern übrig waren, die verworfen werden konnten. Sobald ein Sammelröhrchen voll war, wurden die Zellen sofort abzentrifugiert (60 g, 15 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 2-3 ml gekühltem Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM; siehe 2.7) resuspendiert. So konnten die Zellen bis zum Ende der Präparation auf Eis gelagert werden. Anschließend wurden alle Zellpellets vereinigt und es erfolgte ein finaler DNase-Verdau (250 μl DNase-Stammlösung/30 ml Zellsuspension, 2 min Inkubation) zur Eliminierung der während der Präparation freigesetzten DNA. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einem angemessenen Volumen NKM resuspendiert. Die Zellen wurden durch einen benetzten Zellfilter (100 μm) gegeben, um Debris abzutrennen. Nun konnte die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wie folgt bestimmt werden: Die Suspension wurde gut durchmischt und 50 μl in ein frisches Reaktionsgefäß

2 Material und Methoden

überführt. Zusätzlich wurden 450 µl Trypanblau und 500 µl NKM zugegeben. Nach erneutem Mischen konnte die Neubauerkammer gefüllt werden. Es wurden immer acht große Quadrate ausgezählt, die Werte gemittelt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$y = x \times 20 \times 10.000$$

Dabei stehen die Variablen für folgende Größen:

y: Zellzahl [in Mio x ml⁻¹]

x: Mittelwert der gezählten Zellen aus acht großen Quadraten

Die Zellen wurden anschließend sofort weiter verwendet.

2.5.2 Gewinnung von Kardiomyozyten aus humanen iPS-Zellen

Das humane künstliche Herzgewebe wurde aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (Klon 25) hergestellt. Die Zellen waren ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Laugwitz (Moretti et al. 2010). Die iPS-Zellen wurden in Anlehnung an das für embryonale Stammzellen veröffentlichte Protokoll von Schaaf et al. (2011) in Kardiomyozyten differenziert. Nach dem Differenzierungsprozess wurden 500.000 Zellen (Kardiomyozytenanteil: 80-90%) für die Herstellung eines humanen EHTs verwendet (initiales Volumen von 100 µl). Der Kardiomyozyten-Anteil konnte durch die Anwendung des von Tohyama et al. (2013) veröffentlichten Protokolls erhöht werden. Dieses sieht vor, dass die Zellen zur Differenzierung in glukosefreiem Medium kultiviert werden, welches mit Laktat angereichert ist (die optimale Konzentration liegt bei 4 mM). Es konnte gezeigt werden, dass lediglich die Kardiomyozyten das Laktat zur Energiegewinnung umsetzen können und somit am Leben bleiben. Alle anderen Zelltypen (Fibroblasten, Endothelzellen) starben. Somit wurde der Kardiomyozytenanteil gegenüber vorherigen Protokollen deutlich gesteigert (Tohyama et al. 2013).

2.6 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

Das Hühnerembryonenextrakt (*Chick embryo extract*, CEE) wurde dem verwendeten Kulturmedium dauerhaft in einer 1:50 Verdünnung zugegeben. Zur Herstellung von CEE wurden 120-240 angebrütete SPF-Eier (7.-9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) verwendet. Zunächst wurden die Eier mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Schalen wurden am stumpfen Pol vorsichtig mit einer

2 Material und Methoden

Schere geöffnet und die Embryonen mit einer gebogenen Pinzette entnommen. Nach Dekapitation wurden die Köpfe, sowie die Körper, in 1-2 mit je 150 ml eisgekühltem CBFHH + 4% P/S gefüllten 500 ml Glasflaschen gesammelt. Nachdem alle Embryonen in den Flaschen gesammelt wurden, wurden sie auf Eis homogenisiert (Polytron® Homogenisator; 6 x 15 s bei 30000 rpm). Das Homogenat wurde auf vier konische Reaktionsgefäße (150 ml) aufgeteilt und anschließend zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen und Sammeln der Überstände wurden die Pellets nochmals mit CBFHH resuspendiert, vereinigt, auf 300 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert (30 s bei 30000 rpm). Nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4 °C) und Vereinigung aller Überstände wurde das Hühnerembryonenextrakt in Aliquots à 14 ml bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Präparation mit 120 angebrüteten Eiern ergab durchschnittlich 600 ml Hühnerembryonenextrakt. Die gesamte Präparation fand unter sterilen Bedingungen statt. Um mögliche Kontaminationen zu detektieren, wurde stets eine Probe des Extrakts zur mikrobiellen Analyse in das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKEs gegeben und auf Sterilität geprüft.

2.7 Herstellung von EHTs im 24-Well-Format

Die Fibrin-basierten EHTs aus neonatalen Rattenherzen oder humanen induzierten pluripotenten Stammzellen im 24-Well-Format unterschieden sich lediglich darin, dass den humanen EHTs 10% Matrigel zur Fibrinmatrix hinzugegeben wurden. Für die Herstellung wurden spezielle PTFE-Platzhalter aus eigener Herstellung und Silikonhalterungen aus Silikonelastomer Sylgard 184 (Dow Corning) verwendet, die industriell angefertigt wurden (Siltec GmbH & Co. KG, Weiler-Simmerberg, Deutschland). Die selbsthergestellten PTFE-Platzhalter zur Generierung der Agarosegussformen hatten folgende Geometrie: Länge x Breite x Höhe: 12 mm x 3 mm x 13,5 mm (vgl. Abb. 2.1B). Die Silikonhalterungen im 24-Well-Format wiesen folgende Geometrie auf: Länge x Breite: 79 mm x 18,5 mm; Länge der Silikonhalterungen: 12 mm; Durchmesser: 1 mm; Durchmesser des Tellers am Ende der Halterung: 2 mm; Abstand (Mitte-Mitte): 8,5 mm (vgl. Abb. 2.2A). Die Silikonhalterungen wurden vor jeder Nutzung zweifach ausgekocht, autoklaviert und bis zum Gebrauch steril gelagert.

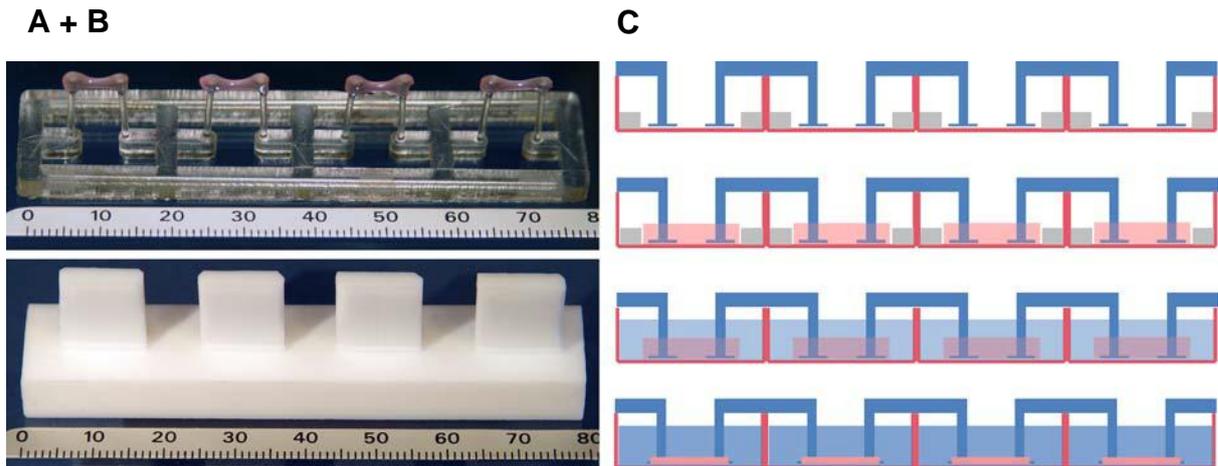


Abb. 2.1: Darstellung der Elemente zur Herstellung von EHTs. Zu sehen ist eine Silikonhalterung mit vier EHTs (A) sowie ein PTFE-Platzhalter zur Herstellung der Agarosegussformen (B); beide um 180° gedreht; Skalierungsbalken in mm. (C) Schematische Abbildung des Kulturverlaufes. Zunächst wurden die Silikonhalterungen in die Agarosevertiefungen platziert, dann der Mastermix für die EHTs zugegeben, die nach 2 h bei 37 °C in eine neue, mit Medium gefüllte Zellkulturschale überführt werden konnten. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich innerhalb von sieben bis zehn Tagen matrixreduzierte, kohärent schlagende EHTs. Modifiziert nach Hansen et al. (2010).

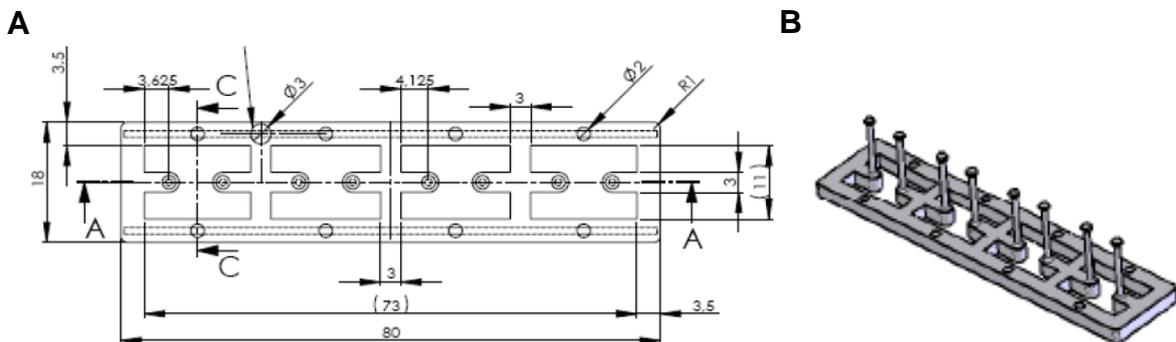


Abb. 2.2: Geometrie der Silikonhalterungen. (A) Darstellung der Geometrie der Silikonhalterungen schematisch von oben (in mm) und (B) einer Silikonhalterung von der Seite (gedreht um 180°; übernommen von Siltec GmbH & Co, KG, 2009).

Die EHTs wurden wie folgt hergestellt: Zunächst wurden die Gussformen mit Hilfe von steriler 2%-iger Agarose in PBS (w/o MgCl₂, w/o CaCl₂) und der eigens hergestellten PTFE-Platzhalter in einer 24-Well Schale angefertigt. Pro Well wurden 1,5 ml Agarose verwendet. Anschließend wurde der Mastermix auf Eis pipettiert.

2 Material und Methoden

Zur Herstellung von EHTs wurde folgender Mastermix angesetzt:

Zusammensetzung für die 24-Well-EHTs:

Zellsuspension	16,7 x 10 ⁶ Zellen
2x DMEM*	186,7 µl
Bovines Fibrinogen	86,7 µl
Nicht-Kardiomyozyten-Medium**	ad 3333,3 µl für 24 EHTs

*2x DMEM

20% 10x DMEM
20% Pferdeserum (inaktiv)
2% Penicillin/Streptomycin
4% Hühnerembryonenextrakt
in Aqua <i>ad injectabilia</i>

**Nicht-Kardiomyozyten-Medium

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

Nach Aushärtung der Agarose wurden die PTFE-Platzhalter herausgezogen und die Silikonhalterungen in den entstandenen rechteckigen Mulden positioniert, sodass jeweils ein Pärchen von Silikonhalterungen in eine Agarosegussform ragte. Nun konnten die EHTs einzeln pipettiert werden. Dafür wurden zunächst 100 µl des Mastermix abgenommen, separat mit Thrombin vermischt und in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurden die EHTs bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ im Brutschrank für circa 2 h inkubiert, um eine Polymerisierung des Fibrins zu erreichen, bevor sie in eine neue, mit EHT-Medium gefüllte 24-Well-Zellkulturschale überführt werden konnten. Der Mediumwechsel erfolgte dreimal pro Woche. Das Medium wurde vor jedem Wechsel, wie folgt, frisch angesetzt.

Zusammensetzung des EHT-Mediums für rEHTs:

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

2 Material und Methoden

Zusammensetzung des EHT-Medium für hEHTs:

DMEM	(ohne Glukose)
Fötale Kälberserum	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Insulin	10 µg/ml
Aprotinin	33 µg/ml
Natrium L-Laktat	4 mM

Die rEHTs zeigten unter diesen Bedingungen nach circa drei Tagen erste fokale Kontraktionen, die auf einzelne Bereiche beschränkt und unkoordiniert waren. Nach etwa sieben bis zehn Tagen schlugen sie kohärent und Kontraktionen waren erfassbar. Die hEHTs schlugen bereits nach drei bis fünf Tagen kohärent. Die EHTs konnten über Wochen stabil kultiviert werden, sowohl unstimuliert als auch stimuliert.

2.8 Herstellung von *Pacing*-Einheiten

Die Eigenherstellung der *Pacing*-Einheiten zur elektrischen Stimulation der EHTs wurde in Zusammenarbeit mit Bülent Aksehirlioglu vorgenommen. Da sich die Herstellung der Einheiten weiterentwickelte und unterschiedliche Materialien zum Einsatz kamen, erfolgte die Nomenklatur in Generationen (I bis VI). Die Folgenden Fotografien entstanden durch freundliche Unterstützung von Frau Claussen aus der Fotoabteilung des UKEs.

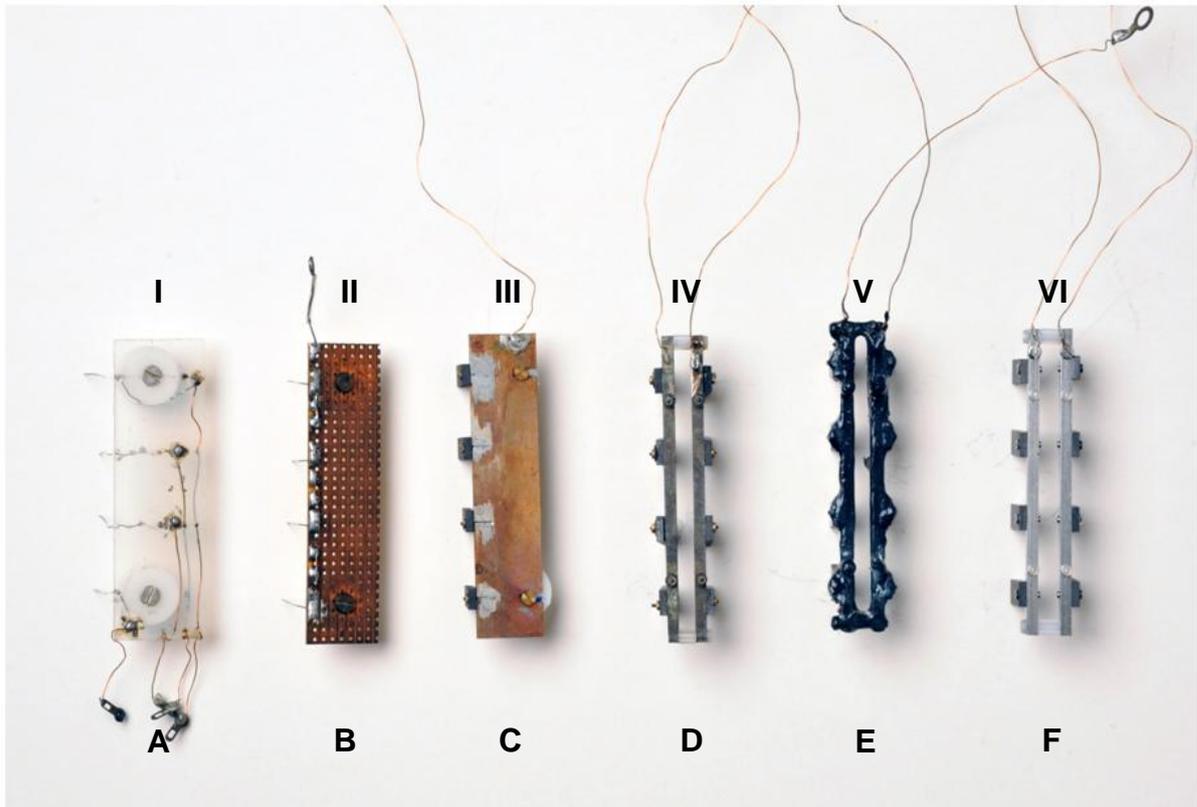


Abb. 2.3: Entwicklung der *Pacing*-Einheiten: Generationen I bis VI. Das eingesetzte Material des Gerüsts bestand zunächst aus PMMA (A). Später kam es zum Einsatz von Messing-Platten (B und C), Messing-Stäben (D), mit PlastiDip isolierten Messing-Stäben (E) und letztlich Edelstahl-Stäben (F). Ebenfalls kam es ab der dritten Generation (C) zur Verwendung von Graphit-Zuschnitten anstelle der zuvor eingesetzten Platin-Drähte als eigentliches Elektrodenmaterial, das mit dem Kulturmedium in direkten Kontakt tritt.

2.8.1 Draht-Elektroden mit Kunststoff-Gerüst

Die erste Generation der *Pacing*-Einheiten bestand aus einer PMMA-Platte, an deren Enden jeweils ein Zylinder aus PTFE angebracht war, welcher beim Einsetzen in eine 24-Well-Platte die Vorrichtung stabilisierte. An einer Längsseite der Platte waren die Drähte angebracht, die als Elektroden fungierten und in die Wells reichten. Jeder Draht wurde über einen separaten Leiter aus Kupfer-Draht angesteuert. Zur Stimulierung von vier EHTs waren demnach zwei dieser Einheiten nötig.

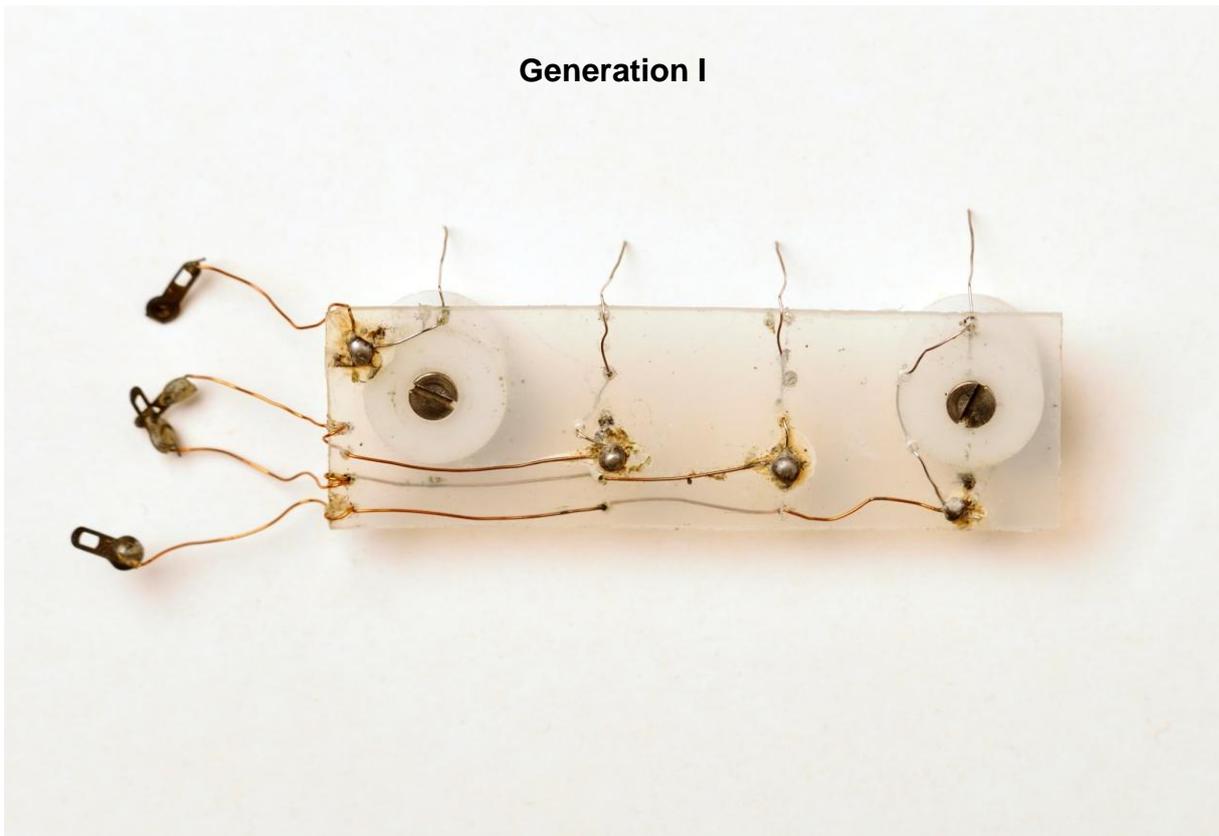


Abb. 2.4: Pacing-Einheit der Generation I. Gezeigt ist die erste hergestellte Einheit. Sie bestand aus einem PMMA-Gerüst und Elektroden aus Draht. Da jeweils 2 Stück für die Stimulation von 4 EHTs nötig waren, ging viel Platz auf einer 24-Well-Platte verloren, sodass nicht alle 24 EHTs gleichzeitig stimuliert werden konnten.

2.8.2 Carbon-Elektroden mit Messing-Gerüst

In den darauf folgenden Generationen wurde Messing als Material für das Gerüst gewählt. Bei der Herstellung der zweiten und dritten Generation kam es zunächst zum Einsatz einer Messing-Platte, anstelle des vorher verwendeten PMMA, wobei die dritte Generation bereits über Graphit-Zuschnitte anstelle von Platin-Drähten verfügte. Ab Generation IV wurden dann Stäbe für das Gerüst verwendet. Dies war eine platzsparende Methode, die zum Vorteil hatte, dass in jede Spalte einer 24-Well-Platte eine *Pacing*-Einheit eingesetzt werden konnte und somit eine simultane Stimulation von bis zu 24 EHTs möglich war. Die Silikonhalterungen mitsamt den künstlichen Herzgeweben wurden von oben durch die *Pacing*-Einheiten geführt. Eine Vorrichtung aus vier Schrauben, umzogen mit einem dünnen Gummischlauch, gewährleistete, dass die Silikonhalterungen mit jeder *Pacing*-Einheit fixiert waren und die EHTs sich exakt zwischen zwei Carbon-Elektroden im elektrischen Feld befanden.

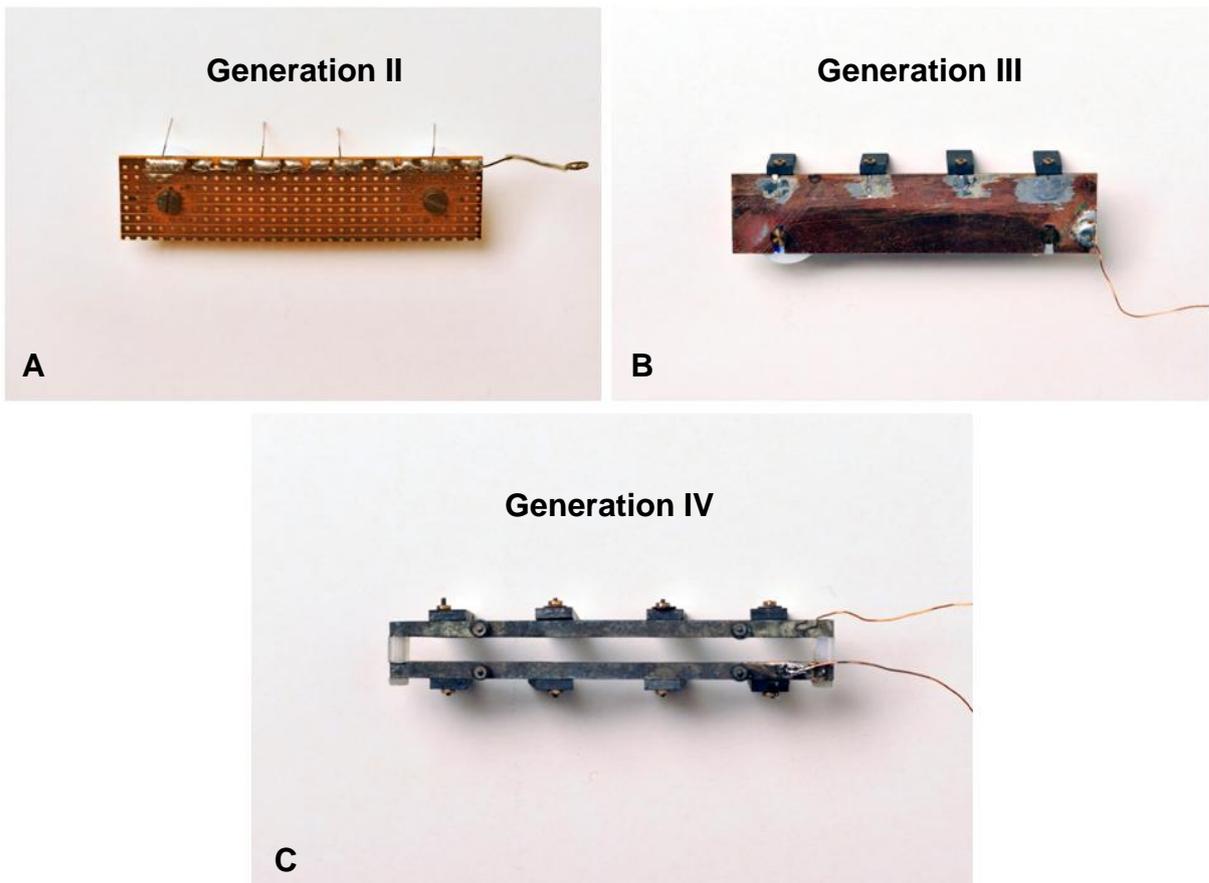


Abb. 2.5: Pacing-Einheiten der Generationen II bis IV. Ab der zweiten Generation (A und B) diente das Gerüst gleichzeitig als Leiter, sodass nur noch ein Anschluss nötig war. Ab Generation IV (C) bestand das Gerüst der Einheiten aus Stangen, welche durch PTFE-Schrauben voneinander isoliert waren. Jede Stange wurde über einen Kupfer-Draht mit Strom versorgt. Zwischen jedem Paar von Carbon-Elektroden entstand so ein elektrisches Feld.

2.8.3 Carbon-Elektroden mit Edelstahl-Gerüst

Aufgrund negativer Eigenschaften des Messings, auf die später eingegangen wird, wurde das Material zur Herstellung des Gerüsts geändert. Ab Generation VI kam rostfreier Edelstahl vom Typ 1.4301 zum Einsatz. Die verwendeten Schrauben und Muttern wurden ebenfalls ausgetauscht und bestanden fortan aus Edelstahl. Es wurde ausschließlich bleifreier Lötzinn verwendet. Später kam es zu einer weiteren Optimierung, bei der die zuführenden Drähte durch kurze und ebenfalls aus Edelstahl bestehende Drähte ersetzt wurden.

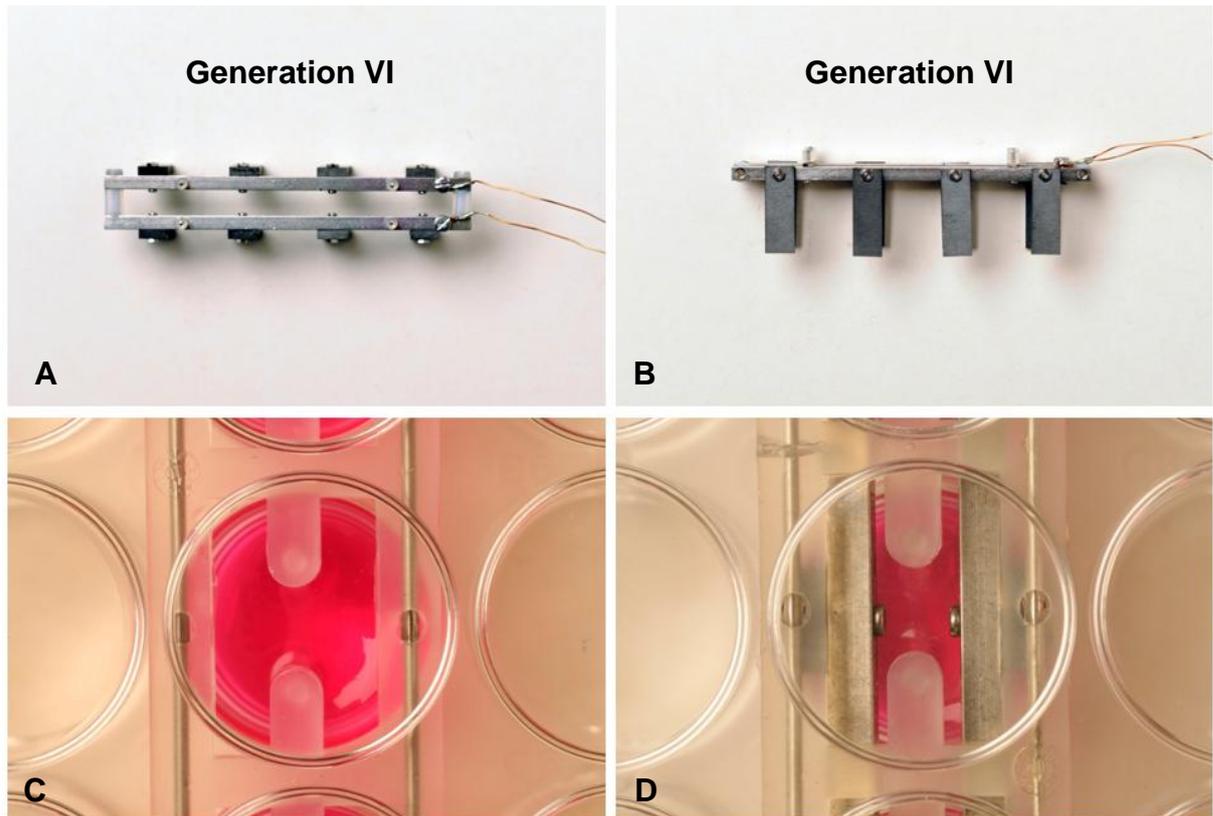


Abb. 2.6: *Pacing*-Einheit der Generation VI. Die sechste Generation der *Pacing*-Einheiten bestand aus den Graphit-Zuschnitten, den zuführenden Drähten (später ausgetauscht gegen kurze Edelstahldrähte), den PTFE-Schrauben, PTFE- und Gummi-Schläuchen, bleifreiem Lötzinn sowie aus den Edelstahlkomponenten (Gerüst, Schrauben, Muttern; A und B). Aufsicht eines *Wells* einer 24-*Well*-Platte. (C) Zu sehen ist der Ausschnitt eines *Wells*, von beiden Seiten ragen die Silikonhalterungen senkrecht hinein, zwischen ihnen sind die Umrisse eines EHTs zu erkennen. (D) Gezeigt ist der gleiche Ausschnitt, allerdings mit eingesetzter Elektrode. Parallel zum EHT befanden sich nun die Carbon-Elektroden, zwischen denen sich das elektrische Feld aufbaut. Trotz des veränderten Aufbaus, ist das EHT zwischen den Silikonhalterungen deutlich zu erkennen.

Die industrielle Herstellung und Bearbeitung der Edelstahl-Stangen wurde von Bernd Muschke (Muschke Werkzeugbau, Berlin) vorgenommen.

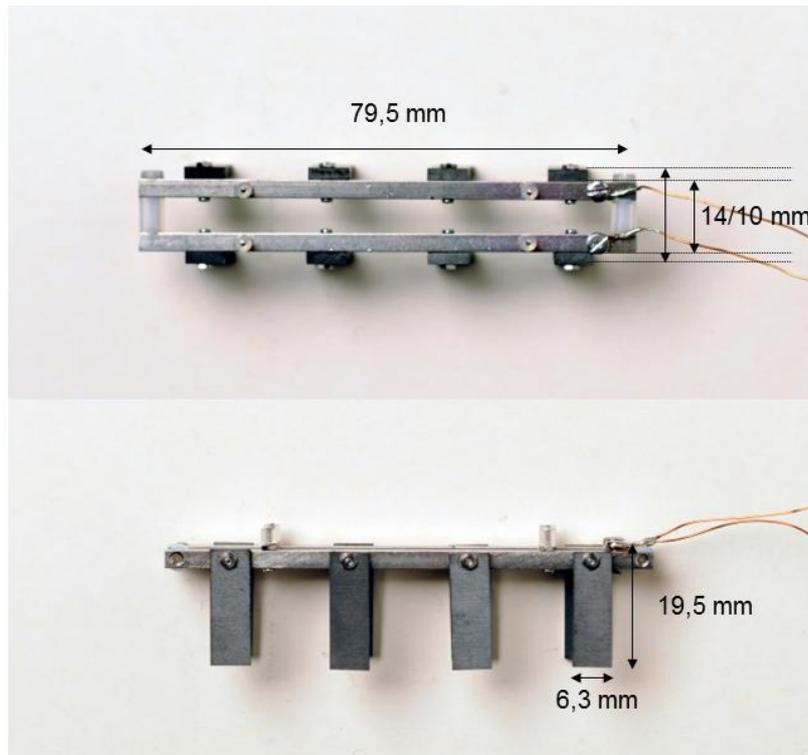


Abb. 2.7: Abmessungen der *Pacing*-Einheiten und Elektroden. Zur industriellen Herstellung wurde der Edelstahl 1.4301 verwendet. Für das Gerüst einer Elektrode wurde jeweils ein Halter A und ein Halter B benötigt, die sich in den vorzunehmenden Bohrungen und Gewinden unterschieden.

2.9 Morphologie

Die Analyse der morphologischen Veränderungen der EHTs wurde per ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) durchgeführt. Es erfolgte die Auswertung der Ausgangslänge und Breite der Konstrukte (siehe 3.2.2), die sich im Verlauf der Kultivierung veränderten, indem Bilder aus dem video-optischen System (siehe 2.13) mit Hilfe des Programms ausgemessen wurden.

2.10 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Proben erfolgte durch die *HEXT Core Facility* der Mäusepathologie des Instituts für Neuropathologie am Universitätsklinikum Eppendorf durch Dr. Melanie Neumann und Kristin Hartmann (Prof. Dr. Glatzel).

2.10.1 Herstellung histologischer Präparate

Zur Herstellung der histologischen Präparate wurden die EHTs zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen und für 24 h bei 4 °C in einer säurefreien (pH 7), phosphatgepufferten 4% Formaldehydlösung (Roti-Histofix®) fixiert. Es wurde ausschließlich das Gewebe zwischen den Silikonhalterungen verwendet. Die fixierten

2 Material und Methoden

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

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

Tab. 2.1: Protokoll der Entwässerung.

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

2.10.2 Entparaffinieren

Die Proben mussten vor Beginn der Färbung entparaffiniert werden. Dazu wurden sie für 12 h bei 40 °C im Heißluftofen senkrecht stehend erwärmt, wodurch überflüssiges Paraffin ablaufen konnte. Anschließend folgte die Entparaffinierung in 96-98% Limonenlösung (Roti-Histol®, Xylol-Ersatz) und das Wässern durch eine absteigende Ethanolreihe (vgl. Tab. 2.2).

Stufe	Substanz	Zeit
1.	Roti-Histol	10 min
2.	Roti-Histol	10 min
3.	Roti-Histol	10 min
4.	Ethanol 100%	5 min
5.	Ethanol 100%	5 min
6.	Ethanol 96%	5 min
7.	Ethanol 96%	5 min
8.	Ethanol 75%	5 min
9.	Ethanol 75%	5 min
10.	3x Aqua bidest.	spülen

Tab. 2.2: Protokoll des Entparaffinierens.

2.10.3 Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung)

Nach dem Entparaffinieren und Wässern der Proben wurden sie mit Hämalau- (1:5 verdünnt, 1% Hämatoxylin; 0,2% NaIO₃; 50% KAl(SO₄)₂; 50% Chloralhydrat; 1% Zitronensäure) und Eosin-Lösung (0,3% Eosin G, wässrig, Merck) gefärbt, durch eine aufsteigende Ethanolreihe und erneutem Roti-Histol[®]-Bad abschließend entwässert (vgl. Tab. 2.3). Nach dem Eindecken mit Eukitt[®] erfolgte die Analyse, bei der mit einem Mikroskop (Zeiss-Axioplan IM-35) Ausschnitte fotografiert wurden (Zeiss-Axiocam).

Stufe	Substanz	Zeit
1.	Hämalau-Lösung	20 min
2.	Leitungswasser	fließend
3.	Eosin-Lösung	10 min
4.	Aqua bidest.	spülen
5.	Ethanol 96%	spülen
6.	Ethanol 96%	spülen
7.	Ethanol 100%	spülen
8.	Ethanol 100%	spülen
9.	Roti-Histol	3-5 min
10.	Eindecken mit Eukitt [®]	

Tab. 2.3: Protokoll der HE-Färbung.

2.10.4 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Aufarbeitung erfolgte ebenfalls durch die *HEXT Core Facility* der Mäusepathologie des Instituts für Neuropathologie am Universitätsklinikum Eppendorf und unterschied sich hinsichtlich der Bearbeitung der Präparate nicht von der allgemeinen Histologie, wie sie oben beschrieben wurde. Die immunhistologische Färbung erfolgte mit der *Ventana Benchmark xt*, einem Vollautomaten für histologische Färbungen. Die Spender der gewünschten Antikörperlösungen wurden ausgewählt und der Lauf gestartet (195 min). Pro

Durchlauf wurden Vorbehandlung und Inkubationszeit bis zur Etablierung des endgültigen Protokolls (siehe Tab 2.4) variiert.

Antikörper	Vorbehandlung	Verdünnung
MLC2a	Citratpuffer, 30 min.	1:200
MLC2v	Citratpuffer, 30 min.	1:2000
Cx43	Citratpuffer, 30 min.	1:200

Tab. 2.4: Antikörper und Vorbehandlung der EHTs für die Immunhistochemie.

Zur Analyse wurden Ausschnitte der aufgearbeiteten EHTs mit einem Mikroskop (Zeiss-Axioplan IM-35) fotografiert (Zeiss-Axiocam). Ein weiterer Parameter, der im Rahmen der immunhistochemischen Aufarbeitung der Gewebe gemessen wurde, war der Feret-Durchmesser sowie dessen Maximum und Minimum. Hieraus ließ sich auf die Länge, die Breite sowie die Ausrichtung der Kardiomyozyten schließen. Des Weiteren wurde das flächenmäßige Verhältnis von Kardiomyozyten zu Extrazellulärmatrix bestimmt (siehe. 3.2.4.1). Die Analyse erfolgte mit der Software *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

2.10.5 Immunfluoreszenz

Die EHTs wurden immer im Ganzen (*whole-mount*) gefärbt. Nachdem sie über Nacht bei 4 °C in einer säurefreien (pH 7), phosphatgepufferten 4%-igen Formaldehydlösung (Roti-Histofix[®]) fixiert wurden, wurden sie mit TBS (in mM: 50 *Tris ultra pure*, 150 NaCl, mit 25%-iger HCl auf pH 7,2-7,4 eingestellt) gewaschen. Anschließend wurden die Präparate bis zu 24 h mit Blocklösung (TBS 0,05 M, pH 7,4, 10% FKS, 1% BSA, 0,5% Triton X-100) bei 4 °C unter Bewegung inkubiert. Nach dem Blocken wurde der erste Antikörper in einer entsprechenden Lösung und Konzentration (TBS 0,05 M, pH 7,4, 1% BSA, 0,5% Triton X-100) zu den EHTs gegeben und ebenfalls 24 h bei 4 °C unter Bewegung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS konnte der zweite Antikörper sowie gegebenenfalls ein Kernfarbstoff analog zum ersten Antikörper hinzugegeben werden. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Präparate mit dem wasserlöslichen, nicht fluoreszierenden Eindeckmedium Fluoromount-G (Southernbiotech) auf Objektträgern mit Vertiefungen (26 x 76 mm, zwei Vertiefungen; Thermo Scientific) eingedeckt. Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss LSM 510 META-Mikroskop gemacht. Die Multiphoton-Mikroskopie wurde mit Hilfe der *Imaging-Core-Facility* des UKEs an einem LaVision Biotec Trim Scope Mikroskop, welches mit

2 Material und Methoden

einem verstellbaren Femtosekunden-gepulsten-Titan-Saphir-Laser (Wellenlängenspektrum 700-900 nm, 80 MHz, MaiTai, Spectra Physics, Germany) ausgestattet war, durchgeführt. Hierfür wurden die EHTs bei einer Wellenlänge von 770 nm angeregt und die Emissionsphotonen wurden, bevor sie detektiert werden konnten, von einem 610 nm dichroitischen Spiegel aufgespalten. Die DAPI- und die Alexa-Fluor-488-Fluoreszenz des Connexin-43 wurden durch einen 510/55 nm Interferenz-Filter gebündelt, bevor sie von einer blau-sensitiven Photomultiplieröhre (eine Photomultiplieröhre konvertiert Licht in elektrische Signale; *Photomultiplier Tube*, PMT; Hamamatsu H 6780-01) detektiert werden konnten. Die Alexa-Fluor-546-Fluoreszenzphotonen des Dystrophins passierten einen 655/40 nm Interferenz-Filter und wurden von einer rot-sensitiven PMT (Hamamatsu H 6780-20) detektiert.

Zur Objektivierbarkeit wurde ein einheitlicher quadratischer Aufnahmebereich von 150 μm x 150 μm gewählt. Dieser Bereich lag an der Oberfläche exakt in der Mitte eines Gewebes und wurde als erste Ebene ($z = 0 \mu\text{m}$) definiert. Anschließend folgten Aufnahmen in 2 μm -Schritten in die Tiefe des Konstrukts, bis die Arbeitsdistanz des Objektivs (Zeiss EC Plan-Neofluar, 40x/1,3 *Oil* DIC, Carl Zeiss, Germany) von $z \approx 210 \mu\text{m}$ erreicht war. Die Anzahl der Connexin-43 positiven Strukturen und die Summe der Connexin-43-Intensität in dem definierten Bereich des EHTs ($x = y = z = 150 \mu\text{m}$) wurden von einem verblindeten Untersucher mit Hilfe der Software Imaris 7.6.1 (<http://www.bitplane.com/releasenotes/imaris764.aspx>) und geeigneter Filter analysiert. Ebenso erfolgte die Auswertung der Dicke der kompakten Kardiomyozytenschicht innerhalb der EHTs.

Antikörper	Verdünnung
<i>α-sarcomeric actinin</i> (mk)	1:250
Connexin-43 (mk)	1:250
DAPI	1:1000
DRAQ5	1:1000
Dystrophin	1:250

Tab. 2.5: Antikörper der Immunfluoreszenz und Multiphoton-Mikroskopie.

2.11 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden wiederum in Kooperation mit der *HEXT Core Facility* angefertigt. Zusätzlich erfolgte die Aufarbeitung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Präparate und Aufnahmen in Zusammenarbeit mit

2 Material und Methoden

dem *Imperial College*, London, durch freundliche Unterstützung von Dr. Pradeep K. Luther und Alice Mitchell.

Zur Aufarbeitung für die Elektronenmikroskopie wurden die EHTs zunächst mehrfach mit PBS (w/o MgCl₂, w/o CaCl₂) gewaschen und anschließend 10 min in 30 mM 2,3-Butan-Dion Monoxim (BDM; in PBS) inkubiert, um zu gewährleisten, dass die Kardiomyozyten in den EHTs vor der Fixierung vollständig relaxiert waren. Anschließend folgte in 2,5%-Glutaraldehyd in PBS, pH 7,4 mit 1 mM CaCl₂ über Nacht bei 4 °C die Fixierung. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit PBS gewaschen und anschließend mit Osmiumtetroxid/PBS (1:1) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS über Nacht bei 4 °C konnten die Präparate dehydriert, mit Glycidether (Serva) infiltriert und in Epon eingebettet werden. Semidünnschnitte (1 µm) wurden zur ersten Übersicht mit Toluidin Blau gefärbt. Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden im nächsten Schritt Ultradünnschnitte (50 nm und 100 nm) angefertigt (*Ultracut UCT*, Leica) und zur Kontrastierung der Schnitte zunächst mit Uranylacetat (UO₂ (CH₃COO)₂ x 2 H₂O) und anschließend mit Citrat behandelt. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem Jeol 1200 Transmissions-Elektronenmikroskop bei 100 kV Spannung. Die Bilder wurden in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln mit einer *Fastscan* CCD Kamera von Tietz aufgenommen. Die Breite der Z-Banden wurde in *ImageJ* von 50 repräsentativen Z-Banden in einer Vergrößerung von 7500x in Anlehnung an eine bereits publizierte Methode bestimmt (Luther et al. 2000). Die stereologischen Analysen wurden ebenfalls mit *ImageJ* vorgenommen, wofür fünf repräsentative EM-Aufnahmen (ein Herz oder ein EHT pro Gruppe) in einer Vergrößerung von 1000x für die Analysen unter Ausschluss der Zellkerne verwendet wurden.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Isolation von RNA: *RNeasy Kit* (Qiagen)

Zur Gewinnung und Aufreinigung der Gesamt-RNA aus EHTs wurde das *RNeasy* Mini Kit unter geringfügigen Modifikationen nach Herstellerempfehlung verwendet. Das Verfahren basiert auf Zentrifugationssäulen, die eine Siliciumdioxidmembran enthalten. Diese Membran ist in der Lage, RNA-Moleküle mit einer Länge >200 Nucleotide zu binden. Zunächst wurde den in Eppendorf Safe-Lock

2 Material und Methoden

Reaktionsgefäßen gefrorenen EHTs 350 µl *Lysis-Buffer* RLT, 20 µl Proteinase K und eine Stahlkugel hinzugefügt. Die Stahlkugel wurde zuvor von RNAsen dekontaminiert. Daraufhin wurde das EHT mechanisch mithilfe eines *Tissue Lysers* (für 2 min bei 30 Hz) zerkleinert. Die Stahlkugel wurde entfernt und das Gemisch bei 56 °C für 30 min und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde das EHT erneut eingefroren, wieder aufgetaut und nach einer weiteren Hinzugabe von 10 µl Proteinase K bei 56 °C und 300 rpm inkubiert. Auf die Probe wurde dann 350 µl Ethanol gegeben und diese mit einer Pipette gut durchmischt, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Das Gemisch konnte nun auf die Säulen gegeben und bei voller Geschwindigkeit für 30 s zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten die Waschschrte mit 500 µl RPE-Puffer und einer erneuten Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 30 s. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal, wobei der Durchfluss jeweils verworfen wurde. Zur Beseitigung des Waschpuffers wurde die Säule leer zentrifugiert und der Durchfluss wiederum verworfen. Danach kam ein neues 1,5 ml Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäß für die Elution der RNA zum Einsatz. Hierfür wurde 20 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben, bei Raumtemperatur für 10 min belassen und daraufhin für 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Die RNA-Konzentration und -Qualität wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, bzw. 230 nm am Nanodrop (ND-100; Spectrophotometer) ermittelt. Die Aufreinigung mittels *RNeasy Kit* war standardisiert durchführbar und führte immer zu qualitativ hochwertiger RNA (Quotient 260/280 nm: ~ 2,0). Die Aufbewahrung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.12.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 150-500 ng (je nach Ausbeute der RNA-Isolation) der präparierten RNA mittels reverser Transkriptase unter Verwendung von Oligo(dt)-Primern gemäß Herstellerangaben des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) in cDNA umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die so gewonnene cDNA wurde für weitere Analysen in der quantitativen PCR eingesetzt.

2.12.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die mRNA-Konzentration wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*quantitative realtime-PCR*, qPCR) mit einem ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System*

2 Material und Methoden

bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruht auf der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes (*SYBR[®] Green*, Applied Biosystems), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Durch die Amplifikation der cDNA mittels spezifischer Primer erhöht sich so das abgegebene und detektierte Fluoreszenzsignal des Farbstoffes mit jedem PCR-Zyklus. β -Glucuronidase (*Gusb*) und die ribosomale 18s RNA wurden als interne Standards verwendet. Die cDNA aus der qPCR wurde 1:20 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Die verwendeten Primersequenzen sind unter 2.3.5 aufgeführt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software*, Version 2.4 (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4350490?CID=search-product>) analysiert. Die mRNA-Menge wurde über den Vergleich der relativen Ct-Werte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Die Ct-Werte der internen Standards (*Gusb*, 18s) wurden von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert (ΔCt). Der Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen ΔCt -Wert abgezogen, wodurch die $\Delta\Delta Ct$ -Werte berechnet werden konnten. Die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel zeigte dann den relativen mRNA-Gehalt bezogen auf die Kontrolle an.

2.12.4 *Affymetrix-Gene-Array*

Um detaillierte Veränderungen auf RNA-Ebene zu erfassen, wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die Gesamt-RNAs von je fünf EHTs einer Gruppe, wie unter 2.12.1 beschrieben, isoliert und die Menge und Reinheit photometrisch bestimmt. Anschließend wurde die RNA an das *Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine* nach Berlin geschickt. Dort erfolgte die Umschreibung der RNA in cRNA und die Analyse von 29.214 Transkripten mittels *GeneChip[®] Rat Gene 1.0 ST Array*. Die *Arrays* wurden mit Hilfe des RMA-Algorithmus und Berücksichtigung des GC-Gehalts der Proben nach Quantilen normalisiert. Nicht oder nur gering exprimierte Transkripte ($\text{Expression} < 100$) wurden aus der Analyse ausgeschlossen, was zu 14.505 analysierbaren unterschiedlichen Transkripten (von 29.214 möglichen) führte. Nach der Normalisierung der *Arrays* wurden diese durch Einsatz der *Principal Component Analysis* (PCA) auf Ausreißer untersucht. In den ersten vier *Principle Components* (PCs), die 67,3% der Varianz widerspiegeln, wurde kein Ausreißer gefunden. Die Analyse der unterschiedlichen Expressionen der Gene erfolgte mit Hilfe des t-test der *Partek Genomic Suite Version 6.6* (<http://www.partek.com/pgs>). Für multiples Testen

wurde gemäß der FDR (*False Discovery Rate*) Methode von Benjamini und Hochberg korrigiert. Zur Auswertung der *Pathways* kam die IPA (*Interactive Pathway Analysis of Complex Omics Data*, Ingenuity Systems) zum Einsatz. Unterschiede in der Expression wurden in der IPA definiert als 1,5-fache Hochregulation oder als 0,66-fache Runterregulation jeweils bei einem FDR-korrigierten p-Wert $<0,05$.

2.13 Video-optische Messungen von EHTs

Die EHTs wurden mit einer video-optischen Messstation gemessen. Mit Hilfe dieser konnte eine Vielzahl von Parametern unter sterilen Zellkulturbedingungen objektiv ermittelt werden: Kontraktionskraft, Frequenz, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten, Kontraktions- und Relaxationszeiten und das *Fractional Shortening*. Die Messapparatur bestand aus einer zellkulturähnlichen Einheit, in der Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie die Gaszusammensetzung regulierbar waren. Der Deckel des Systems bestand aus einer Glasplatte, über der eine Basler-Kamera (Typ A 602f-2) an einem x-y-z-System (IAI Corporation) montiert war. Diese konnte über einen PC gesteuert werden. Zusätzlich wurde das aktuell aufgenommene EHT von unten durch eine Diode beleuchtet, um einen hell-dunkel Kontrast zu erzeugen und so eine exakte Figurenerkennung durch die Software zu gewährleisten. Die Beleuchtung wurde mit den Aufnahmen synchronisiert, um ein Erwärmen des Mediums durch dauerhafte Lichteinwirkung zu vermeiden.

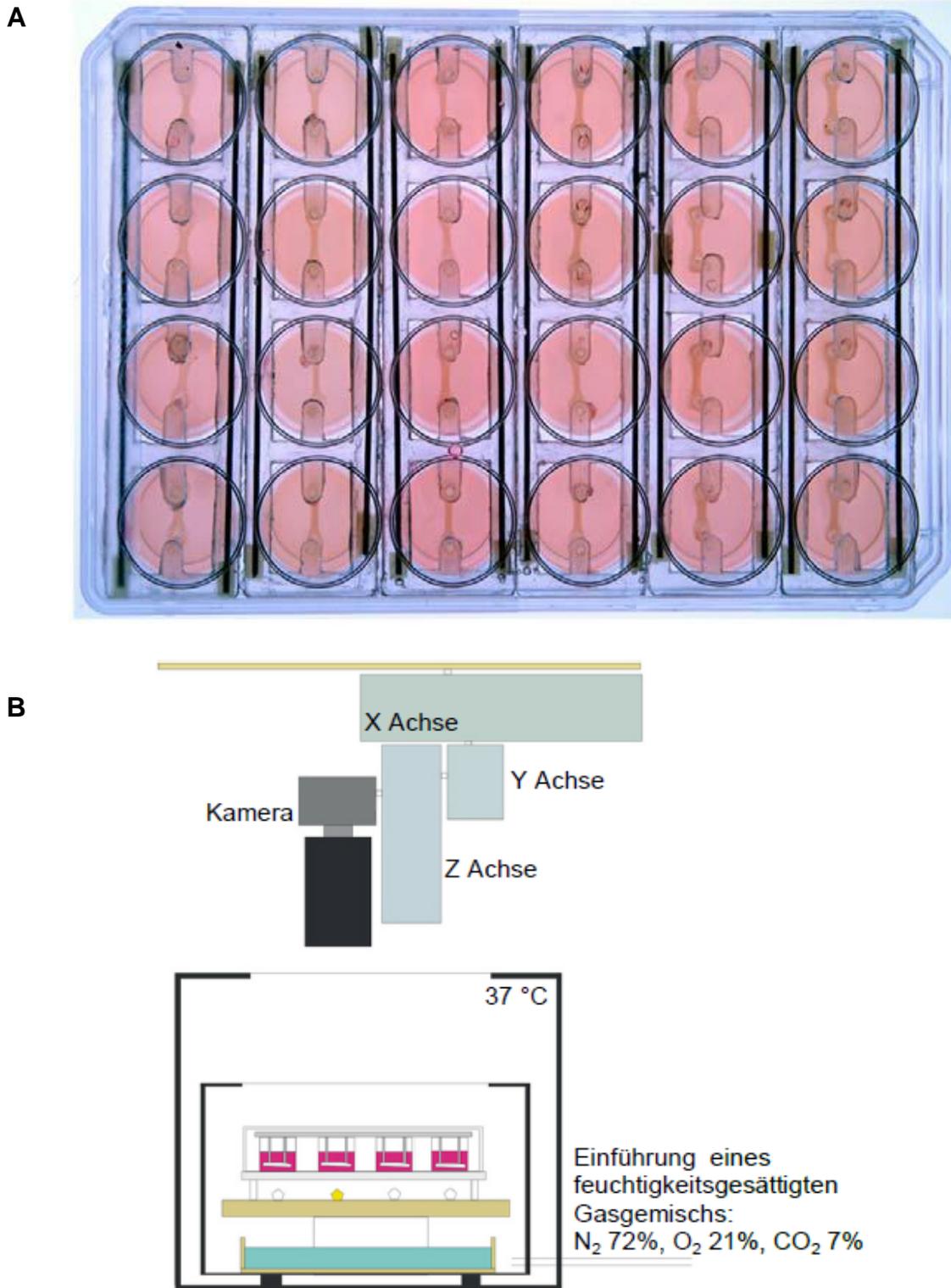


Abb. 2.8: Schematische Darstellung einer 24-Well-Platte und der Messapparatur. Gezeigt ist eine Zellkulturschale in Aufsicht mit 6 Silikonhalterungen, an denen sich jeweils vier EHTs befinden (A). Die Messapparatur ist schematisch in B dargestellt. Zu sehen ist die am x-y-z-System befindliche Kamera über der zellkulturähnlichen Einheit. Die grundsätzliche Idee der Beleuchtung ist ebenfalls zu erkennen. Modifiziert nach Hansen et al. (2010).

2 Material und Methoden

Die video-optischen Messungen fanden mit Hilfe einer speziell hergestellten Software (*Consulting Team Machine Vision, CTMV, Pforzheim*) statt. Vor einer Messung wurde jedes EHT PC-gesteuert angefahren, um die optimale Kameraposition zu finden. Die so definierten x-y-z-Koordinaten wurden für jedes EHT automatisch gespeichert und konnten jederzeit wieder abgerufen werden. Nach Festlegung der Aufnahmezeit wurde die Messung gestartet. Die Kamera fuhr automatisch die gespeicherten Positionen ab und nahm eine Videosequenz für eine definierte Zeitdauer auf. Die Analysesoftware basierte dabei auf dem Prinzip der Figur-Erkennung und setzte automatisch Messpunkte am oberen und unteren Ende des kontrahierenden EHTs. Der sich verändernde Abstand zwischen diesen Messpunkten wurde von der Software bestimmt und über die Aufnahmezeit festgehalten. Basierend auf der Geometrie der Silikonhalterungen und deren Ablenkung sowie der Beschaffenheit des Sylgards 184 (Elastizitätsmodul = 1,9 MPa) wurde automatisch die Kontraktionskraft berechnet. Dieser Berechnung lag eine von Vandeburgh et al. (2008) publizierte Formel zu Grunde:

$$F = \frac{3EI\delta}{L^3} = \frac{3\pi ER^4\delta}{4L^3}$$
$$I = \frac{1}{4}\pi R^4$$

Dabei stehen die Variablen für folgende Größen:

F: Resultierende Kraft

E: Elastizitätsmodul des Materials bzw. Silikons

δ: Ablenkung der Silikonhalterungen

L: Länge der Silikonhalterungen

R: Radius der Silikontellerchen am Ende der Silikonhalterungen

I: Trägheit des Materials bzw. Silikons

Durch diese Formel war die Software in der Lage, Kontraktionen zu erkennen. Als Qualitätskontrolle wurden die Messpunkte der Kontraktionen, welche in die Berechnung mit eingingen, mit blauen Quadraten gekennzeichnet (vgl. Abb. 2.9). Außerdem konnten vor jeder Messung Kriterien wie Erkennungsgrenze (zum Ausschluss des Hintergrundrauschens) oder Mindestrelaxation festgelegt und auf

2 Material und Methoden

den jeweiligen Versuch angepasst werden. Das Messsystem vereinfachte die Analyse der EHTs erheblich. Die entwickelten *Pacing*-Einheiten waren vollständig mit der Messstation kompatibel.

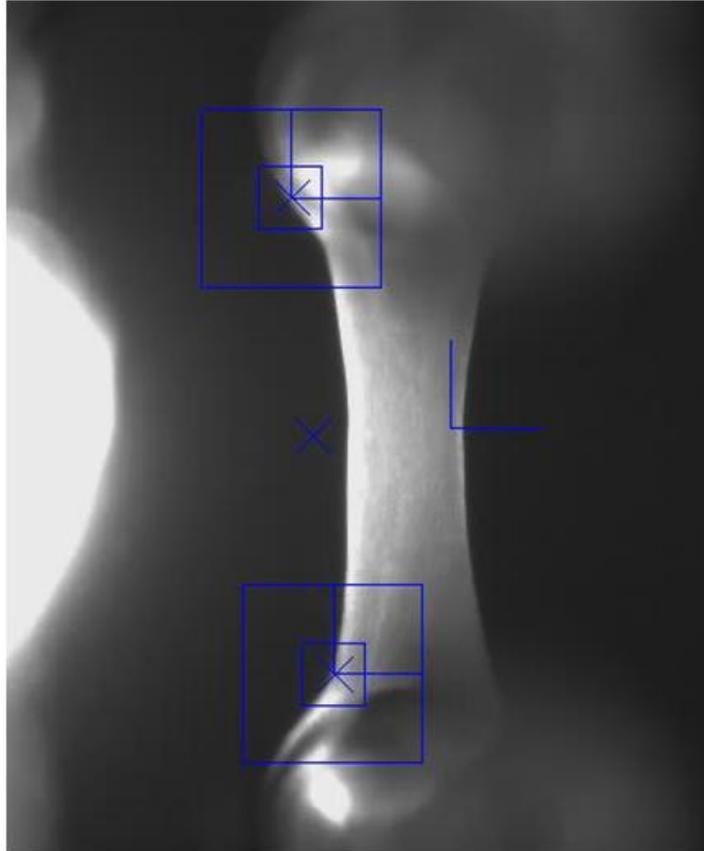


Abb. 2.9: Darstellung eines EHTs während der Messung im video-optischen System. Standbild eines rEHTs. Die blauen Kästchen dienen der Figurenerkennung und damit der Analyse der Kontraktionen der EHTs.

2.14 Pacing von künstlichem Herzgewebe

Die elektrische Stimulation der Herzgewebe erfolgte mit Hilfe des *S88X Dual Output Square Pulse Stimulator*. Pro Platte wurde eine Stromstärke von 380 mA benötigt, pro EHT demnach rund 16 mA.

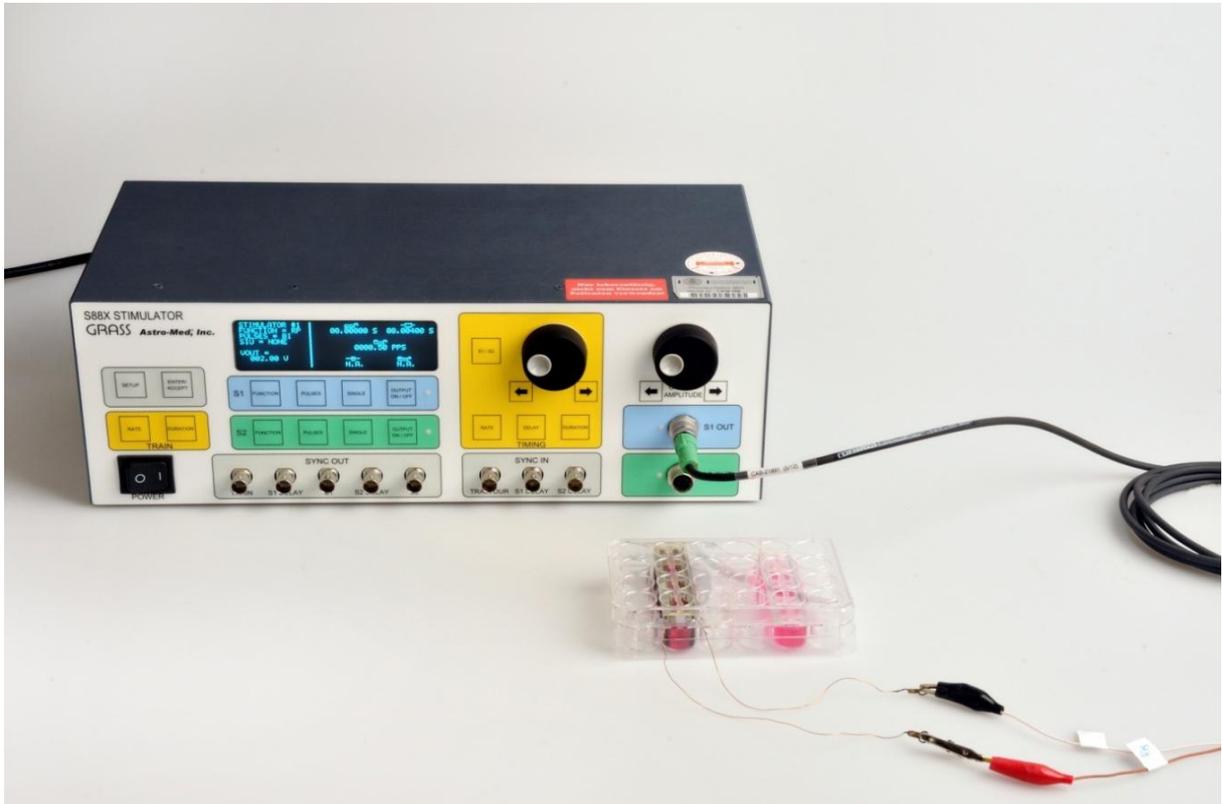


Abb. 2.10: Fotografische Darstellung des Versuchsaufbaus. Gezeigt ist der S88X Stimulator von GRASS. Über den *S1 Out*-Anschluss wird ein definierter elektrischer Impuls über ein Kabel, an dessen Ende zwei Krokodilklemmen angebracht sind, zu den parallel geschalteten *Pacing*-Einheiten geleitet. Links in der Platte sind vier EHTs mit Elektrodenpaaren zu sehen, rechts eine Silikonhalterung ohne Elektroden mit unstimulierten Kontrollen.

Die Messungen wurden wie folgt durchgeführt: Jeden zweiten Tag wurde das Medium der rEHTs, jeden Tag das Medium der hEHTs gewechselt. Am Tag des Mediumwechsels kam es auch zum Austausch der verwendeten *Pacing*-Einheiten (bestehend aus je vier Elektrodenpaaren). Die gebrauchten Einheiten wurden zunächst 48 h in destilliertem Wasser gereinigt (die Carbon-Elektroden ragten in das Wasser), wobei dieses zweimal täglich gewechselt wurde. Anschließend wurden sie bei 121 °C autoklaviert. Eine Besonderheit beim Mediumwechsel war, dass die stimulierten EHTs 2 ml Medium pro *Well* bekamen, wohingegen die Gewebe, die nicht stimuliert wurden, die üblichen 1,5 ml Medium erhielten. Der Zusatz von 0,5 ml

war der Tatsache geschuldet, dass die Silikonhalterungen samt Konstrukten auf den *Pacing*-Einheiten befestigt wurden, sodass die Gewebe weniger tief in die *Wells* reichten als gewöhnlich. Um zu gewährleisten, dass die stimulierten Gewebe trotzdem vollständig vom Medium umgeben sind und ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden, war die Zugabe nötig. Die Messungen wurden jeden Tag von Montag bis Freitag, unabhängig vom Tag des Elektroden- und Mediumwechsels, durchgeführt. Bevor die Platten mit den EHTs aus den Inkubatoren in die video-optische Messstation gestellt werden konnten, musste die Stimulation unterbrochen werden. Dort wurden die *Pacing*-Einheiten dann erneut an den Stimulator angeschlossen, allerdings blieb das *Pacing* zunächst unterbrochen. Die erste Messung erfolgte ohne Stimulation. Alle Gewebe wurden im ersten Durchlauf gemessen, sowohl die Kontrollen als auch die stimulierten Gewebe. Anschließend wurde der Stimulator angeschaltet und es folgte die ausschließliche Messung der stimulierten Gewebe unter *Pacing*. Nach Beendigung der Aufnahme musste der *Pacer* erneut ausgeschaltet werden und die EHTs wurden zurück in den Wärmeschrank gestellt. Für die Fortführung der Stimulierung wurde der Stimulator dann wieder bis zur nächsten Messung am folgenden Tag angeschaltet und die EHTs dauerhaft stimuliert.

2.14.1 Parameter für die Stimulation von rEHTs

Die aus Herzzellen von neugeborenen Ratten hergestellten EHTs wurden mit folgenden Einstellungen stimuliert:

Spannung: 2 V

Frequenz: 0,5 Hz

Impulsdauer: 4 ms

2.14.2 Parameter für die Stimulation von hEHTs

Die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen hergestellten EHTs wurden mit folgenden Einstellungen stimuliert:

Spannung: 2 V

Frequenz: 0,5 Hz / 1 Hz / 1,5 Hz / 2 Hz

Impulsdauer: 4 ms

Bei der Stimulation der humanen Herzgewebe kam es zur Austestung unterschiedlicher Spannungen und Frequenzen. Die Anpassungen waren nötig, um die ideale *Pacing*-Frequenz zu ermitteln, bei der der Einfluss auf die EHTs maximal war, was sich letztlich bei 2 Hz/1,5 Hz (siehe 3.3) zeigte. Die symmetrischen biphasischen Impulse von 4 ms (2 ms pro Richtung) wurden beibehalten. Durch den definierten Abstand von 1 cm zwischen jeweils einem Elektrodenpaar wurde bei einer Spannung von 2 V ein homogenes elektrisches Feld mit einer Feldstärke von 2 V/cm erzeugt.

2.15 Langzeit-*Pacing* von EHTs

Die dauerhafte Stimulation der künstlichen Herzgewebe erfolgte immer ab Tag vier nach Herstellung. Die Durchführung des Elektroden- und Mediumwechsels sowie der Messungen sind Punkt 2.14 zu entnehmen. Das Langzeit-*Pacing* erfolgte über mehrere Wochen. Die rEHTs wurden in der Regel für 18 Tage stimuliert. Alternativ hierzu wurden sie in einem Versuch für 33 Tage stimuliert, um die Effekte eines noch längeren Stimulationszeitraums zu untersuchen. Die hEHTs wurden über einen Zeitraum von 14, 22, 30 und 42 Tagen dauerhaft stimuliert.

2.16 Chemische Analyse des EHT-Mediums

Aufgrund der Inaktivität einiger EHTs bei ersten Versuchen zum Langzeit-*Pacing* (Einsatz der Carbon-Elektroden mit Messing-Gerüst) wurde untersucht, inwiefern die dauerhafte elektrische Stimulation zu toxischen Veränderungen im Medium führt, die von den eingesetzten Elektroden ausgehen könnten. Hierzu wurden je zwei EHTs pro Gruppe ausgewählt, die zuvor unter verschiedenen Bedingungen kultiviert wurden. Die erste Gruppe bestand aus zwei Kontrollen. Zwei weitere EHTs waren mit einer *Pacing*-Einheit versehen und nach 48 h elektrischer Stimulation weiterhin kontraktile. Die Gewebe der dritten Gruppe waren auch über 48 h dauerhaft stimuliert worden, zeigten allerdings anschließend weder Spontankontraktionen noch reagierten sie auf die elektrischen Stimuli.

Die chemischen Untersuchungen des Mediums wurden an der Technischen Universität Hamburg-Harburg (TUHH) mit freundlicher Unterstützung von Dipl. Ing. Sabine Koelling und Dipl. Ing. Joachim Kunze durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels optischer Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (OES-ICP).

2.17 Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) und Stimulation mit Isoprenalin

2.17.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK)

Die Bestimmung der Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Kalzium-KWK) und die Stimulation mit Isoprenalin (positive Inotropie) wurden mit einem modifizierten *IonOptix*-System durchgeführt. Mit Hilfe dieses Systems war es möglich, acht EHTs gleichzeitig zu untersuchen, vier Kontrollen und vier stimulierte Gewebe. Ziel war es, die Kraftzunahme der Konstrukte als Antwort auf steigende Kalzium-Konzentrationen im Medium zu messen. Über einen kontinuierlichen Zu- und Ablauf einer modifizierten Tyrode-Lösung konnte sichergestellt werden, dass die Perfusion und die damit einhergehende Kalzium-Konzentration in den *Wells* immer gleich war (vgl. Abb. 2.11).

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung:

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

2 Material und Methoden

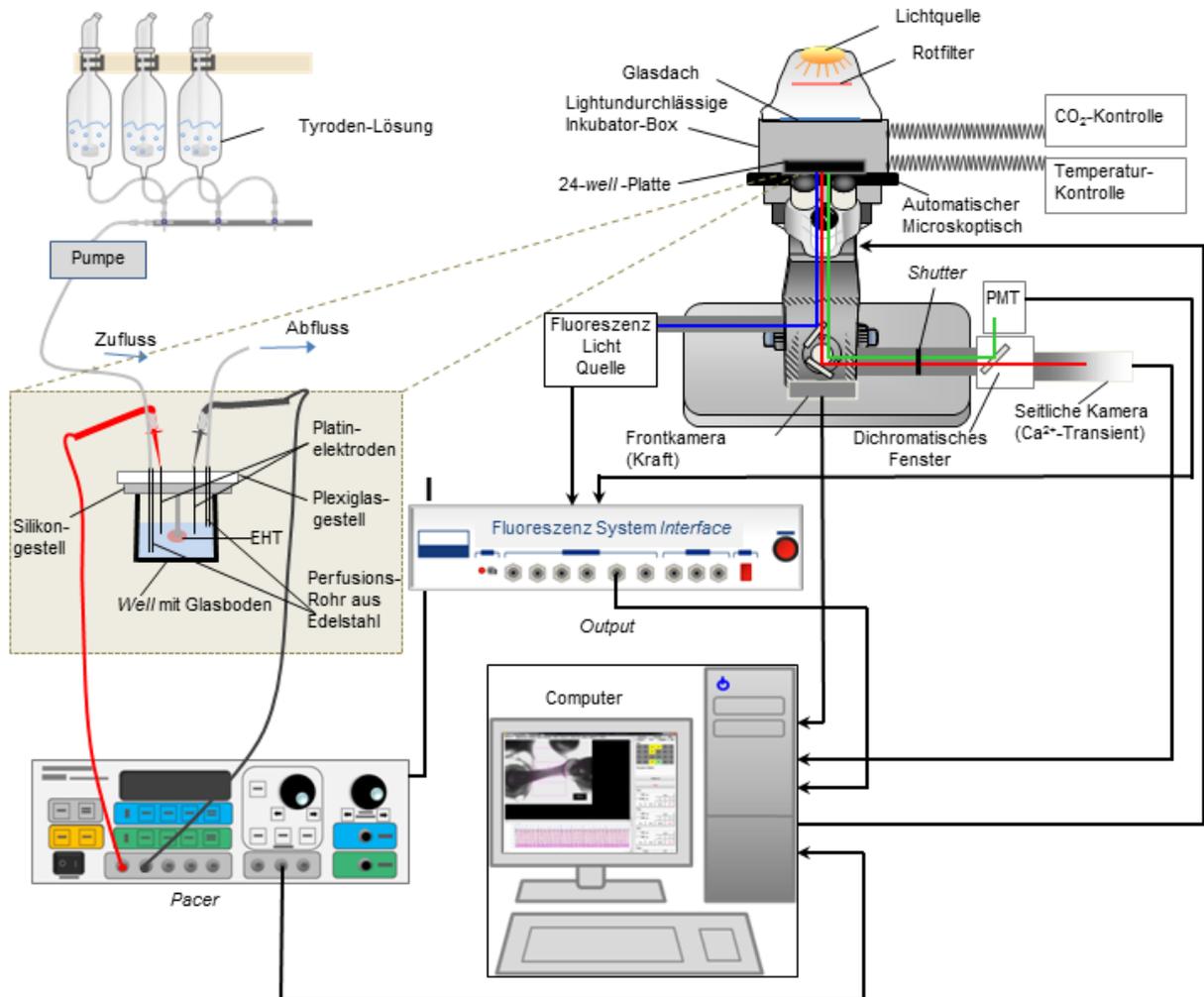


Abb. 2.11: Schematische Darstellung des modifizierten *IonOptix* Mehrkomponentensystems. Dargestellt ist das Prinzip des *IonOptix*-Systems mit seinen Komponenten. Modifiziert nach Stoehr et al. (2014).

Die eingesetzten Kalzium-Konzentrationen und die Zeitpunkte der Messungen zeigt die nachfolgende Tabelle.

Kalzium-Konzentration [mM]	Mess-Intervall [min]
0,05	5, 10, 15, 20
0,1	5, 10, 15, 20
0,2	5, 10, 15, 20
0,3	5, 10, 15, 20
0,4	5, 10, 15, 20
0,6	5, 10, 15, 20
1,0	5, 10, 15, 20
1,8	5, 10, 15, 20

Tab. 2.4: Eingesetzte Kalzium-Konzentrationen und Mess-Intervalle.

2.17.2 Stimulation mit Isoprenalin

Die Bestimmung der Krafterhöhung der EHTs als Reaktion auf die Stimulation mit Isoprenalin in einer Konzentration von 100 nM wurde direkt im Anschluss an die Messung der Kalzium-KWK vorgenommen. Hierfür wurden die Gewebe erneut mit 0,1 mM (Kalzium) Tyrode-Lösung perfundiert und Messwerte nach 5, 10, 15 und 20 Minuten als Basis-Messungen ermittelt. Anschließend wurde Isoprenalin in einer finalen Konzentration von 100 nM hinzugegeben und Veränderungen nach definierten Intervallen, wie in Tabelle 2.5 dargestellt, festgehalten.

Kalzium-Konzentration [mM] und Isoprenalin-Konzentration [100 nM]	Mess-Intervall [min]
0,1 + 100 nM	5, 10, 15, 20

Tab. 2.5: Eingesetzte Kalzium- und Isoprenalin-Konzentrationen sowie Mess-Intervalle.

2.18 Statistische Auswertungen

Die Ergebnisse werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of the Mean*, SEM) oder als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD). Mit n wurde die Anzahl der EHTs bzw. Einzelversuche/-proben bezeichnet. Die Analysen wurden mit der *GraphPad Prism Software 5.02* (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) durchgeführt. Als statistische Tests wurden der t-Test nach Student für ungepaarte Versuchsreihen (bei zwei parametrisch verteilten Gruppen) oder einfaktorierter ANOVA mit *Dunnett's Post Test* beziehungsweise *Tukey's Post Test* bei mehr als zwei parametrisch verteilten Gruppen) angewandt. Der Einfluss zweier unabhängiger Variablen wurde per zweifaktorieller ANOVA untersucht. Die Auswertung von 2 x 2 Kontingenztafeln erfolgte mit dem exakten Test nach Fisher. EC₅₀-Werte wurden per Kurvenanpassungsverfahren (*Curve Fitting*) ermittelt und mehrere EC₅₀-Werte per *Extra Sum-of-Squares F Test* miteinander verglichen. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet. Das Symbol * wurde für p-Werte < 0,05, ** für p-Werte < 0,01, *** für p-Werte < 0,001 und ns für nicht signifikante Ergebnisse verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Pacing* von künstlichem Herzgewebe

3.1.1 Etablierung eines Protokolls

3.1.1.1 Material

Als Vorbild für die Herstellung der *Pacing*-Einheiten dienten die industriell gefertigten *6-Well*-Elektroden *Nunclon*, *Corning*, *BD Falcon* der Firma *IonOptix*. Da das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Stimulierung von EHTs im *24-Well*-Format lag, galt es zunächst Einheiten zu entwickeln, die mit diesem Format kompatibel sind. Weitere entscheidende Voraussetzungen waren, dass ein Material für das Grundgerüst gefunden wird, welches eine optimale Leitfähigkeit (Konduktivität), allerdings keine toxischen Bestandteile aufweist, und welches wiederholte Autoklavierprozesse unbeschadet übersteht. Da die verwendeten Stangen, die als Gerüst dienten (siehe 2.8), keinen Kontakt zum Medium hatten, wurde die Frage nach der Toxizität zunächst vernachlässigt. Deshalb kam es zu Beginn der Versuche zum Einsatz von Messing-Stangen. Weitere wichtige Aspekte waren, dass die durch das *Pacing* der Gewebe im Medium entstehenden oxidativen Metabolite der hypochlorigen Säure (HOCl) zum Teil durch das Graphit abgefangen werden und dass wenig freie Sauerstoffradikale (Feletou und Vanhoutte 1987) entstehen, durch die es Schäden an den Geweben hätte kommen können. Ebenfalls entscheidend war, dass die Messbarkeit mit Hilfe des video-optischen Systems trotz *Pacings* weiterhin gegeben war.

Nach ersten weniger erfolgreichen *Pacing*-Versuchen mit Elektroden aus Platin-Draht wurde das Material gewechselt. Es kam fortan zum Einsatz von Graphit, auch Carbon genannt, welches absorbierende Eigenschaften besitzt (siehe oben). Die Verwendung von Carbon hat sich aufgrund positiver Testergebnisse etabliert, sodass dieses ab Generation III der *Pacing*-Einheiten für die Herstellung verwendet wurde (siehe 2.8.2). Um zu gewährleisten, dass die EHTs auch unter Einsatz der *Pacing*-Einheiten weiterhin in der video-optischen Messstation zu analysieren waren, musste darauf geachtet werden, dass der Lichteinfall der Dioden, die schräg unterhalb eines jeden *Wells* im System angebracht sind, nicht unterbrochen wurde und so ein mangelhafter Kontrast entstand, der die Messungen unmöglich gemacht

3 Ergebnisse

hätte. Dies wurde realisiert, indem die Graphitzuschnitte möglichst weit am Rand der *Wells* in das Medium ragten, sodass der Lichteinfall unbeeinflusst blieb (vgl. Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Fotografische Darstellung einer 24-Well-Platte mit und ohne eingesetzte *Pacing*-Einheit. Dargestellt ist der Vergleich zwischen dem Einsatz einer *Pacing*-Einheit zur Stimulation von vier EHTs und einer einfachen Silikonhalterung mit vier EHTs zur Kontrolle. Die eingebaute Einheit ist komplett kompatibel mit dem bestehenden 24-Well-Format.

3.1.1.2 Toxizität

Die zunehmende Inaktivität von EHTs unter dem Einsatz der *Pacing*-Einheiten mit Messing-Stangen legte nahe, dass die Feuchtigkeit in den Inkubatoren und die dadurch entstehende Kondensflüssigkeit Ursache dafür sein könnten, dass toxische Bestandteile des Messings (Blei, Kupfer und Zink) in das Medium gelangen, obwohl es keinen direkten Kontakt zwischen beidem gab. Untersuchungen im Chemischen Zentrallabor der Technischen Universität Hamburg-Harburg zeigten, dass es zu erheblichen Konzentrationszunahmen an Blei, Kupfer und Zink in den Medien kam, die mit den eingesetzten *Pacing*-Einheiten bzw. den Messing-Stangen indirekt in Berührung kamen (vgl. Tab. 3.1).

3 Ergebnisse

Probe	Zink (Zn) [mg/L]	Kupfer (Cu) [mg/L]	Blei (Pb) [µg/L]
48 h Kontrolle	0,17	0,23	<20
48 h Kontrolle	0,16	0,21	<20
48 h <i>Pacing</i> , nicht kontraktile	30,8	2,94	26
48 h <i>Pacing</i> , nicht kontraktile	71,6	1,16	220
48 h <i>Pacing</i> , kontraktile	0,74	0,49	36
48 h <i>Pacing</i> , kontraktile	0,76	0,61	49

Tab. 3.1: Chemische Analyse des EHT-Mediums. Vergleich des Gehalts von Zink, Kupfer und Blei im EHT-Medium. **48 h Kontrolle:** Kontrollen, die 48 h im Medium kultiviert wurden. **48 h *Pacing*, nicht kontraktile:** EHTs unter elektrischer Stimulation, die nach 48 h keine Kontraktionen zeigten. **48 h *Pacing*, kontraktile:** EHTs, die auch nach über 48 h Stimulation noch Kontraktionen zeigten.

Die Analyse wies darauf hin, dass durch zunehmende Kontamination des EHT-Mediums mit Zink, Kupfer und Blei die Aktivität und Kontraktilität der Herzgewebe deutlich abnimmt. Die gewonnenen Erkenntnisse haben gezeigt, dass das bisher verwendete Messing nicht das optimale Material war. Tabelle 3.2 zeigt eine Vielzahl an potenziell einsetzbaren Materialien.

3 Ergebnisse

Material	„Einordnung“	σ in S/m
Silber	Metall	$61,39 \cdot 10^6$
Kupfer	Metall	$\geq 58,0 \cdot 10^6$
Aluminium	Metall	$36,59 \cdot 10^6$
Messing (CuZn37)	Metall	$\approx 15,5 \cdot 10^6$
Eisen	Metall	$10,02 \cdot 10^6$
Chrom	Metall	$8,74 \cdot 10^6$
Blei	Metall	$4,69 \cdot 10^6$
Titan (bei 273 K)	Metall	$2,56 \cdot 10^6$
Edelstahl (1.4301)	Metall	$1,4 \cdot 10^6$
Carbon (Graphit)	Nichtmetall	$3 \cdot 10^6$

Tab. 3.2: Elektrische Leitfähigkeit (σ in S/m) ausgewählter Materialien bei einer Temperatur von 300 K (circa 27 °C). Neben der guten Leitfähigkeit spielte insbesondere die biologische Verträglichkeit (nicht gegeben bei zum Beispiel Aluminium oder Kupfer) als auch die Kostenfrage eine wichtige Rolle (sehr kostenintensiv sind zum Beispiel Titan und Silber).

Aufgrund seiner Verwendung in der Medizintechnik und der damit verbundenen biologischen Verträglichkeit kam es fortan zur Verwendung von Edelstahl. Darüber hinaus bestand durch die wiederholten Autoklavierprozesse bei Edelstahl eine geringere Oxidationsgefahr als bei Messing, bei dem Oxidationsprozesse häufig beobachtet werden konnte. Allerdings war der verwendete 1.4301 Edelstahl besonders hart, wodurch die Bearbeitung erschwert und nur mit Einsatz gehärteter Bohrer und Gewindeschneider praktikabel war. Nichtsdestotrotz zeigte sich schon in den ersten Langzeit-*Pacings* mit den neuen *Pacing*-Einheiten, dass das Material sehr gut geeignet war.

3.1.1.3 Spannung, Frequenz und Impulsdauer für rEHTs

Zur Etablierung eines geeigneten Protokolls zur Langzeit-Stimulierung der Herzgewebe war es nötig, die optimalen Einstellungen zu ermitteln. Die in der Literatur beschriebenen Parameter waren allesamt auf künstliches Herzgewebe bezogen, das nicht unseren EHTs entsprach. Deshalb galt es in ersten Versuchen zu bestimmen, welche Spannung, Frequenz und Impulsdauer für die kontinuierliche Stimulation unserer Herzmuskelgewebe am besten geeignet waren. Die rEHTs zeigten Spontankontraktionen mit einer Frequenz von circa 4-5 Hz. Zudem schlugen

3 Ergebnisse

sie nicht durchgehend, sondern in Salven. Es kam circa alle 10-30 Sekunden zu Ruhephasen, die durch Phasen mit Spontankontraktionen etwa der gleichen Zeit abgelöst wurden.

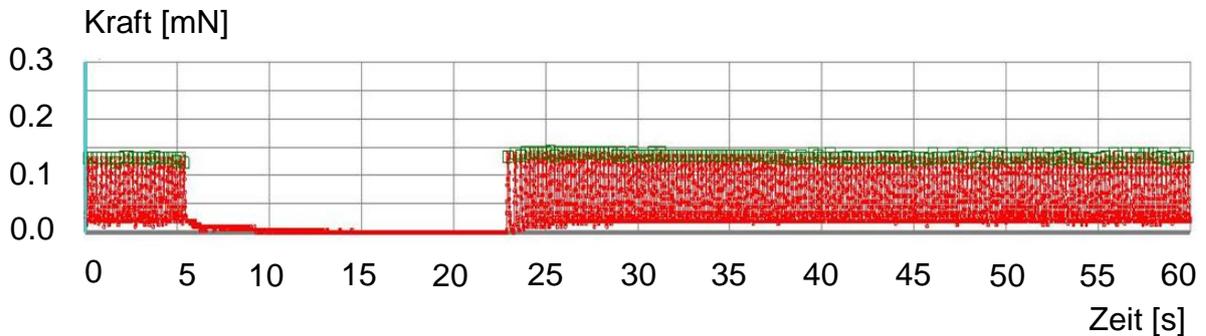


Abb. 3.2: Auswertung einer video-optischen-Aufnahme eines rEHTs. Zu sehen ist das charakteristische Kontraktionsmuster eines rEHT in der video-optischen Messung. Das zunächst konstante Frequenzmuster wird durch eine circa 10-30 Sekunden lange Ruhepause unterbrochen, ehe es zum Einsetzen einer erneuten Salve kommt. Bei elektrisch stimulierten Herzgeweben fallen die kontinuierlichen Schläge in der vorgegeben 0,5 Hz-Frequenz in die Ruhephase.

Aufgrund der gezeigten Spontanaktivität der EHTs mit hoher Eigenfrequenz bestand die Annahme, dass eine *Pacing*-Frequenz oberhalb der genannten Spontanfrequenzen auf Dauer als nicht sinnvoll anzusehen war. Diese Hypothese bestätigte sich in ersten Experimenten, in denen je vier EHTs mit definierten Frequenzen von 3 Hz und 5 Hz über insgesamt 294 Minuten stimuliert wurden. Demgegenüber standen vier EHTs als Kontrollgruppe, welche keiner Stimulation ausgesetzt waren (vgl. Abb. 3.3). Es zeigte sich, dass die Kontrollen erwartungsgemäß keine Einbußen ihrer Kraftentwicklung binnen des gemessenen Zeitraums entwickelten. Die mit 3 Hz stimulierten Gewebe hingegen zeigten schon von Beginn der Stimulation an eine Abnahme ihrer Kräfte. Nach 252 Minuten erreichten die EHTs einen Tiefpunkt, der im weiteren Verlauf nicht unterschritten wurde. Die Konstrukte, die mit 5 Hz stimuliert wurden, begannen noch deutlicher an Kraft zu verlieren. Bereits nach 224 Minuten waren die Kontraktionen so unregelmäßig und schwach, dass die Aufnahmen durch das video-optische System nicht mehr auszuwerten waren und somit keine adäquate Kraftmessung mehr möglich war. Aus diesem Grund wurde initial eine Frequenz von 0,5 Hz für das *Pacing* über einen sehr langen Zeitraum gewählt. Diese Frequenzeinstellung etablierte sich, sodass sie auch im endgültigen *Pacing*-Protokoll Bestand hatte.

3 Ergebnisse

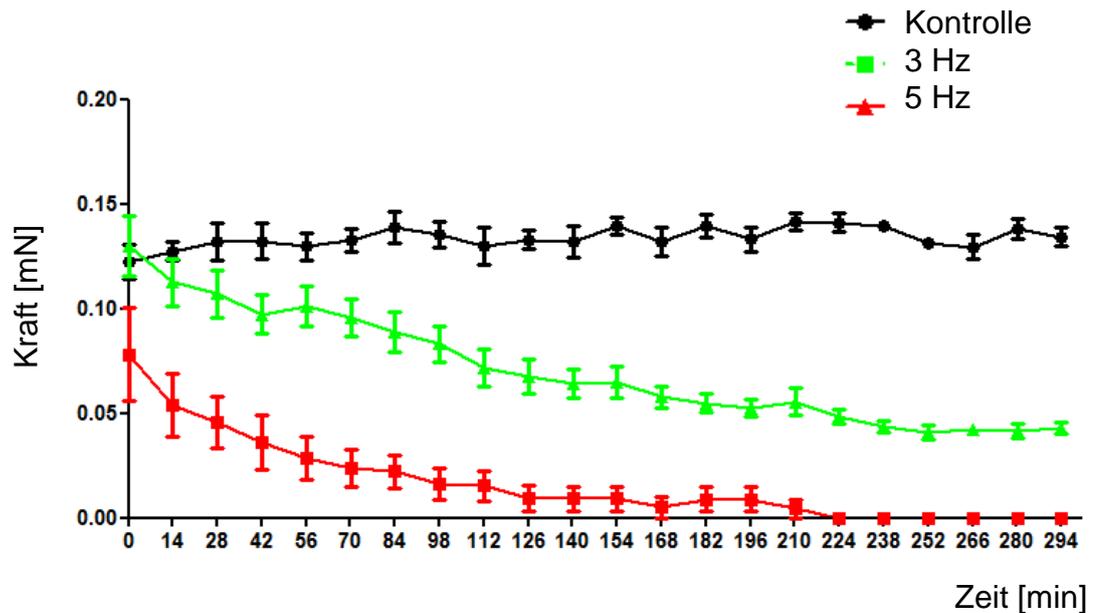


Abb. 3.3: Einfluss elektrischer Stimulation unterschiedlicher Frequenzen auf die Kraftentwicklung der rEHTs über die Zeit. Vergleich der Kraftentwicklung von vier Kontrollen gegenüber jeweils vier EHTs, die entweder mit 3 Hz oder mit 5 Hz über 294 Minuten stimuliert wurden. Je höher die Frequenz, desto schneller verloren die Gewebe an Kraft.

Der Parameter, an dem am meisten modifiziert wurde, war die Spannung. Die in der Literatur verwendeten Spannungen liegen bei 3-8 V. Die entsprechenden Feldstärken lassen sich wie folgt berechnen:

$$\text{Feldstärke } E = \frac{\text{eingesetzte Spannung } U}{\text{Abstand der Elektroden } d}$$

Demnach lagen die Feldstärken (je nach Abstand der Elektroden zueinander) bei 3 V/cm (Tandon et al. 2011) und 4 V/cm (Lasher et al. 2012), wobei der Schwellenwert der elektrischen Feldstärke jeweils im Bereich von etwa 2 V/cm lag. Mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einer Impulsdauer von 4 ms wurde die Spannung von 1 V in 0,1 V-Schritten erhöht, bis die EHTs in der video-optischen Messstation kohärente Kontraktionen als Antwort auf jedes *Pacing*-Signal zeigten. Der ermittelte Schwellenwert, bei dem jeder Impuls zu einer vollständigen und regelmäßigen Kontraktion führte, lag bei 1,82 V. Um in den anschließenden Versuchen sicher gehen zu können, dass die Konstrukte immer ausreichend stimuliert werden, wurden 2 V als optimale Spannung gewählt. Die Feldstärke lag entsprechend bei 2 V/cm. Die eingesetzte Impulsdauer von 4 ms wurde beibehalten. Zudem wurde mit

3 Ergebnisse

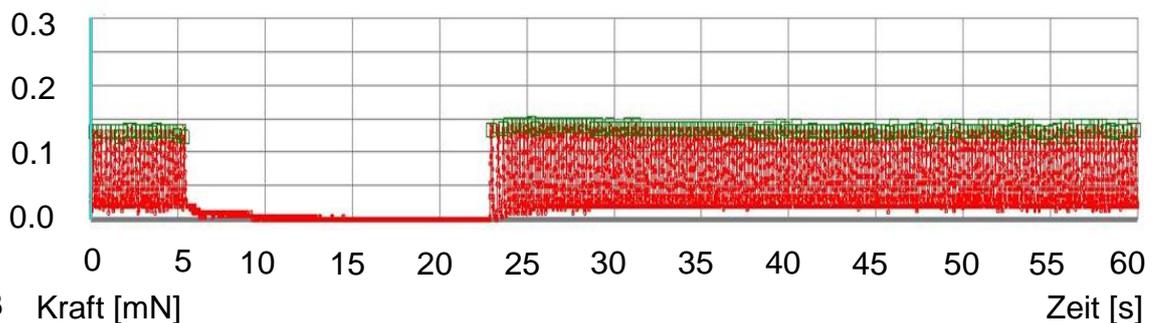
symmetrischen biphasischen Impulsen gearbeitet. Somit ergaben sich folgende Einstellungen der Parameter:

Spannung: 2 V

Frequenz: 0,5 Hz

Impulsdauer: 4 ms

A Kraft [mN]



B Kraft [mN]

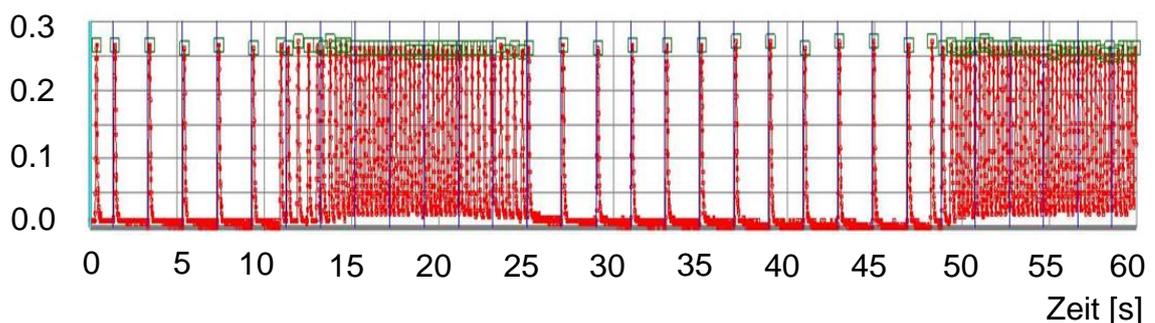


Abb. 3.4: Pacing von rEHTs. Video-optische Messungen mit den oben genannten Einstellungen. (A) EHTs mit Spontankontraktionen ohne *Pacing*. (B) Durch das *Pacing* kommt es in den freien Intervallen zu regelmäßigen Kontraktionen in der vorgegebenen Frequenz. Die senkrechten blauen Linien entsprechen den elektrischen Impulsen.

3.1.1.4 Spannung, Frequenz und Impulsdauer für hEHTs

Humane EHTs zeigten kontinuierliche Spontankontraktionen ab Tag drei bis fünf nach Herstellung. Allerdings schlugen die EHTs mit einer deutlich niedrigeren Frequenz von circa 0,8 bis 2,0 Hz, wobei eine Abnahme mit zunehmendem Alter der Gewebe beobachtet werden konnte. Die Durchführung des *Pacings* der hEHTs im Vergleich zu den rEHTs unterschied sich lediglich in der eingesetzten *Pacing*-Frequenz. Zur Austestung unterschiedlicher Frequenzen wurden Testmessungen durchgeführt. Hierbei wurde mit 0,5 Hz, 1 Hz, 1,5 Hz und 2,0 Hz stimuliert. Es zeigte sich, dass die humanen EHTs auf jeden elektrischen Impuls mit einer Kontraktion reagierten, wobei bei den niedrigen Frequenzen weiterhin spontane

3 Ergebnisse

Zwischenkontraktionen auszumachen waren. Um eine dauerhafte Überstimulation der Gewebe zu gewährleisten (die Frequenz des *Pacings* ist höher als die der Spontankontraktionen) musste die eingesetzte *Pacing*-Frequenz der Frequenz der spontanen Kontraktionen angepasst werden. Somit erfolgte die Stimulation für die ersten sieben Tage mit einer Frequenz von 2 Hz und wurde anschließend den abnehmenden Spontankontraktionen angepasst und auf 1,5 Hz gesenkt. Demnach ergaben sich die unter Punkt 2.14.2 genannt Einstellungen zur dauerhaften Stimulation der humanen EHTs.

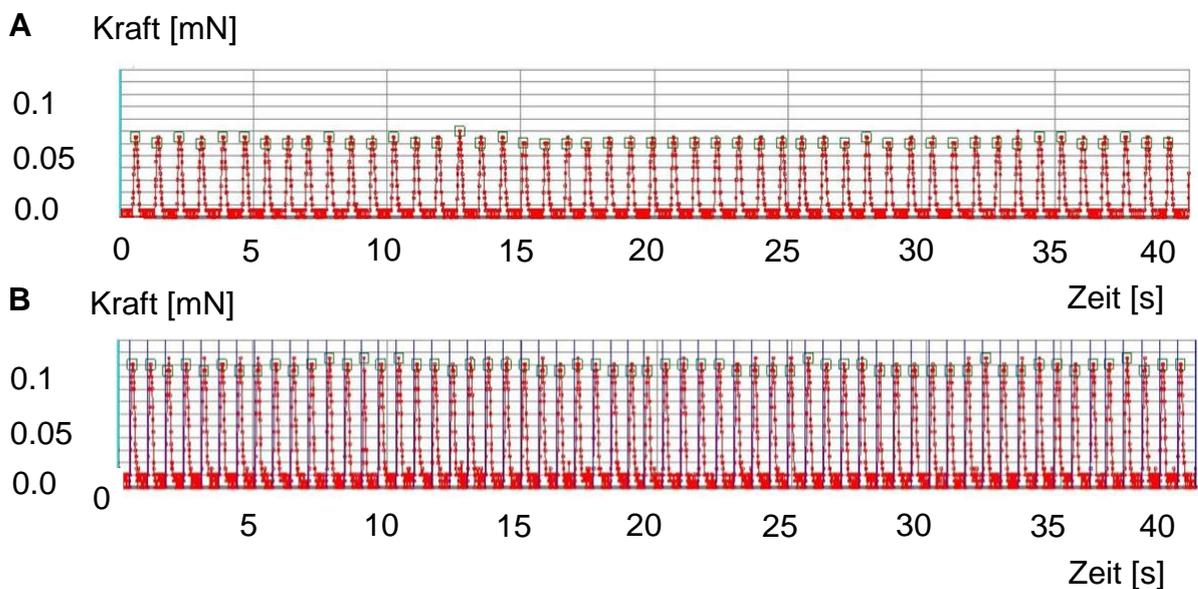


Abb. 3.5: *Pacing* humaner EHTs mit 1,5 Hz. Zu sehen sind video-optische Messungen von 2 hEHTs. (A) Ohne Stimulation und (B) unter *Pacing* bei einer Frequenz von 1,5 Hz. Jedem Impuls (blaue Linie) folgt unmittelbar eine Kontraktion.

3.2 Stimulation von rEHTs

Die rEHTs wurden dauerhaft nach obenstehendem Protokoll stimuliert. Ungefähr sieben Tage nach Beginn des *Pacings* zeigten sich erste deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollen und den dauerhaft stimulierten EHTs.

3.2.1 Funktionelle Parameter

Im Folgenden wird auf die wesentlichen Parameter und ihre Veränderungen durch die dauerhafte elektrische Stimulation eingegangen, wie sie mit dem video-optischen System erfasst wurden. Weitere Auswertungen finden sich im Anhang unter 10.1.

3.2.1.1 Kräfte

Das Langzeit-*Pacing* der EHTs führte zu einem signifikanten Anstieg der Kräfte. Dieser wurde circa sieben Tage nach Beginn der dauerhaften Stimulation durch die

3 Ergebnisse

Analysen im video-optischen System sichtbar. Insgesamt wurden fünf Durchgänge einer dauerhaften elektrischen Stimulation der rEHTs durchgeführt, welche sich lediglich durch die Zeitdauer des *Pacings* unterschieden. Dabei war besonders interessant zu beobachten, dass die stimulierten EHTs nachhaltig stärker waren, also auch, wenn ihnen zur Zeit der Messung keine elektrischen Impulse zugeführt wurden.

Die Langzeit-*Pacings* Nr. I und II dauerten jeweils 22 Tage. Nach 18 Tagen des *Pacings* zeigten die kontinuierlich stimulierten EHTs 85-90% höhere Kräfte (vgl. Abb. 3.6A + B). Die normalisierte Kraft pro Querschnittsfläche verdreifachte sich sogar (vgl. Abb. 3.6C). Nimmt man alle fünf Serien zusammen, entwickelten die kontinuierlich stimulierten EHTs 2,2-fach höhere Kräfte (0,26 mN, n = 50) als die Kontrollen (0,12 mN, n = 46; gemessene Werte zwischen dem 20-22 Tag der Kultur). Das Langzeit-*Pacing* Nr. III sollte die Frage beantworten, ob es ebenfalls möglich ist, die EHTs über einen sehr langen Zeitraum dauerhaft zu stimulieren. Es zeigte sich, dass die stimulierten EHTs nach 36 Tagen in Kultur signifikant höhere Kräfte als die gleich lang kultivierten EHTs hatten, die als Kontrollgruppe nicht stimuliert wurden (vgl. Abb. 10.1). Zudem war keine abnehmende Tendenz zu beobachten, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Gewebe auch noch länger hätten stimuliert werden können. Die EHTs der Kontroll-Gruppe verloren im Laufe des Versuchs deutlich an Kontraktionskraft, sodass ihre Kräfte sowie die weiteren kontraktiven Parameter in den video-optischen Messungen teilweise nicht mehr zu erfassen waren. Die Langzeit-*Pacings* Nr. IV und V erfolgten wiederum über den etablierten Zeitraum von circa drei Wochen. Die im Folgenden dargestellten Graphen beziehen sich auf die erste durchgeführte Serie von rEHTs. Alle weiteren Daten sind dem Anhang unter Punkt 10.1.1 zu entnehmen.

3 Ergebnisse

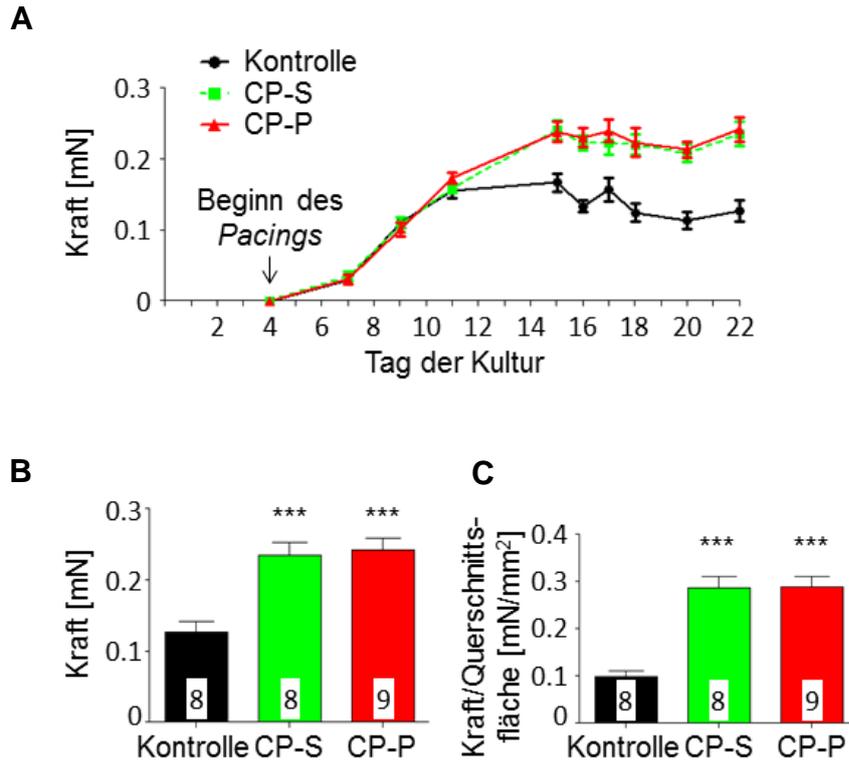


Abb. 3.6: Einfluss von elektrischer Stimulation mit 0,5 Hz auf die Kraftentwicklung von rEHTs. Vergleich der Kraftentwicklung von 8 Kontrollen gegenüber 8-9 (abhängig davon, ob im unstimulierten Zustand Spontankontraktionen zu messen waren) stimulierten EHTs. (A) Kraftentwicklung der Gewebe über die Zeit. (B) Kontraktionskraft am Tag 22. (C) Normalisierung der Kontraktionskraft zur Querschnittsfläche der EHTs am Tag 22. Die Stimulation wurde am vierten Tag nach Herstellung der Gewebe gestartet. In allen Langzeit-*Pacings* zeigte sich bei den stimulierten EHTs ein signifikanter Kraftanstieg im Vergleich zu den Kontrollen.

3.2.1.2 Frequenzen

Die Frequenzen der EHTs wurden über den gesamten Zeitraum der Langzeit-Messungen mit jeder Aufnahme erfasst und ausgewertet. Am Tag acht der Kultivierung zeigten alle Gewebe die höchste spontane Frequenz von ungefähr 200 Schlägen pro Minute. Alle EHTs, stimuliert oder nicht, zeigten mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Frequenz. Das erste Langzeit-*Pacing* gab Hinweise darauf, dass die elektrische Stimulation auf Dauer dazu führen könnte, dass die EHTs ihre Spontankontraktionen verlieren, wobei sie trotzdem weiterhin vollkommen elektrisch erregbar sind (vgl. Abb. 3.7A). Dies konnte in den nachfolgenden Durchgängen nicht konstant bestätigt werden. Tatsächlich kam es im Langzeit-*Pacing* Nr. I und Nr. III zum Ende des Stimulationszeitraums zu einer stärkeren Frequenzabnahme in der Gruppe der stimulierten EHTs. Die anderen Langzeit-*Pacings* zeigten dieses Phänomen nicht. Insbesondere an Tagen, an denen das EHT-Medium gewechselt

3 Ergebnisse

wurde, schlugen alle EHTs mit einer höheren Frequenz. Das Ausbleiben von Spontanfrequenzen bei den stimulierten EHTs war deshalb vornehmlich an Tagen zwischen den Medienwechseln zu beobachten. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Verlust der spontanen Kontraktionen in der Gruppe der stimulierten EHTs häufiger war als bei den Kontrollen (vgl. Abb. 3.7B). Darüber hinaus war die Schlagfrequenz der am Tag 15 gemessenen stimulierten EHTs innerhalb der *Bursts* ebenfalls geringer (Kontrolle: 3,89 Hz; CP-S: 3,28 Hz; CP-P: 3,35 Hz).

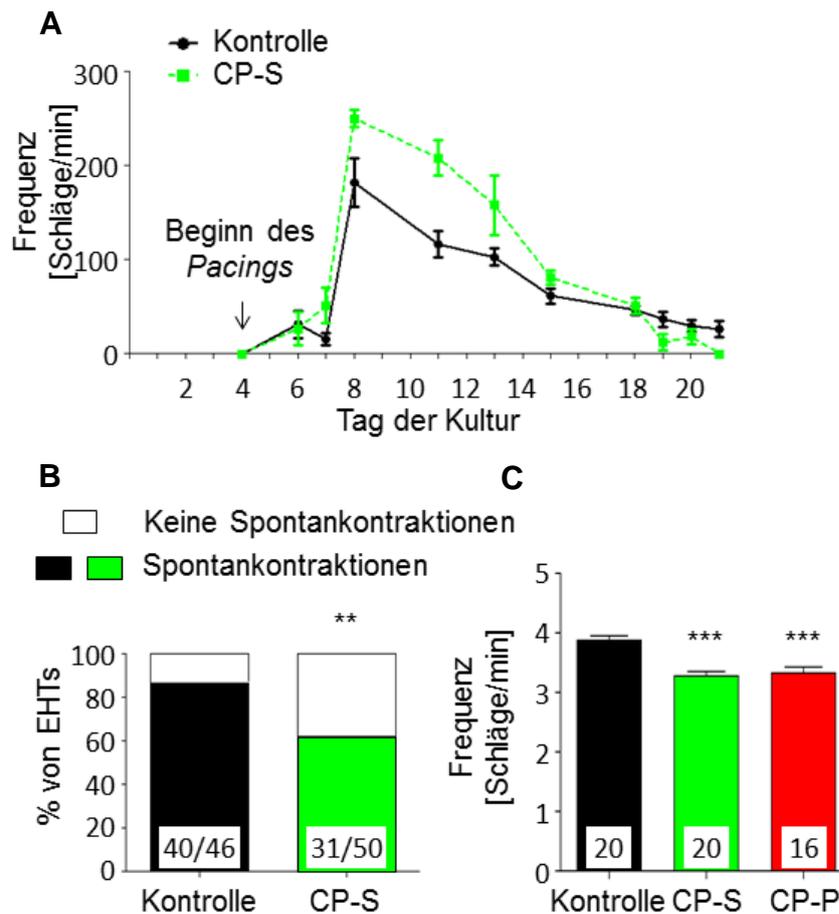


Abb. 3.7: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Frequenzentwicklung. (A) Typische Frequenzentwicklung von rEHTs unter dauerhafter elektrischer Stimulation. (B) Prozentualer Anteil von EHTs (aus fünf unabhängigen Versuchsserien), die weiterhin am letzten Tag des Experiments (Tag 21-36) spontan schlugen oder keine Spontankontraktionen mehr zeigten. (C) Schlagfrequenz während der einzelnen *Bursts* am Tag 15 der Kultur.

3.2.2 Morphologische Veränderungen

Während der Kulturdauer und unter permanenter elektrischer Stimulation der künstlichen Herzmuskelgewebe kam es zu einer zunehmenden Veränderung der Morphologie. Zur Verdeutlichung der morphologischen Veränderungen erfolgte die Analyse von ausgewählten EHTs. Sowohl der Durchmesser als auch die Ausgangslänge (Abstand der beiden Silikonhalterungen zueinander beim komplett relaxierten Gewebe) der EHTs wurden an den Tagen vier, zwölf und 21 nach Herstellung gemessen und ausgewertet. Ersterer veränderte sich sowohl bei den Kontrollen als auch bei stimulierten EHTs, wobei eine größere Abnahme des Durchmessers bei den stimulierten EHTs zu sehen war (Kontrolle: -41,4%; *Paced*: -47,2%). Diese Abnahme war mit dem zunehmenden Abbau der extrazellulären Fibrin-Matrix der Gewebe zu begründen, der durch die dauerhafte Stimulation begünstigt gewesen zu sein schien. Noch deutlichere Unterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe zeigte sich bezüglich der Ausgangslänge. Die stimulierten Gewebe verkürzten sich signifikant weniger als die Kontrollen und waren um 53% länger (Kontrollen: 2,8 mm; *Paced*: 4,3 mm; vgl. Abb. 3.8).

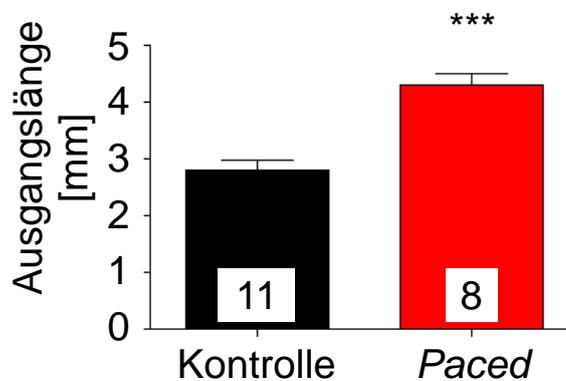


Abb. 3.8: Ausgangslänge von rEHTs (Messung der passiven Steifheit der Gewebe). Die Länge der EHTs (gemessen als Abstand zwischen den beiden inneren Rändern der Silikonhalterungen) wurde an Tag 21 der Kultivierung gemessen (nach 17 Tagen kontinuierlicher Stimulation). Die Kontrollen hatten eine durchschnittliche Ausgangslänge von 2,8 mm und die stimulierten rEHTs von 4,3 mm (+ 53%).

3.2.3 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der EHTs zeigte einige Unterschiede zwischen unbehandelten und dauerhaft elektrisch stimulierten Herzgeweben. Die Ergebnisse korrelierten sehr gut mit den funktionellen Daten der künstlichen Gewebe, wie sie bereits gezeigt wurden.

3.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die elektrische Stimulation der EHTs führte zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Kardiomyozyten im gesamten Konstrukt. In den nicht stimulierten EHTs fanden sich die Kardiomyozyten hauptsächlich im Randbereich, zentrale Kardiomyozyten erschienen atroph mit kleinem Zellkern. Bei den stimulierten Geweben dominierte das Bild länglicher Zellkerne, die von stark elongierten, plasmareicheren Kardiomyozyten umgeben waren, was als ein Zeichen von Ausreifung gesehen werden kann.

3 Ergebnisse

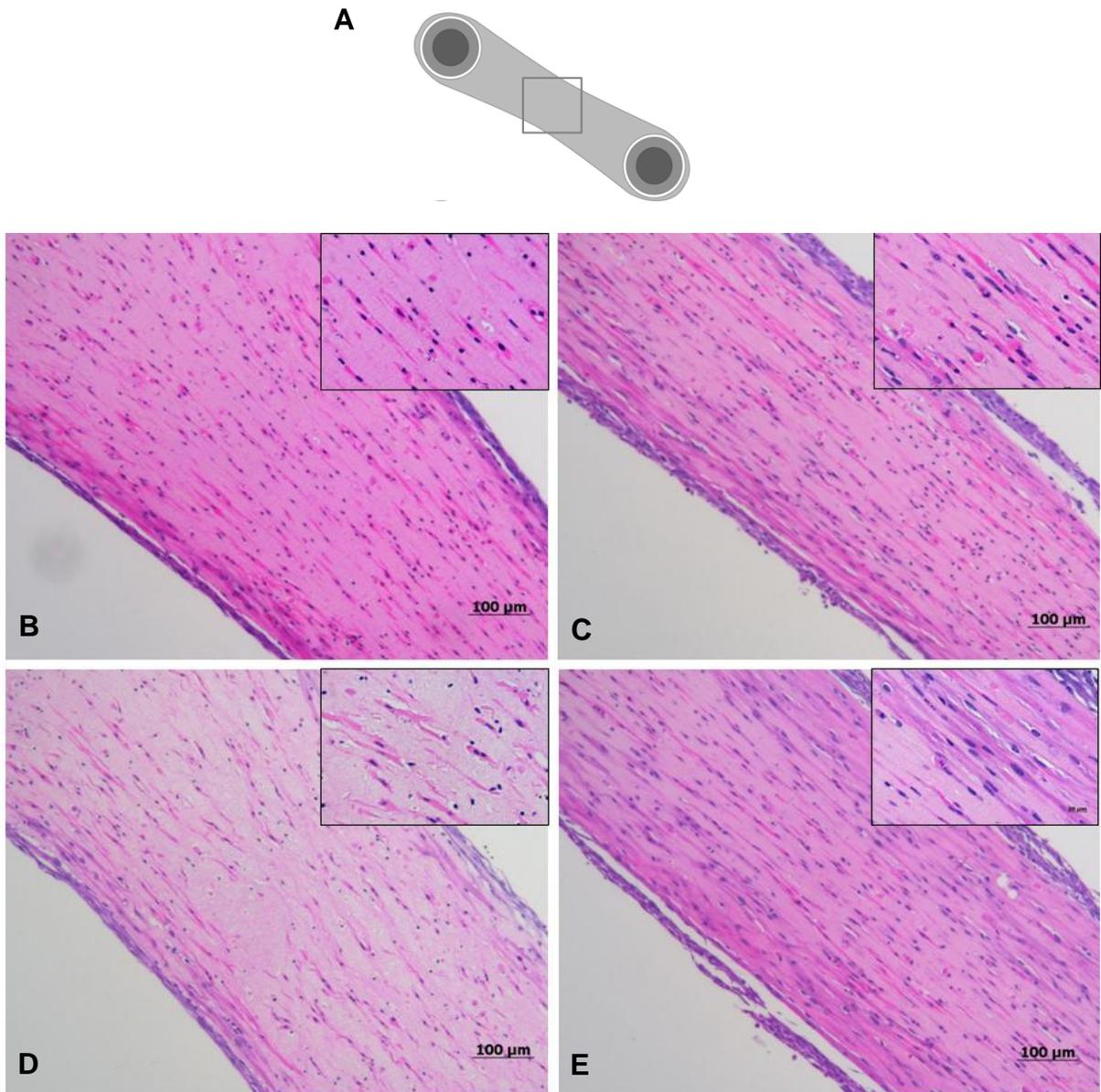


Abb. 3.9: HE-Färbungen von rEHTs. (A) Piktogramm eines rEHT mit der Lokalisation der gezeigten Ausschnitte (B, C, D, E). Kontrollen (B und D) und stimulierte EHTs (C und E) in jeweils 10-facher Vergrößerung. Zusätzliche 40-fache Aufnahme des inneren Bereichs. Die Abnahme des Durchmessers der dauerhaft elektrisch stimulierten EHTs ist zu erkennen, ebenso die elongierten Kardiomyozyten in den inneren Schichten des Gewebes.

3.2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde mit Antikörpern gegen Myosin-Leichte-Kette-2-atrial, Myosin-Leichte-Kette-2-ventrikulär und Connexin-43 durchgeführt. Zur Austestung der Qualität und der richtigen Antikörperkonzentrationen wurden zunächst Probefärbungen an Herzen erwachsener Ratten sowie später an Herzen neugeborener Ratten (vgl. Abb. 3.10) angefertigt. Alle Testläufe verliefen erfolgreich und die Antikörper konnten problemlos eingesetzt werden.

3.2.4.1 Myosin-Leichte-Kette-2-atrial (MLC-2a) und -2-ventrikulär (MLC-2v)

Erste immunhistochemische Färbungen von Herzen erwachsener und neugeborener Ratten zeigten ein selektives Färbungsmuster der beiden verwendeten Antikörper gegen MLC-2a und MLC-2v.

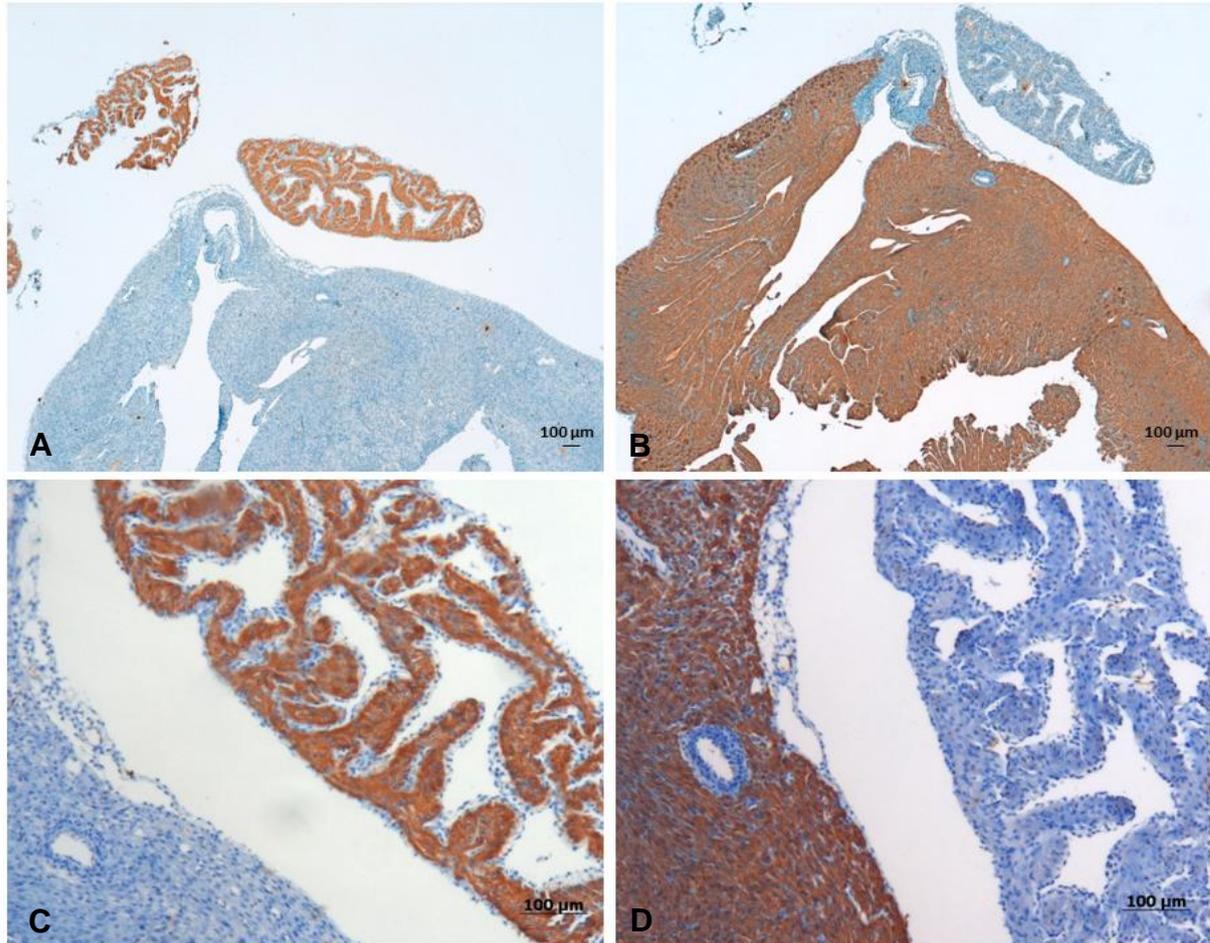


Abb. 3.10: Immunhistochemische Färbungen von Herzen neugeborener Ratten für MLC-2a und MLC-2v. Die selektive Färbung von Vorhof und Ventrikel in der Übersichtsaufnahme mit 4-facher Vergrößerung (A und B) und 10-facher Vergrößerung (C und D).

Nach erfolgreicher Austestung der Antikörper wurden die EHTs gefärbt. Eine erste Färbung für MLC-2a hatte darauf hingewiesen, dass die Anzahl an MLC-2a positiven Zellen in den dauerhaft elektrisch stimulierten EHTs abnimmt. Dieser Isoformen-Wechsel von MLC-2a positiven zu MLC-2v positiven Kardiomyozyten bestätigte sich in späteren Färbungen, wie nachfolgend sichtbar, nicht. Die MLC-2v positiven Zellen (Kardiomyozyten) hingegen zeigten ein deutlich höheres Vorkommen, waren in den stimulierten EHTs gegenüber den nicht stimulierten Geweben größer und es wurde eine deutliche Querstreifung der EHTs sichtbar (vgl. Abb. 3.11).

3 Ergebnisse

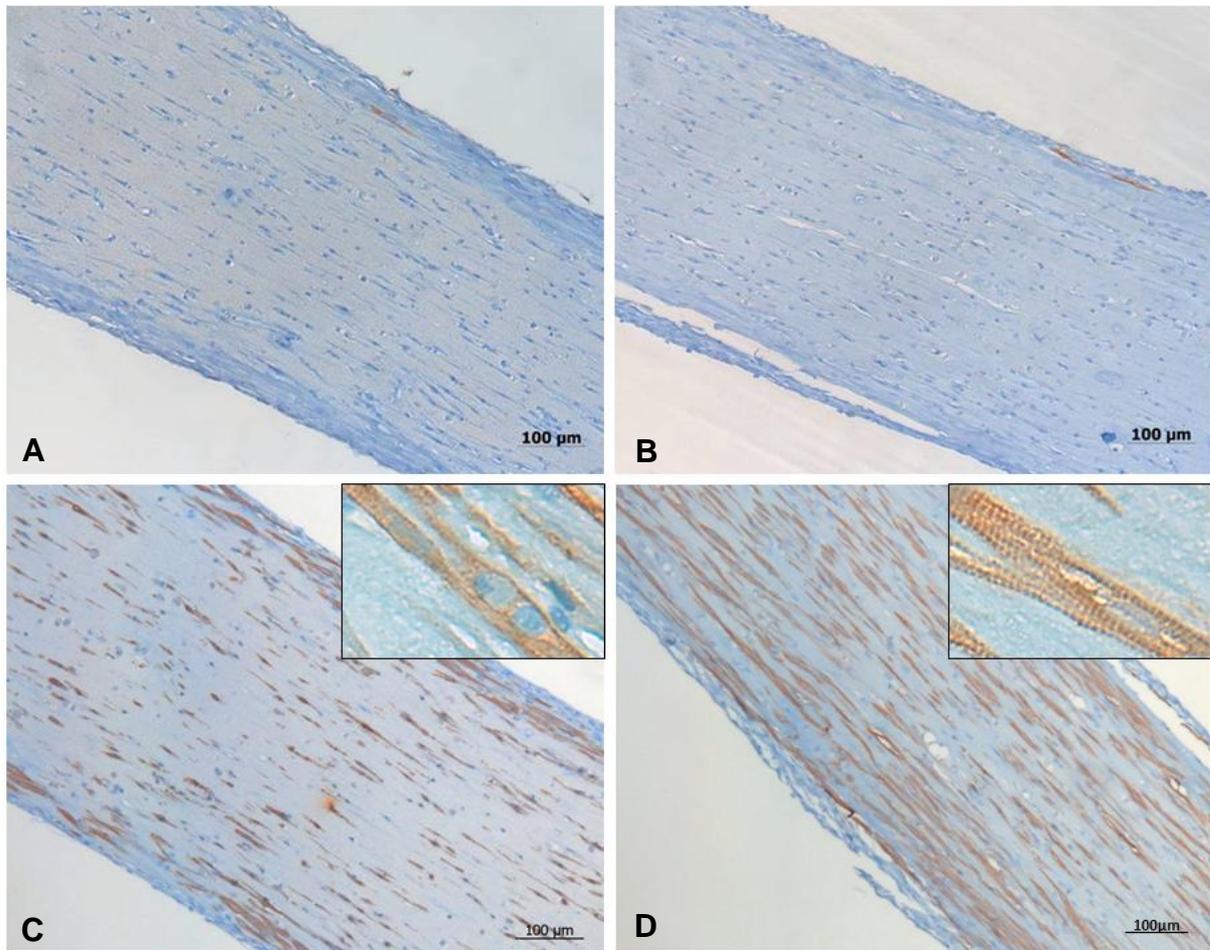


Abb. 3.11: Immunhistochemische Färbungen von reHTs für MLC-2a und MLC-2v. Es sind keine Unterschiede in der selektiven Anfärbung von Kardiomyozyten für MLC-2a zwischen Kontrollen und stimulierten EHTs sichtbar (A und B). Die Anzahl und Größe der durch MLC-2v angefärbten Herzzellen nimmt bei den elektrisch stimulierten Geweben gegenüber den Kontrollen deutlich zu (C und D). Zudem ist bei höherer Vergrößerung eine deutliche Querstreifung der Kardiomyozyten in der Gruppe der stimulierten Gewebe zu erkennen (D).

Die Analyse der Immunhistochemie der reHTs in Bezug auf den Feret-Durchmesser zeigte eine absolute und relative (dargestellt als Verhältnis von maximalem zu minimalem Feret-Durchmesser) Längenzunahme der Kardiomyozyten (vgl. Abb. 3.12A + B). Die Auswertung der Ausrichtung der Kardiomyozyten (gemessen als Winkel zwischen der Horizontalebene und des maximalen Feret-Durchmessers der Kardiomyozyten innerhalb des EHTs) ergab eine geringere Varianz (vgl. Abb. 3.12C). Darüber hinaus nahm die kontraktile Masse (Kardiomyozyten) im Verhältnis zur EZM zu (vgl. Abb. 3.12D).

3 Ergebnisse

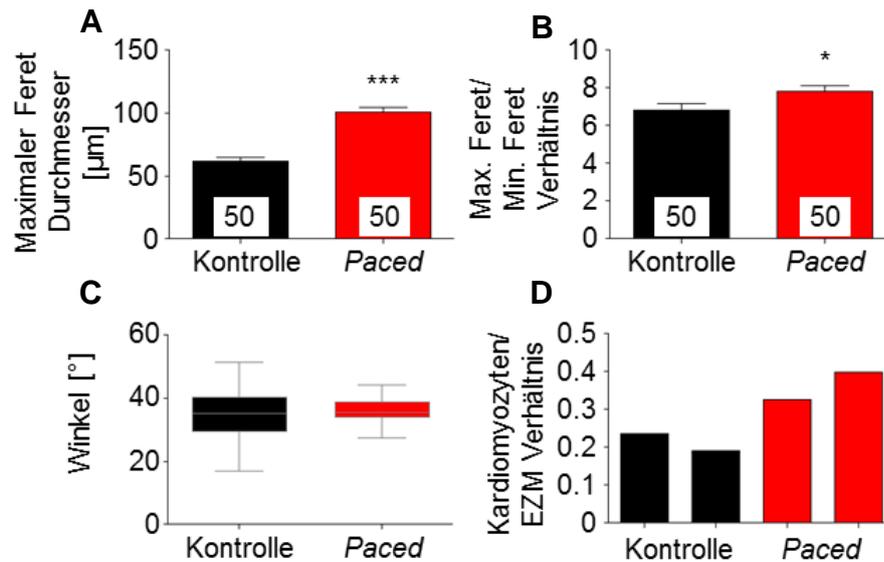


Abb. 3.12: Quantitative Analyse der Kontrollen und der stimulierten rEHTs. (A) Maximaler Feret-Durchmesser und (B) Verhältnis von maximalem zu minimalem Feret-Durchmesser sowie (C) Winkel des maximalen Feret-Durchmessers der Kardiomyozyten (im Verhältnis zur Horizontalebene). (D) Verhältnis von Kardiomyozyten zu EZM pro Querschnitt eines EHT. Es gingen je 25 Kardiomyozyten pro rEHT ($n = 2$) in die Analyse ein (A - C).

3.2.4.2 Connexin-43

Sechs Connexin-43-Moleküle bilden einen porenbildenden Komplex (Connexon), wobei zwei Connexone wiederum einen *Gap-Junction*-Kanal bilden. Mehrere hundert dieser Kanäle führen zur Bildung einer *Gap Junction*. Diese ist für die Kommunikation zwischen Zellen (hier Kardiomyozyten) zuständig, indem sie die Membranen zweier benachbarter Zellen durchquert, die Zytoplasmen direkt miteinander verbindet und so den Austausch von Ionen und kleinen Molekülen gewährleistet.

Die erfolgreiche Austestung des Antikörpers erfolgte an Herzen erwachsener Ratten (vgl. Abb. 3.13A + B). Die stimulierten EHTs zeigten eine deutlich höhere Dichte an Connexin-43 als die Kontrollen. Die Connexine waren im gesamten EHT an der Zellmembran von Kardiomyozyten verteilt (oftmals aber nicht ausschließlich an der Kontaktfläche zweier Kardiomyozyten) und nicht, wie bei den unbehandelten Geweben, ausschließlich bei Kardiomyozyten im Randbereich des EHTs (vgl. Abb. 3.13C + D). Eine Anordnung der *Gap Junctions* in den Glanzstreifen, wie sie bei nativem Herzgewebe zu sehen ist, konnte nicht gezeigt werden. Auch dieses Ergebnis korrelierte sehr gut mit den funktionellen Unterschieden, die sich durch die dauerhafte elektrische Stimulation der Herzgewebe einstellten.

3 Ergebnisse

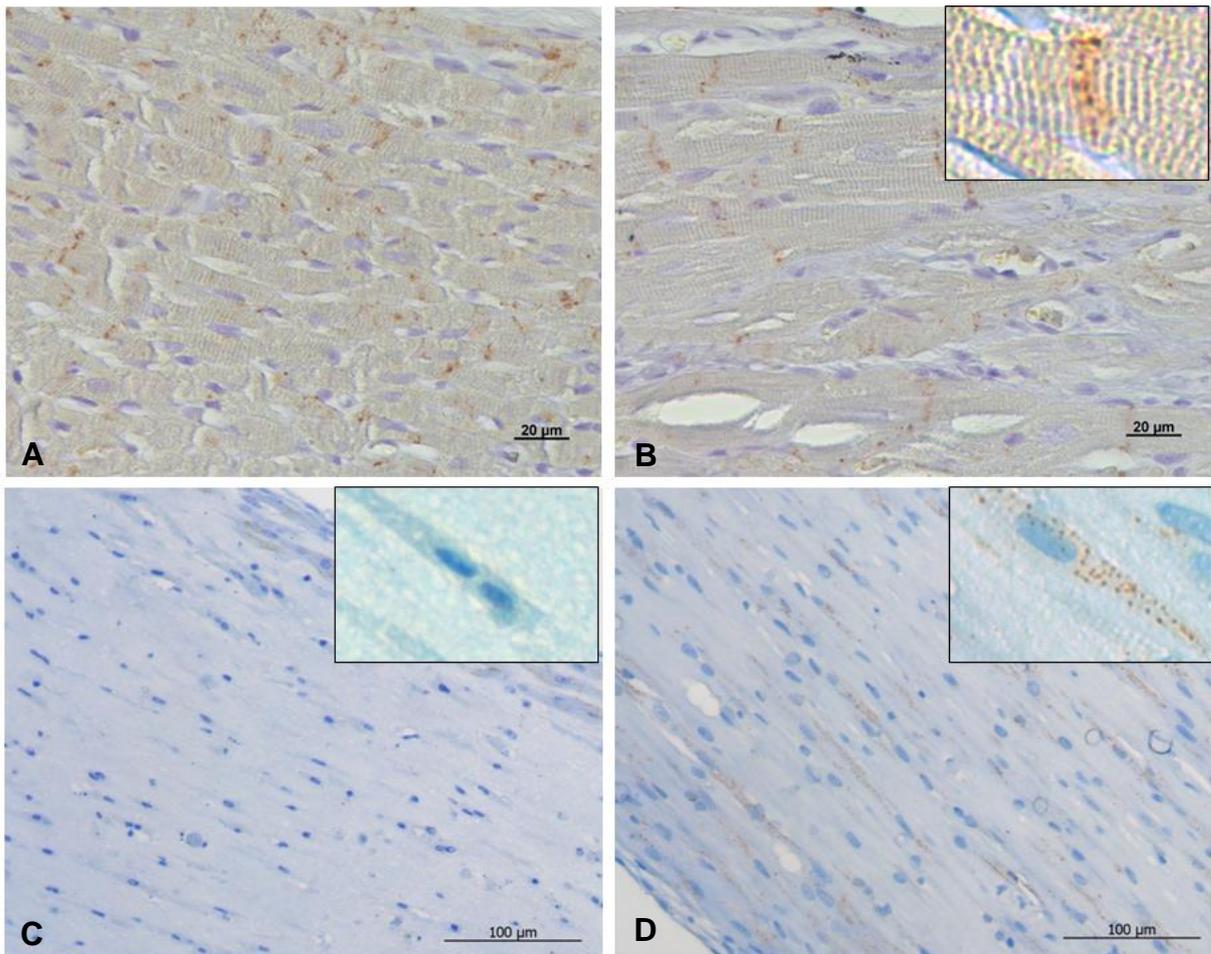


Abb. 3.13: Immunhistochemische Färbung von Herzen erwachsener Ratten und rEHTs für Connexin-43. (A und B, 40-fach) Austestung des Connexin-43-Antikörpers am Herzen einer erwachsenen Ratte. Deutliche End-zu-End-Anordnung (d.h. in den Glanzstreifen) des Connexin-43 zwischen den Kardiomyozyten. Vergleich des Connexin-43 Vorkommens und dessen Verteilung zwischen (C) nicht behandelten und (D) dauerhaft stimulierten EHTs (je 20-fach mit jeweils vergrößertem Ausschnitt). Auffällig ist das randbetonte Vorkommen von Connexin-43 positiven Strukturen (C) im Kontrast zur ubiquitären Verteilung (D).

3.2.5 Konfokalmikroskopie

Für die Konfokalmikroskopie wurden die EHTs mit Antikörpern gegen alpha-Aktinin, Dystrophin und Connexin-43 behandelt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Auch in der Konfokalmikroskopie konnte bestätigt werden, dass die dauerhaft elektrisch stimulierten EHTs eine höhere Anzahl von Kardiomyozyten (besonders in den zentralen Bereichen) aufwies und diese länger und Connexin-43 reicher als Kardiomyozyten in Kontroll-EHTs waren.

3 Ergebnisse

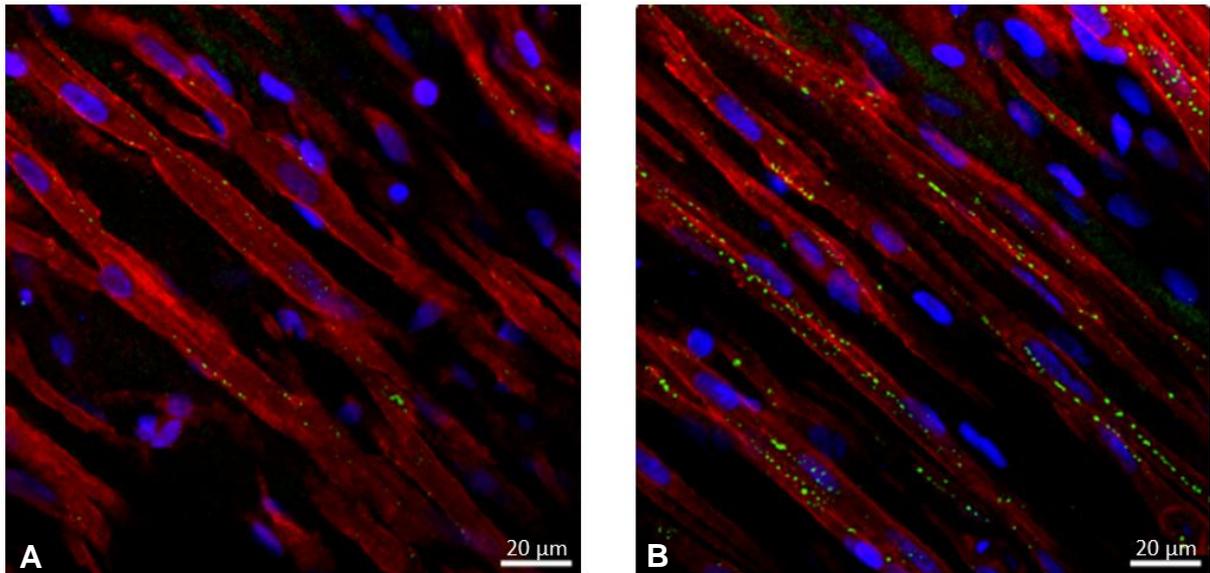


Abb. 3.14: Konfokalmikroskopie von rEHTs. Zusammengefügte Bilder aus der konfokalen Analyse eines oberflächlichen Bereiches eines Kontroll-EHTs (A) und eines stimulierten EHTs (B). Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen Dystrophin (rot), Connexin-43 (grün) und DAPI (blau).

3.2.6 Multiphoton-Mikroskopie

Für die Multiphoton-Mikroskopie wurde als oberste Ebene die Oberfläche genau im mittleren Bereich eines EHTs gewählt ($z = 0$). Anschließend erfolgte die Messung des vorhandenen Connexin-43 wie unter Punkt 2.10.5 beschrieben. Insgesamt wurden in der Gruppe der stimulierten Gewebe im Vergleich zu den Kontrollen sowohl mehr Connexin-43 positive Strukturen (+ 117%, vgl. Abb. 3.15B) als auch eine größere Connexin-43-Intensität gemessen (+ 343%, vgl. Abb. 3.15C). Darüber hinaus zeigte die Analyse der EHTs bis zu einer technisch limitierten Tiefe von 210 µm, dass die Dicke der kompakten Kardiomyozytenschicht innerhalb der EHTs durch die Stimulation zunahm. Bei den Kontrollen zeigte sie eine Breite von 85 µm, bei den stimulierten Konstrukten von 132 µm (+ 56%, vgl. Abb. 3.15D).

3 Ergebnisse

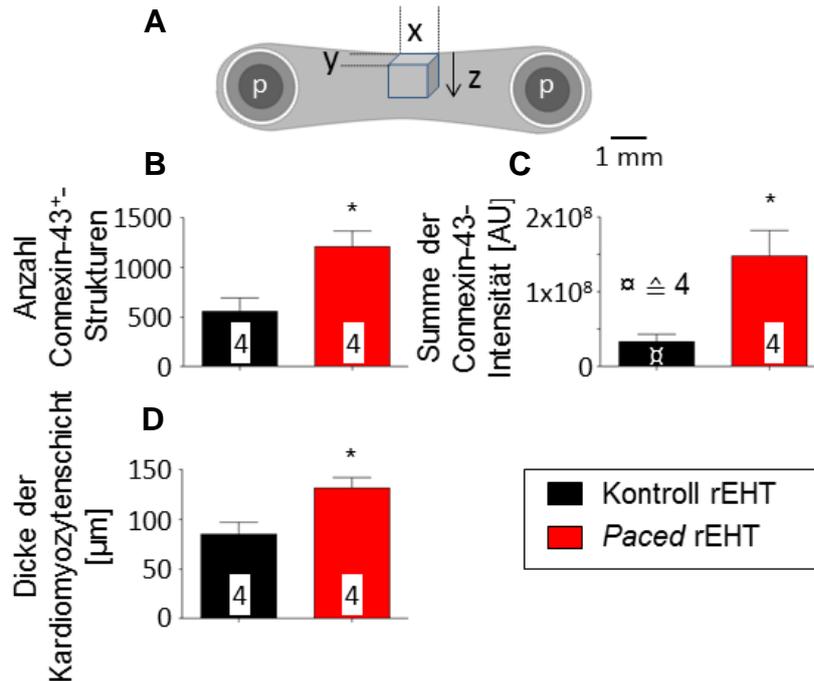


Abb. 3.15: Multiphoton-Mikroskopie von rEHTs. (A) Piktogramm eines rEHTs. Abgebildet ist ein Quader, der bei der Multiphoton-Mikroskopie analysiert wurde. x- und y-Achse waren je 150 μm lang, die erste Ebene ($z = 0$) entsprach der Oberfläche des EHTs genau in der Mitte des Konstruktes zwischen den Silikonhalterungen (p). Die maximale Tiefe (z-Achse) lag bei 210 μm . (B) Anzahl Connexin-43 positiver Strukturen und (C) Summe der Connexin-43-Intensität, gemessen im angegebenen Quader ($x = y = z = 150 \mu\text{m}$). (D) Dicke der kompakten Kardiomyozytenschicht, die ebenfalls mit der Multiphoton-Mikroskopie gemessen wurde.

3.2.7 Elektronenmikroskopie

Die qualitative Analyse der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von nativen Rattenherzen, unstimulierten und stimulierten EHTs ergab eine Reihe von Unterschieden. Die elektrische Stimulation der EHTs führte zu bemerkenswerten ultrastrukturellen Verbesserungen der Kardiomyozyten hinsichtlich des Aufbaus der Myofibrillen sowie des Vorkommens und der Anordnung der Mitochondrien (vgl. Abb. 3.16A + D + G). Es zeigte sich im Vergleich zu den Aufnahmen der Kontroll-EHTs eine deutlicher sichtbare I-Bande und H-Zone. Zudem zeigten sich eindrückliche A-I-Bandenübergänge innerhalb der Sarkomere in allen stimulierten Geweben (vgl. Abb. 3.16I). *Fasciae adhaerentes* waren innerhalb der Gruppe der stimulierten Gewebe deutlich besser definiert und damit vergleichbar mit nativem Gewebe. In den Aufnahmen der stimulierten Konstrukte waren die Sarkomere und die Mitochondrien vom Crista-Typ parallel zueinander geschaltet. Die Sarkomere der unstimulierten EHTs hingegen passten sich eher der Form der Mitochondrien an, was für eine mangelnde Spannung der Myofilamente sprechen könnte. Dagegen erreichten weder

3 Ergebnisse

die Mitochondrien der unstimulierten noch der stimulierten Gewebe die Qualität der Mitochondrien von nativem Herzgewebe (vgl. Abb. 3.16B + E + H). Die weitere Analyse zeigte Unterschiede zwischen der halb maximalen Breite der Z-Bande von nativen Ratten-Sarkomeren und den Kontroll-EHTs beziehungsweise stimulierten EHTs. Es war deutlich zu sehen, dass die Varianz der Breite der Z-Bande bei den stimulierten rEHTs deutlich geringer war als bei den nicht stimulierten EHTs (vgl. Abb. 3.16J). Letztlich führte das *Pacing* der EHTs neben der höheren Qualität zu einer Zunahme an Sarkomeren sowie zu einem Rückgang des relativen Anteils des Zytoplasmas. Entgegen den Erwartungen zeigte sich allerdings eine tendenzielle Abnahme der Mitochondrienanzahl (vgl. Abb. 3.16K). Bei den unstimulierten EHTs fiel auf, dass es innerhalb des Konstruktes Qualitätsunterschiede gab. Die Ausreifung der Sarkomere in den Kardiomyozyten des Randbereichs war deutlich ausgeprägter als die der Kardiomyozyten im Zentrum der Gewebe. Bei den stimulierten EHTs hingegen ließ sich aufgrund der gleichmäßigen Verteilung (gleiches Vorkommen von Kardiomyozyten im Zentrum und in der Peripherie) diese Inhomogenität der Sarkomerausreifung nicht feststellen. Alles in allem lässt sich festhalten, dass die dauerhafte Stimulation der Gewebe zu einer besseren Ausreifung und somit zur Annäherung an einen kardialen Phänotyp mit dessen Eigenschaften führt.

3 Ergebnisse

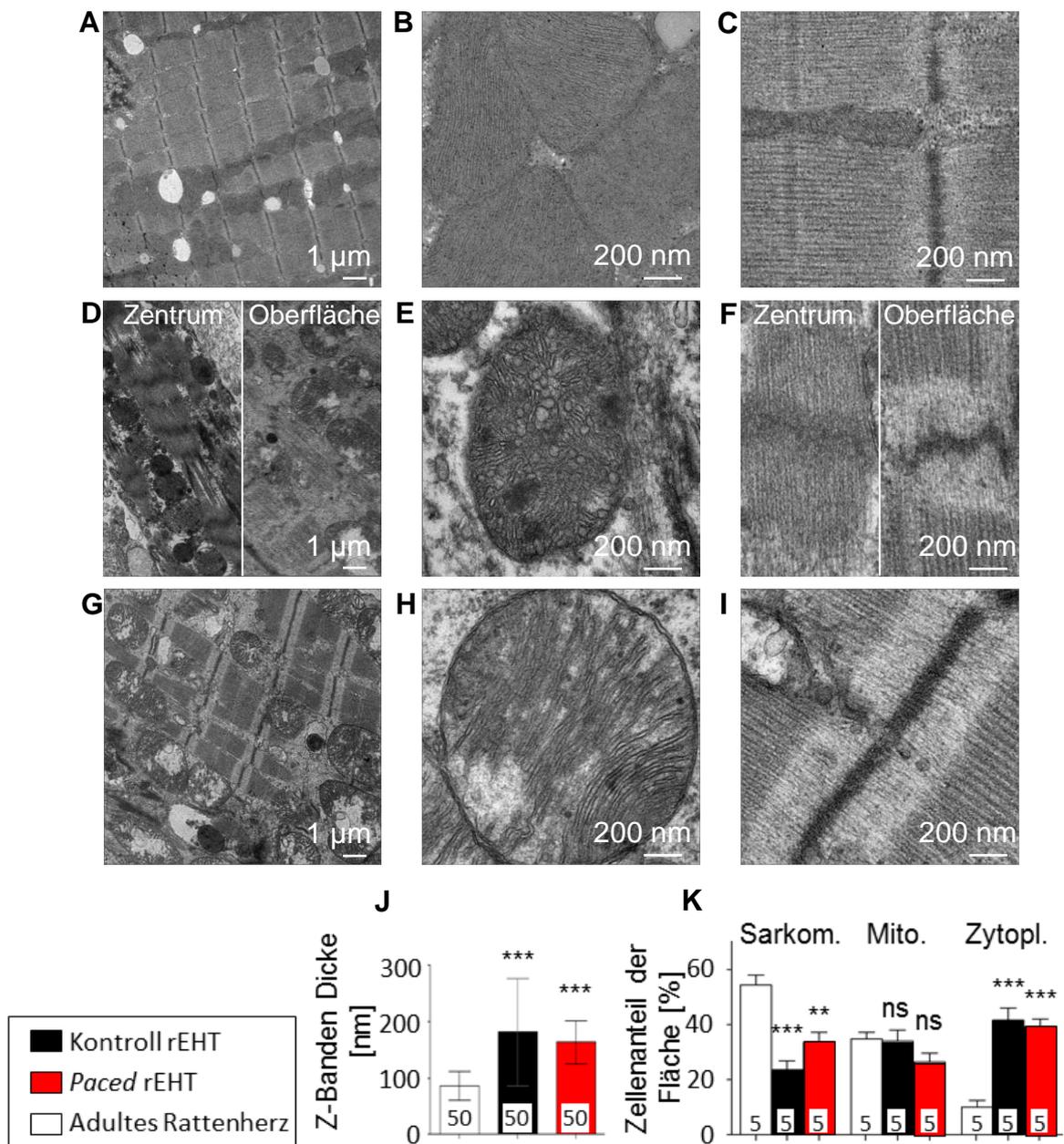


Abb. 3.16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Analyse der rEHTs.

Elektronenmikroskopie eines adulten Rattenherzens (A - C), Kontroll-rEHTs (D - F) und stimulierten rEHTs (G - I). Übersicht der Ultrastruktur der Kardiomyozyten (A + D + G). Darstellung der Mitochondrien (B + E + H), des A-I-Übergangs und der Z-Bande (C + F + I). (J) Quantifizierung der Z-Banden Dicke (Mittelwert \pm SD, n = 50). (K) Stereologische Analyse der Zusammensetzung der Kardiomyozyten (Anteil der Sarkomere, Mitochondrien und des Zytoplasmas in Relation zur gesamten Zellfläche (nach Ausschluss der Zellkerne); n = 5).

3.2.8 Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) und Stimulation mit Isoprenalin

Ein wichtiger Aspekt der Ausreifung von Herzgewebe ist die Kontraktilität als Funktion der externen Kalzium-Konzentration und der positiven inotropen Substanz Isoprenalin. Die Messungen der EHTs mit dem modifizierten *IonOptix*-System

3 Ergebnisse

ergaben, dass die EHTs mit steigenden Kalzium-Konzentrationen kontinuierlich an Kraft zunahmten, wobei die der stimulierten Gewebe letztlich doppelt so hoch war wie die der unstimulierten Gewebe. Die Kontrollgewebe erreichten schon bei einer Kalzium-Konzentration von 0,6 mM eine Plateau-Phase, wohingegen die stimulierten EHTs weiterhin an Kraft zunahmten. Demzufolge kam es zu einer Rechtsverschiebung der normalisierten Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve und einer Zunahme der EC_{50} um 0,055 mM (beziehungsweise 40%; vgl. Abb. 3.17). Bei der anschließend durchgeführten Stimulation mit Isoprenalin erreichten die EHTs 15 Minuten nach Isoprenalin-Applikation maximale Kräfte. Es zeigte sich, dass die Kraftzunahme der elektrisch stimulierten EHTs erheblich stärker war (absolut: + 0,17 mN vs. + 0,11 mN; relativ: + 165% vs. + 100%).

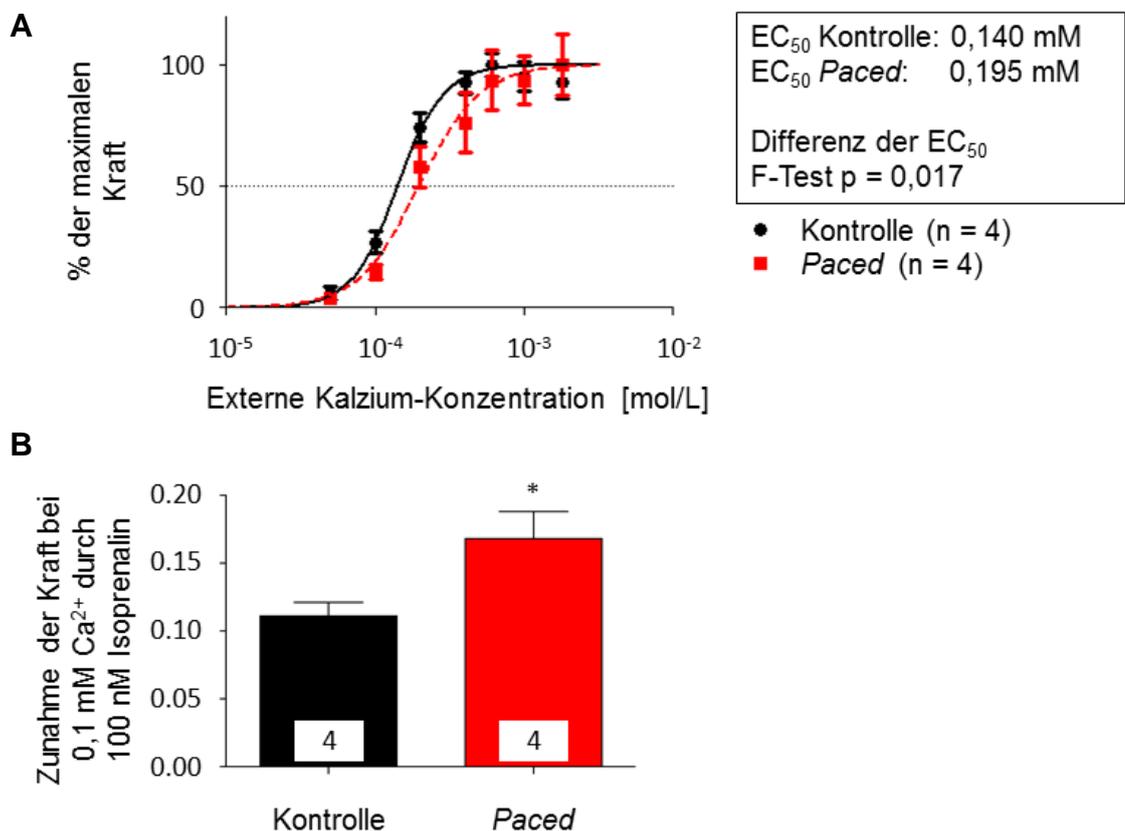


Abb. 3.17: Kalzium-KWK und Kraftzunahme der rEHTs. (A) Kraft der Kontrollen (schwarz) und der stimulierten rEHTs (rot) in Abhängigkeit von der externen Kalzium-Konzentration. Die Kräfte wurden normalisiert zur maximalen Kraft der Kontrollen oder der stimulierten rEHTs, wobei letztere doppelt so hohe absolute Kräfte aufwiesen. (B) Zunahme der Kraft der Kontrollen und der stimulierten EHTs durch die Stimulation mit 100 nM Isoprenalin bei einer externen Kalzium-Konzentration von 0,1 mM. Die Ausgangskräfte bei 0,1 mM Kalzium waren 0,055 mN für die Kontrollen und 0,064 mN für die stimulierten Gewebe.

3.2.9 DNA-/RNA-Technologien

Die erste quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde mit den EHTs aus ersten Versuchen zur Etablierung des Langzeit-*Pacings* durchgeführt. Im Nachhinein muss bei der Analyse berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der Stimulation noch die Elektroden der Generation IV aus Messing zum Einsatz gekommen sind. Insofern ist unklar, inwiefern diese das *Pacing* und die anschließend durchgeführte qPCR und deren Auswertung beeinflusst haben. Die Ergebnisse sind im Anhang unter 10.1.3 zu finden.

3.2.10 Affymetrix-Gene-Array

Mit freundlicher Unterstützung von Norbert Hübner (*Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine*, Berlin) wurde eine chipbasierte Genexpressions-Analyse von je 5 Kontrollen und stimulierten EHTs durchgeführt, um zu untersuchen, inwiefern die funktionellen und strukturellen Verbesserungen der stimulierten rEHTs mit Veränderungen auf RNA-Ebene korrelieren. 14.505 Transkripte (von insgesamt 29.214 untersuchten) waren so hoch exprimiert, dass sie detektiert werden konnten. Eine Hauptkomponentenanalyse der gesamten Expression zeigte, dass die erste Hauptkomponente 35% der Varianz des Datensatzes repräsentierte. Die erste Hauptkomponente war vollständig durch die Einteilung in Kontroll-EHTs und stimulierte EHTs erklärbar und zeigte somit einen starken Effekt des *Pacings* auf die globale Gen-Expression der Gewebe (vgl. Abb. 3.18). Aufgrund der besseren Funktion der Gewebe (höhere Kräfte, niedrigere Frequenzen und *Bursts*) fiel das Augenmerk zunächst auf die Expression aller 59 auf dem Chip vorhandenen Transkripte, die für Komponenten von Ionenkanälen der Plasmamembran kodieren. Die mit Abstand am stärksten hochregulierte Kanal-Untereinheit war KCNJ8, welche für das $K_{ir}6.1$ -Protein kodiert (FC 2,61; $p = 0,004$). Als ein Teil des heterooktameren Komplexes der einwärtsgerichteten ATP-sensitiven Kalium-Kanäle kann es zur Stabilisierung des Ruhemembranpotenzials beitragen und somit zu einer Reduktion der spontanen Schlagfrequenz führen. Ein weiterer Ionenstrom, der entscheidend auf die Schrittmacher-Aktivität Einfluss nimmt, ist der sogenannte *I_f-Current* (auch *Funny Current* genannt). Die wichtigste Isoform der Kanal-Untereinheit in Geweben mit Schrittmacherpotenzial, HCN4, wurde deutlich herunterreguliert (FC 0,48; $p = 0,001$). Am zweitstärksten von allen Genen wurde Endothelin-1, ein starker Fibroseinduktor (FC 0,20; $p < 0,001$), herunterreguliert. Ebenso wurde Ctgf (*Connective Tissue Growth Factor*) herunterreguliert, das ebenfalls eine Rolle bei der Fibroseentstehung spielt

3 Ergebnisse

(FC 0,45; $p = 0,001$). Außerdem wurden Proteine, die bei der Remodellierung extrazellulärer Matrix eine Rolle spielen, hochreguliert. Beispiele hierfür sind MMP9 (FC 2,06; $p = 0,014$) und MMP3 (FC 2,32; $p = 0,077$). Die Expression von Kollagen-1 oder von Fibroblastenmarkern wie Periostin blieb unverändert. Eine besondere Relevanz hatte die Hochregulation von Connexin-43 (= *Gap Junction Protein, alpha 1, Gja1*; FC 1,49; $p = 0,022$), was die zuvor mikroskopisch gesehene Zunahme der Connexin-43-positiven Strukturen in stimulierten EHTs bestätigte. Die SR- Ca^{2+} -ATPase Serca2a blieb unverändert, allerdings war der Serca2a-Inhibitor Phospholamban um 18% reduziert (FC 0,82; $p = 0,0037$). Im weiteren Verlauf wurde zusätzlich eine *Pathway*-Analyse (IPA, *Ingenuity Systems*) der Genexpression der EHTs durchgeführt. Es wurde deutlich, dass die dauerhafte elektrische Stimulation der Gewebe zu einer inflammatorischen Reaktion führte. Die vom System hauptsächlich erkannten Netzwerke waren „*Immune Cell Trafficking*“, „*Inflammatory Response*“, „*Cellular Movement*“, „*Granulocyte Adhesion and Diapedesis*“.

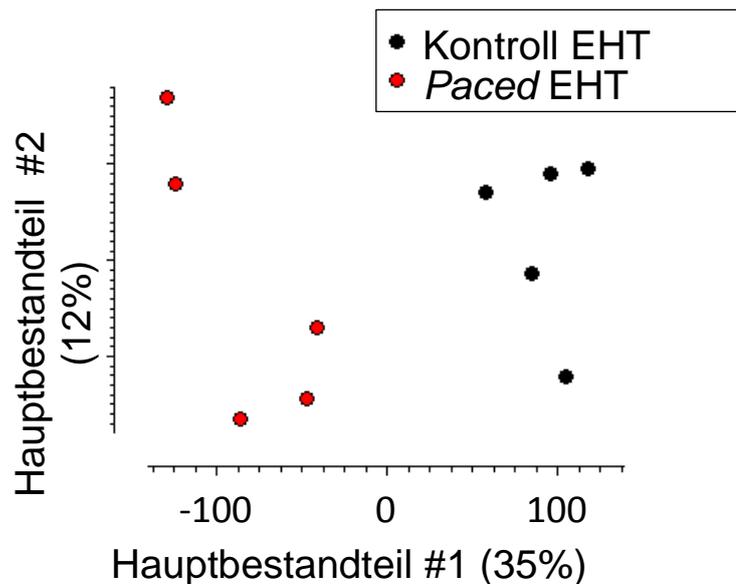


Abb. 3.18: Genexpressions-Analyse der rEHTs. Analyse der Hauptkomponenten der Genexpression von fünf Kontrollen und fünf stimulierten rEHTs. Hauptkomponente #1 beschreibt die Unterschiede zwischen den Kontrollen und den stimulierten Geweben und erklärt 35% der Varianz des analysierten Datensatzes.

3.3 Stimulation von humanen EHTs

Bei der Stimulation von humanen EHTs gilt es grundsätzlich zwischen zwei Protokollen, mit denen die EHTs hergestellt und kultiviert wurden, zu unterscheiden. Das ursprüngliche Protokoll wurde für die ersten drei Langzeit-*Pacings* verwendet. Anschließend wurden nur noch hEHTs untersucht, deren Kardiomyozyten zuvor anhand des Laktatprotokolls (siehe 2.5.2) aufgereinigt und ausschließlich in laktathaltigem und glukosefreiem Medium kultiviert wurden. Die ersten Langzeit-*Pacings* der hEHTs erfolgten mit drei unterschiedlichen Frequenzen. Es kam zunächst eine Stimulationsfrequenz von 1,5 Hz zum Einsatz, dann wurde mit 0,5 Hz und zuletzt mit 1 Hz dauerhaft stimuliert. Mit diesen Einstellungen konnte keine nachhaltige funktionelle Optimierung der Gewebe beobachtet werden (siehe 10.2).

Die später verwendeten Laktat-EHTs wurden zunächst ebenfalls mit 0,5 Hz und dann Frequenz-adaptiert stimuliert. Das heißt, dass die gewählte *Pacing*-Frequenz an die mit der Zeit abnehmende Spontanfrequenz der Gewebe angepasst wurde. Somit wurde zu Beginn des Versuches eine Stimulations-Frequenz von 2 Hz gewählt und diese im Laufe der Ausreifung der Gewebe und der damit einhergehenden Reduktion ihrer Spontanfrequenz (auf etwa 1 Hz) nach einer Woche auf 1,5 Hz herabgesetzt. Aufgrund der höheren *Pacing*-Frequenzen wurde das Medium täglich gewechselt, um die Konzentration an hypochloriger Säure und ihrer Metabolite gering zu halten. Mit diesem Protokoll zeigten die EHTs deutliche Veränderungen auf funktionaler und morphologischer Ebene.

3.3.1 Funktionelle Parameter

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Auswertung der funktionellen Parameter der hEHTs gezeigt, die nach dem Laktat-Protokoll hergestellt wurden. Alle weiteren Ergebnisse der ersten Langzeit-*Pacings* können dem Anhang unter 10.2.1 entnommen werden.

3.3.1.1 Kräfte

Die stimulierten hEHTs entwickelten nach vier bis sechs Tagen höhere Kräfte im Vergleich zu den Kontrollen. Zeigten die mit 0,5 Hz stimulierten EHTs lediglich eine Tendenz zur höheren Kraftentwicklung, so zeigte sich dieser Effekt bei den mit 2 Hz/ 1,5 Hz stimulierten Geweben deutlich (0,083 mN vs. 0,056 mN, + 48%, vgl. Abb. 3.19).

3 Ergebnisse

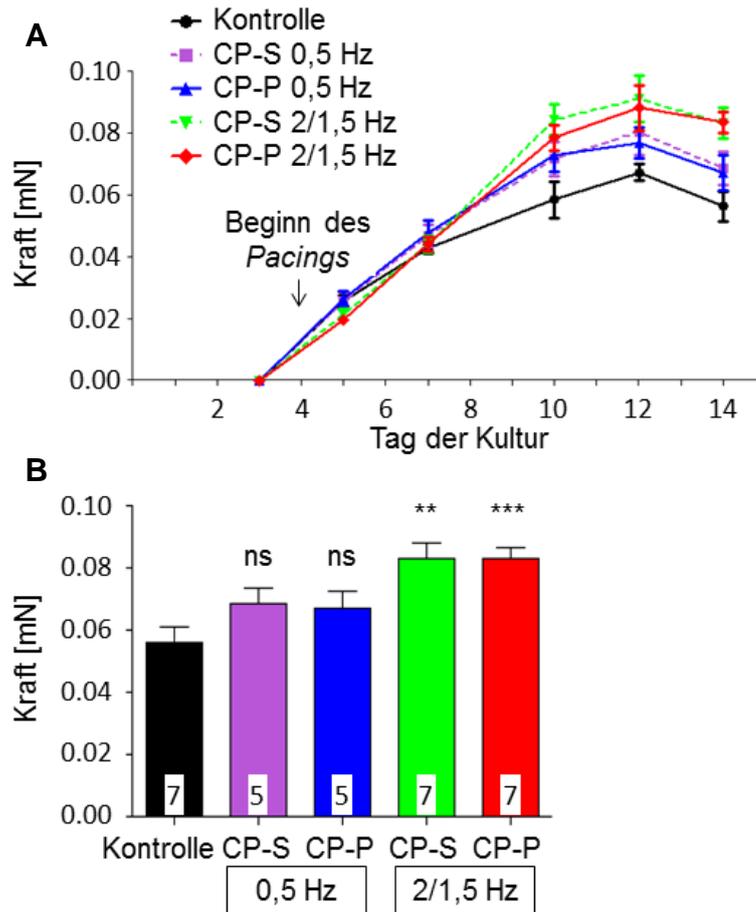


Abb. 3.19: Einfluss von elektrischer Stimulation mit niedrigen und hohen Frequenzen auf die Kraftentwicklung der humanen EHTs. (A) Kraftentwicklung der hEHTs über die Zeit und (B) nach zehn Tagen (Tag 14 der Kultur) kontinuierlichen *Pacings*.

3.3.1.2 Weitere funktionelle Parameter

In allen durchgeführten Langzeit-*Pacings* stellten sich keine Unterschiede in Bezug auf die Frequenzentwicklung der Herzgewebe ein. Die Frequenz, mit welcher kontinuierlich stimuliert wurde, zeigte keinen Einfluss (siehe 10.2.1.2). Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit verhielt sich tendenziell analog zur Kraftentwicklung der Gewebe (siehe 10.2.1.3). Kontraktions- und Relaxationszeit wurden durch die elektrische Stimulation nicht beeinflusst (siehe 10.2.1.4). Allerdings zeigte sich ein gesteigertes *Fractional Shortening* in der Gruppe der stimulierten EHTs (siehe 10.2.2).

3.3.2 Histologie

Entsprechend der Histologie der rEHTs wurden auch von den humanen EHTs HE-Färbungen angefertigt. Die Ergebnisse der histologischen Analyse war bei den zu Beginn dieser Arbeit untersuchten hEHTs nicht so eindrücklich wie die der rEHTs

3 Ergebnisse

(siehe 10.2.3). Nach Einsatz der Laktat-hEHTs waren allerdings deutliche Unterschiede zu erkennen.

3.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die stimulierten hEHTs zeigten ein ausgereifteres muskuläres Netzwerk mit longitudinaler Ausrichtung der Kardiomyozyten und einem größeren Verhältnis von Zytoplasma zu Zellkern (vgl. Abb. 3.21).

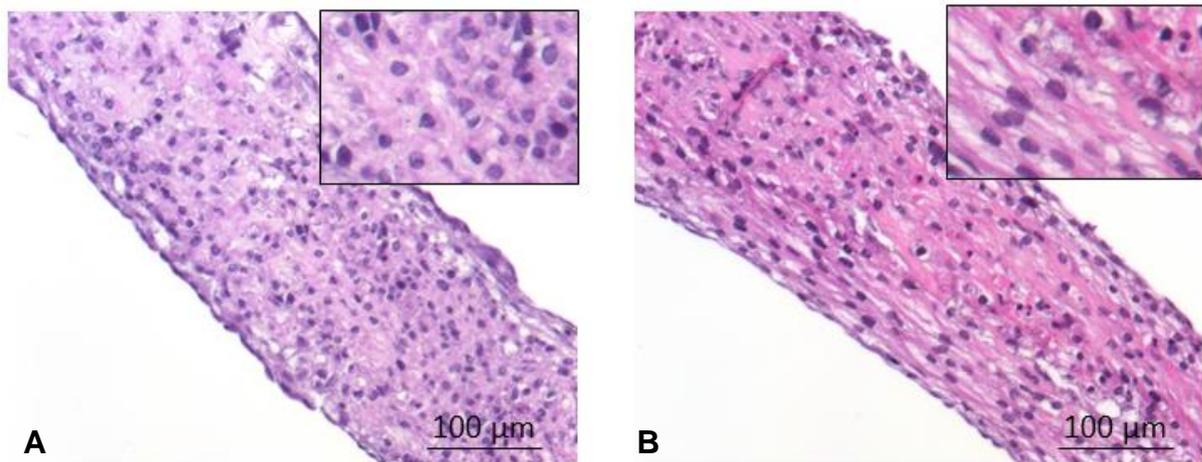


Abb. 3.21: HE-Färbungen von hEHTs (2 Hz/1,5 Hz) nach Verwendung des Laktat-Protokolls. (A) Kontrolle sowie (B) ein stimuliertes EHT in 20-facher Vergrößerung. Die Ausschnitte sind zusätzlich 2-fach vergrößert. Die Elongation der Kardiomyozyten sowie die kompaktere Zellschicht sind bei dem stimulierten EHT deutlich zu erkennen.

3.3.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde analog zur Aufarbeitung der rEHTs mit den gleichen auch für humanes Gewebe geeigneten Antikörpern durchgeführt.

3.3.3.1 Myosin-Leichte-Kette-2-atrial (MLC-2a) und -ventrikulär (MLC-2v)

Die Durchführung der Immunhistochemie für MLC-2a ergab bei allen hEHTs keine Unterschiede bezüglich der Anzahl MLC-2a positiver Zellen zwischen beiden Gruppen (siehe auch 10.2.4.1). Die Laktat-hEHTs verfügten über eine deutlich bessere Morphologie (insbesondere nach dauerhafter elektrischer Stimulation) als die humanen Herzmuskelkonstrukte, die vor Einführung des Laktat-Protokolls zum Einsatz kamen. Die Färbung mit MLC-2v zeigte, dass die Kardiomyozyten der stimulierten Gewebe sowohl absolut als auch relativ (ausgedrückt als Verhältnis von maximalem zu minimalem Feret-Durchmesser) länger waren (vgl. Abb. 3.22A - D). Darüber hinaus fiel auf, dass die Zellen etwas schmaler und weniger rund sowie

3 Ergebnisse

innerhalb des EHT besser in der Längsachse ausgerichtet waren (vgl. Abb. 3.22A + B + E). Ebenfalls zeigte sich eine deutlichere Querstreifung. Die Ausrichtung der Kardiomyozyten (gemessen als Winkel zwischen der Horizontalebene und des maximalen Feret-Durchmessers der Kardiomyozyten innerhalb des EHTs) zeigte eine geringere Varianz (vgl. Abb. 3.22E) und die stimulierten EHTs verfügten im Vergleich zu den Kontrollen über mehr kontraktile Masse im Verhältnis zur zellfreien Matrix (vgl. Abb. 3.22F).

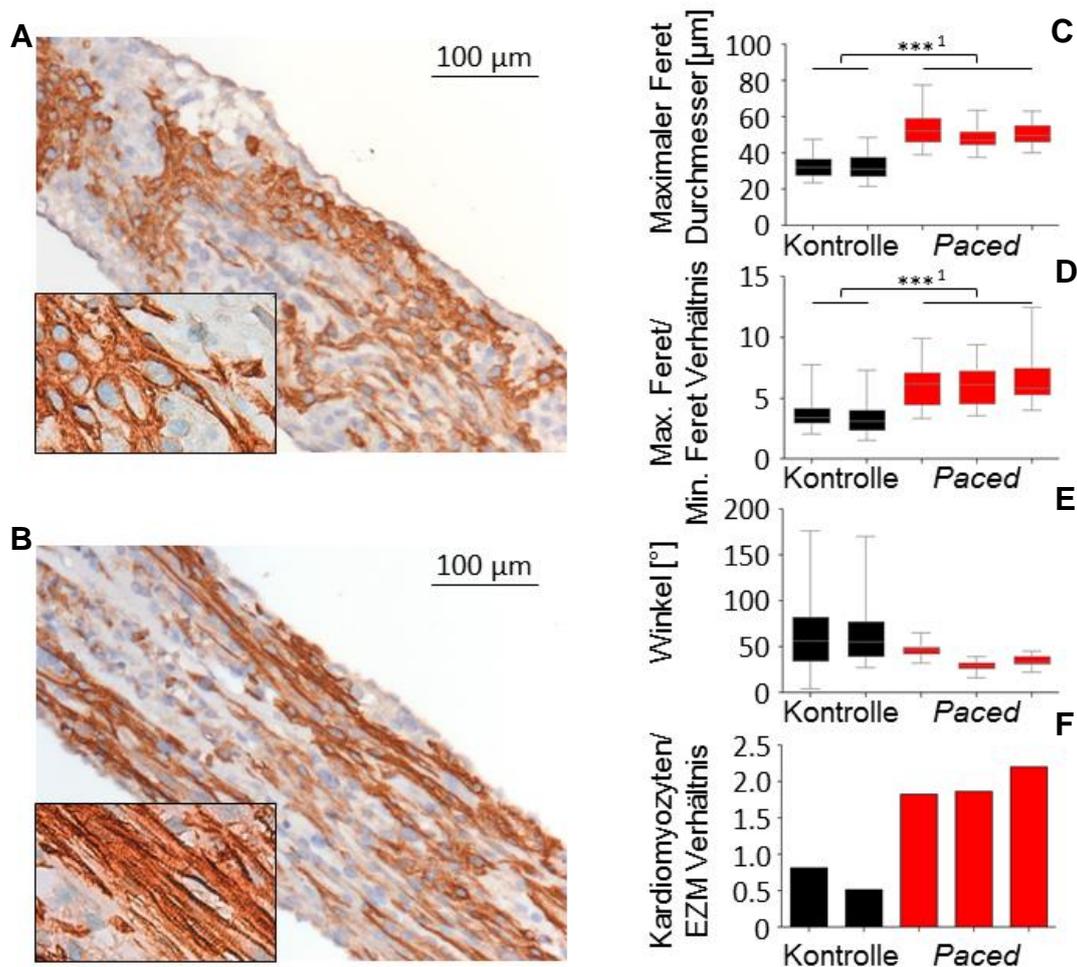


Abb. 3.22: Immunhistochemie und quantitative Analyse der Kontrollen und der stimulierten hEHTs (2 Hz/1,5 Hz). Immunhistochemische Färbungen für MLC-2v einer (A) Kontrolle und (B) eines dauerhaft stimulierten EHT mit jeweils zusätzlicher 2-facher Vergrößerung. (C) Maximaler Feret-Durchmesser und (D) das Verhältnis von maximalem zu minimalem Feret-Durchmesser sowie (E) der Winkel des maximalen Feret-Durchmessers der Kardiomyozyten (zur Horizontalebene). Es gingen je 25 Kardiomyozyten pro hEHT in die Analyse ein (C – E). (F) Verhältnis von Kardiomyozyten zur extrazellulären Matrix pro Querschnitt eines hEHT. ¹Es wurde je ein Paar von hEHTs mit dem *Tukey's multiple comparison post test* getestet. Alle p-Werte für die Differenz zwischen Kontrollen und stimulierten hEHTs waren <0,001. Es ergaben sich keine Unterschiede, wenn Paare von Kontrollen oder Paare von stimulierten hEHTs getestet wurden.

3.3.3.2 Connexin-43

Die Anzahl und Dichte der Connexine war anhand der Immunhistochemie nicht klar festzustellen. In EHTs beider Gruppen wurde Connexin-43 angefärbt. Tendenziell sah man eine höhere Dichte an Connexinen zwischen den Kardiomyozyten der stimulierten EHTs. Die immunhistochemische Färbung für Connexin-43 wurde ausschließlich für hEHTs durchgeführt, die vor Einführung des Laktat-Protokolls zum Einsatz kamen (siehe 10.2.4.2).

3.3.4 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Analysen der Laktat-hEHTs wurden im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr angefertigt. Die Ergebnisse beziehen sich daher ausschließlich auf die Auswertung der hEHTs, die vor der Einführung des Laktat-Protokolls entstanden. Wie auch bei den lichtmikroskopischen Verfahren und den funktionellen Parametern gesehen, war die Auswirkung von permanenter elektrischer Stimulation auf diese Nicht-Laktat-hEHTs lediglich moderat (siehe 10.2.5).

4 DISKUSSION

4.1 Das Grundprinzip

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine Methode zur dauerhaften elektrischen Stimulation von künstlich hergestelltem Herzgewebe (hergestellt aus Ratten-Herzzellen oder aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen) im *24-Well*-Format entwickelt und deren Auswirkung auf die Herzmuskelkonstrukte untersucht. Bisher war bekannt, dass die Feldstimulation isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten deren reifen Phänotyp für bis zu 72 h konservieren kann (Berger et al. 1994). Dieses Prinzip wurde von den Gruppen von Vunjak-Novakovic und Radisic (Radisic et al. 2004; Tandon et al. 2009; Nunes et al. 2013; Thavandiran et al. 2013) sowie den Arbeitsgruppen von Tong und Ralph (Tong et al. 2009) auf künstliches Herzgewebes übertragen. In unserer Studie wurde das Langzeit-*Pacing* von rEHTs (mit 0,5 Hz) und hEHTs (mit 2 Hz/1,5 Hz) für mehr als vier Wochen ohne Zeichen von Toxizität durchgeführt. Dieser Zeitraum ist um einiges länger als die in der Literatur angegebenen Zeitspannen (fünf bis zehn Tage; Radisic et al. 2004; Tandon et al. 2011; Lasher et al. 2012). Nach Herstellung der EHTs wurden ihnen ab dem vierten Tag für eine variable Zeitdauer kontinuierlich elektrische Impulse zugeführt. Dies führte zu einer besseren Ausreifung der Gewebe in Richtung eines kardialen Phänotyps mit steigender Funktionalität, einer Veränderung der makro- bzw. mikroskopischen Struktur, physiologischeren Eigenschaften sowie einer Beeinflussung der Expression kardialer Gene.

4.2 Das Modell der künstlichen Herzmuskelgewebe (EHT)

Das im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie entwickelte Protokoll zur Herstellung Fibrin-basierter *Engineered Heart Tissues* ermöglicht die standardisierte und simultane Herstellung einer hohen Anzahl künstlichen Herzgewebes (Hansen et al. 2010). Die produzierten Herzmuskelgewebe, die die Eigenschaft besitzen, wenige Tage nach Herstellung eigenständig zu schlagen und messbare Kräfte zu entwickeln, sind einfach zu handhaben und bildeten die Grundlage dieser Arbeit. Schon in der Vergangenheit wurden mehrere Studien auf Basis des nach Hansen et al. (2010) entwickelten Protokolls zur Herstellung Fibrin-basierter EHTs durchgeführt. Neben der Austestung neuartiger pharmakologischer Substanzen (Hansen et al. 2010; Schaaf et al. 2011), kam es zu einer Modifizierung des Protokolls und zur Entwicklung eines Hypertrophie-Modells *in vitro*, welches die

Möglichkeit zur Herzhypertrophie-Forschung auf Grundlage der EHTs bietet (Hirt et al. 2012). Zudem wurde bereits gezeigt, dass es durch die Verwendung von 3D-Konstrukten, im Vergleich zur 2D-Zellkultur, zu einer besseren Differenzierung und Ausreifung der Kardiomyozyten innerhalb der Gewebe kommt (Tiburcy et al. 2011). In der Erforschung der hypertrophen Kardiomyopathie kam es ebenfalls zum Einsatz von EHTs. Via Gen-Transfer wurde die mutierte *Ankyrin Repeat Domain 1* (ANKRD1), ein transkriptionaler Co-Faktor, welcher im Sarkomer lokalisiert ist, in die EHTs geschleust, um dort den Einfluss von ANKRD1-Mutationen auf die Kontraktionsparameter der künstlichen Herzgewebe zu untersuchen (Crocini et al. 2013).

Sowohl die hohe Reproduzier- und Objektivierbarkeit der funktionellen Eigenschaften der EHTs als auch deren bereits wiederholte Verwendung in einer Vielzahl von Studien, machten die Fibrin-basierten EHTs zu einer zuverlässigen Grundlage zur Etablierung eines *Pacing*-Protokolls zur Untersuchung der Auswirkungen einer dauerhaften elektrischen Stimulation auf die EHTs.

4.3 Morphologische Eigenschaften des *Engineered Heart Tissues*

Das nach Hansen et al. (2010) hergestellte künstliche Herzgewebe zeigte eine gut ausgebildete Herz-ähnliche Morphologie. Ein Anhaltspunkt hierfür war die ultrastrukturelle Analyse in der Elektronenmikroskopie, durch deren Einsatz insbesondere die Myofilamente untersucht werden konnten. Die unstimulierten EHTs verfügten über eine überwiegend gut ausgebildete Querstreifung mit normaler Sarkomeranordnung (Z-Streifen, I-Bande, A-Bande, H-Zone, M-Bande). Allerdings war insbesondere die M-Bande häufig mangelhaft ausgebildet. Ebenfalls zeigte sich eine Variabilität in der Breite der Z-Streifen. Des Weiteren fielen in der Elektronenmikroskopie Mitochondrien vom Crista-Typ auf. Diese waren, im Gegensatz zu nativem Gewebe, nicht parallel zu den Sarkomeren angeordnet. Glanzstreifen, die aus Desmosomen (*Fasciae adhaerentes*) und *Gap Junctions* bestehen und als mechanische und elektrische Kontakte der Funktionalität der Gewebe dienen, waren nur vereinzelt sichtbar (Sheikh et al. 2009).

4.4 Entwicklung eines *Pacing*-Modells

Im Fokus stand die Entwicklung eines *Pacing*-Systems, das in jeder Hinsicht mit dem bereits vorhandenen Verfahren kompatibel ist: Dabei musste gewährleistet werden, dass die Zellkultur und die Messungen weiterhin unter sterilen Bedingungen erfolgen;

der Medium- und Elektrodenwechsel durfte zu keiner Kontamination oder zur Beschädigung der Gewebe führen; die eingesetzten Materialien mussten unter Zellkultur-Bedingungen nachhaltig einwandfrei funktionieren; die Messungen im video-optischen System durften nach dem Einsetzen der *Pacing*-Einheiten in keiner Weise behindert werden. Darüber hinaus sollten möglichst viele Herzgewebe gleichzeitig stimuliert werden, um eine hohe Anzahl an EHTs untersuchen zu können.

4.4.1 Wahl des richtigen Materials

Die Auswahl eines für die Zellkultur geeigneten Materials stellte einen essenziellen Schritt für die Umsetzung eines funktionierenden *Pacing*-Protokolls dar. Dabei ging es zum einen um die Wahl des Materials für das Gerüst der *Pacing*-Einheiten und zum anderen um die Beschaffenheit der Elektroden an sich. Bereits durchgeführte Studien zeigten bezüglich des Elektrodenmaterials, dass der Einsatz von Carbon etliche Vorteile im Vergleich zu anderen Materialien bietet (Tandon et al. 2011). Neben der Eigenschaft, die toxischen Metabolite hypochloriger Säure, die durch den elektrischen Stromfluss in flüssigem Medium entstehen können, zu absorbieren, lässt sich Carbon wiederholt autoklavieren und zeigt keinerlei Strukturveränderungen unter hohen Temperaturen. Zudem verfügt Carbon über eine hohe Konduktivität. Schwieriger hingegen gestaltete sich die Selektion eines optimalen Materials für das Gerüst der *Pacing*-Einheiten. Da bisher keine Studien zum *Pacing* von EHTs im 24-Well-Format durchgeführt wurden, die mit dem video-optischen System kompatibel sein mussten und die Elektroden komplett neu entwickelt und hergestellt wurden, gab es keine Resultate, an denen man sich hätte orientieren können. Unumstritten war, dass das Material keine zelltoxischen Bestandteile aufweisen durfte. Zudem musste das Material hitzebeständig (= autoklavierbar) sein und über eine gute Leitfähigkeit verfügen. Nach anfänglichen Versuchen mit Kunststoff und Messing, bei denen es zur toxischen Schädigung von EHTs kam, wurde das komplette System auf Halterungen (inklusive Schrauben und Muttern) aus Edelstahl und PTFE umgestellt. Der ausgewählte 1.4301 Edelstahl ist der am häufigsten verwendete rostfreie Stahl. Insbesondere seine Korrosions- und Hitzebeständigkeit macht ihn für den Einsatz in der Medizintechnik besonders wertvoll, sodass er sich für den Einsatz als *Pacing*-Einheit bestens eignete. Infolgedessen gab es keine Hinweise mehr darauf, dass die verwendeten Materialien zu toxischen Effekten führten.

4.4.2 Video-optische Messungen

Durch das video-optische System ließen sich die funktionellen Eigenschaften der EHTs zu jedem Zeitpunkt und im Vergleich zum Einsatz eines Organbades unter sterilen Bedingungen objektivieren. Entscheidend war, dass es durch den Einsatz der *Pacing*-Einheiten zu keiner Behinderung der Figurenerkennung und einer damit einhergehenden Verfälschung der Aufnahmeergebnisse kam. Die Position der Carbon-Elektroden innerhalb der *Wells* musste so gewählt werden, dass der Lichteinfall der Dioden gleich blieb. Die hergestellten *Pacing*-Einheiten erfüllten diese Voraussetzungen, sodass eine hohe Reproduzierbarkeit der zu erhebenden Daten gewährleistet war.

4.4.3 Etablierung eines *Pacing*-Protokolls

Zur Austestung der optimalen *Pacing*-Parameter wurden einige Test-*Pacings* durchgeführt, in denen die geeignete Frequenz, Spannung und Impulsdauer ermittelt wurden. Die dauerhafte elektrische Stimulation der EHTs startete an Tag vier nach deren Herstellung. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Gewebe erste sichtbare fokale Kontraktionen. Unsere Hypothese bestand darin, die Ausbildung kohärenter Kontraktionen durch das *Pacing* zu beschleunigen, um eine frühzeitige Ausreifung der Gewebe zu erreichen. Da die ermittelte Erregungsschwelle der Gewebe bei 1,82 V lag, wurde die Spannung konstant bei 2 V gehalten, wodurch eine Feldstärke von 2 V/cm entstand. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass die Gewebe auf jeden elektrischen Impuls mit einer Kontraktion antworten. Die biphasische Stimulation von 4 ms (2 ms pro Richtung) blieb unverändert. Wie bereits von Chiu et al. (2011) gezeigt, führt die Applikation symmetrischer biphasischer Impulse im Vergleich zur monophasischen Stimulation zu einer vermehrten Zelldichte und einer höheren Expression von Connexinen. Um die Entstehung hypochloriger Säure und toxischer Metabolite möglichst gering zu halten, kamen niedrige Frequenzen von 0,5 Hz (rEHTs) und 2 Hz/1,5 Hz (hEHTs) zum Einsatz. Die Stimulationsfrequenz der humanen EHTs war somit im physiologischen Bereich (das menschliche Herz schlägt in Ruhe mit einer Frequenz von 60-100 Schlägen pro Minute) und unterschied sich deutlich von den Protokollen anderer Gruppen, die mit bis zu 6 Hz stimulierten (Nunes et al. 2013). Die *Pacing*-Frequenz der rEHTs wurde bewusst niedrig gehalten, auch wenn sie nicht der physiologischen Frequenz von Rattenherzen entsprach (300-500 Schläge pro Minute). Erst Versuche zeigten, dass zu hohe Frequenzen (3 Hz/5 Hz) zu einer schnell einsetzenden Inaktivität der EHTs führen.

Dies lässt sich wahrscheinlich mit der vermehrten Entstehung toxischer Metabolite erklären, die mit steigender Frequenz zunehmen. Alternativ könnte die dauerhaft hohe Frequenz ohne Pausen auch zu einer metabolischen Erschöpfung der EHTs geführt haben. Dafür spricht die sehr schnelle Abnahme der Kraft nach Beginn des 5 Hz-*Pacings*. Die gewählten 0,5 Hz reichten aus, um nachhaltige Verbesserungen der EHTs zu erreichen. In den meisten Langzeit-*Pacings* wurden 24 EHTs (eine 24-Well-Platte) parallel stimuliert, wofür eine Stromstärke von 380 mA nötig war.

4.5 Ausreifung des künstlichen Herzmuskelgewebes

4.5.1 Funktionelle und physiologische Optimierung

Die dauerhafte elektrische Stimulation führte zu signifikanten Veränderungen der funktionellen Parameter und der Physiologie der EHTs. In allen durchgeführten Langzeit-*Pacings* nahmen die stimulierten rEHTs deutlich an Kraft zu. Sie entwickelten nach sieben Tagen dauerhafter Stimulation stärkere Kräfte und erreichten ihr Maximum nach etwa 18 Tagen mit zweimal höheren Kräften als die nicht stimulierten EHTs. Die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten waren in gleichem Maße ebenfalls gegenüber den Kontrollen erhöht. Die Laktat-hEHTs entwickelten nach vier bis fünf Tagen dauerhafter Stimulation eine stärkere Kraftzunahme als die Kontrollen. Nach zehn Tagen war die Kraft um 50% höher als die der unstimulierten Gewebe. Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten verhielten sich ebenfalls analog zur Kraftentwicklung. Weder bei den rEHTs noch den hEHTs zeigten sich nachhaltige Veränderungen der Kontraktions- und Relaxationszeiten. Die Schlagfrequenz der hEHTs blieb durch die Stimulation unverändert, wobei die rEHTs bei zwei von fünf Langzeit-*Pacings* zum Zeitpunkt der letzten Messung keine Spontankontraktionen mehr zeigten (siehe 3.2.1.2). Die Mechanismen, die zur Verbesserung der Funktion der dauerhaft stimulierten EHTs führen, lassen sich sowohl mit quantitativen als auch mit qualitativen Veränderungen begründen. Es könnte zur Rekrutierung einer größeren Anzahl an Kardiomyozyten im Inneren der Gewebe kommen, die zu einer stärkeren koordinierten Kontraktion der Gewebe führt. Hierfür spricht das dichtere und gleichmäßiger verteilte Kardiomyozytenvorkommen im stimulierten Konstrukt, eine höhere Connexin-43-Dichte und –Intensität, welche für eine bessere Zell-Kopplung sprechen, sowie eine dickere kompakte Kardiomyozytenschicht.

Vermutlich führt die elektrische Stimulation direkt oder über eine verbesserte Zell-Zell-Interaktion zum verstärkten Vorkommen von Kardiomyozyten im Zentrum der EHTs. Die größere Kardiomyozytendichte innerhalb der Gewebe spricht gegen die Annahme, dass Hypoxie oder Nährstoffmangel für die überwiegend periphere Verteilung von Kardiomyozyten in nicht stimulierten EHTs verantwortlich sind. Ebenfalls spielt die Qualität jedes einzelnen Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle. Die Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve zeigte eine Rechtsverschiebung in Richtung physiologischer Werte und auch die gesteigerte Kraftantwort der stimulierten Gewebe auf Isoprenalin spricht für die Ausreifung der Kardiomyozyten in EHTs.

4.5.2 Morphologie und strukturelle Veränderungen

Die dauerhafte elektrische Stimulation führte zu einer deutlich geringeren Verkürzung und einer stärkeren Verschlinkung der Gewebe (alle EHTs nehmen im Laufe ihrer Kultivierung an Länge und Breite ab). Dieser Befund spricht für eine Hemmung des Fibroblastenwachstums oder deren Aktivität und ist als positive EHT-Entwicklung zu werten. Die Kardiomyozytendichte und die Plasma-Kern-Relation nahmen zu. Die Kardiomyozyten waren gleichmäßiger verteilt und longitudinal entlang der Längsachse der EHTs ausgerichtet. Auch die Querstreifung wurde deutlicher. Diese mikroskopischen Unterschiede waren zwischen nicht stimulierten hEHTs und stimulierten hEHTs noch eindrücklicher, wobei erwähnt werden muss, dass die Gewebestruktur unstimulierter hEHTs im Vergleich zu den rEHTs weniger ausgereift ist. Connexin-43, das als Bestandteil der *Gap Junctions* der elektromechanischen Kopplung der Kardiomyozyten dient (Gourdie et al. 1992; Söhl und Willecke 2004; Dhillon et al. 2013), wurde in den rEHTs verstärkt exprimiert. Dies war in der Histologie sichtbar und konnte mit Hilfe der Multiphoton-Mikroskopie und des Genchips quantifiziert werden. Allerdings entsprach die Anordnung der einzelnen Connexine (an den Zellmembranen zwischen jeweils zwei Kardiomyozyten) nicht den physiologischen Gegebenheiten des adulten Herzens, in welchem die Connexine im End-zu-End-Bereich zwischen den Zellen (d.h. in den Glanzstreifen) zu finden sind. Die Ursache hierfür könnte die simultane und diffuse Erregung sein, die bei der Feldstimulation entsteht. Diese unterscheidet sich von der Erregungsleitung im nativen Herzgewebe, bei der die elektrische Stimulation, ausgehend vom Sinusknoten im rechten Vorhof, zielgerichtet im Erregungsleitungssystem in Richtung Herzspitze und Ventrikel verläuft. Die Hypothese, dass die dauerhafte elektrische

Stimulation der EHTs auch auf ultrastruktureller Ebene zur Ausreifung führt, konnte bestätigt werden. Die Analyse der stimulierten rEHTs zeigte homogene Sarkomerstrukturen. Neben besser ausgebildeten M-Banden imponierten insbesondere die gut sichtbaren Z-Streifen. In Letztgenannten kommt es zu einer Quervernetzung von Aktin-Filamenten durch Schichten von alpha-Aktinin. Die Z-Streifen sahen überwiegend gleich aus und zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine geringere Varianz in Bezug auf ihre Breite, was für die Entwicklung der Sarkomere in Richtung eines nativen Phänotyps spricht (Luther 2009). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Langzeit-Stimulation im Vergleich zu kurzen *Pacing*-Perioden (Radisic et al. 2004) oder dem alleinigen Einsatz mechanischer Beanspruchung (Zimmermann et al. 2002) deutliche Vorteile bietet.

4.5.3 Genomweite Expressionsanalyse

Die Verbesserung der Funktionalität und die Zeichen gesteigerter Ausreifung der EHTs lassen sich mit den Ergebnissen der durchgeführten Expressionsanalyse recht gut in Einklang bringen. Die beobachtete Rechtsverschiebung der Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei den *IonOptix*-Messungen ließe sich zum Beispiel mit einer gesteigerten Ausreifung der Myofilamente begründen. Die Spontankontraktionen der Gewebe, die ein Zeichen mangelnder Ausreifung darstellen, verschwanden bei den stimulierten rEHTs dreimal häufiger als bei den Kontrollen. Da allerdings nicht in allen Langzeit-*Pacings* eine Abnahme der Spontanfrequenzen zu verzeichnen war, kann vermutet werden, dass leichte Variationen innerhalb der Präparationen der neugeborenen Ratten, wie deren Alter oder eine versehentliche Verunreinigung der gewonnenen Zellen durch Schrittmacherzellen aus den Vorhöfen, zu einer Beeinflussung der Schlageigenschaften der später produzierten rEHTs führten. HCN4, die wichtigste Ionen-Kanal-Isoform in den Schrittmacherzellen (Barbuti et al. 2007), wurde in den stimulierten Geweben stark herunterreguliert. KCNJ8 hingegen, das zu einer Stabilisierung des Membranpotentials durch vermehrte I_{K1} -Ströme führt, wurde hochreguliert. Des Weiteren waren die stimulierten EHTs im Ruhezustand dünner und zeigten eine höhere Ausgangslänge, was wiederum auf eine geringere Steifheit der Gewebe deuten kann. Letztgenannte kann zum einen mit der besseren Relaxation der Gewebe erklärt werden: Die Genexpression von *Serca2a*, einem entscheidenden Regulator der intrazellulären Kalziumhomöostase, blieb zwar unverändert, allerdings kam es zu einer Herunterregulation seines Inhibitors

Phospholamban. Die daraus resultierende Enthemmung von Serca2a und damit einhergehende gesteigerte Kalziumwiederaufnahme in das endoplasmatische Retikulum könnte zu einer schnelleren Relaxation der stimulierten EHTs führen. Zum anderen führte die dauerhafte elektrische Stimulation zu einer Abnahme der Endothelin-1- (induziert Fibrose und erhöht dadurch die Steifigkeit der Gewebe) und Ctgf-Expression, woraus auf eine Abnahme der Steifigkeit der Extrazellulärmatrix in stimulierten EHTs geschlossen werden kann. Dieses Argument wird wiederum durch deren größere Ausgangslänge erhärtet.

4.6 Vergleich des neuen Modells mit bereits bestehenden Ansätzen

In den vergangenen Jahren kam es zur Durchführung mehrerer Studien, die sich mit der elektrischen Stimulation von künstlich hergestelltem Herzgewebe beschäftigten. Die erste Arbeit zu diesem Thema von Radisic et al. (2004) konzentrierte sich auf die Stimulation von Herzmuskelgewebe im *6-Well*-Format, die durch Aufbringen von Kardiomyozyten auf einen Kollagenschwamm hergestellt wurden. Fünf Tage lang erhielten die Konstrukte monophasische Rechteck-Impulse (2 ms) bei einer Feldstärke von 5 V/cm und einer Frequenz von 1 Hz. Es konnte eine Elongation der Kardiomyozyten gezeigt werden, die Dichte an Connexin-43 nahm zu und die Sarkomerausbildung erschien ausgereifter als in den nicht stimulierten Kontrollgeweben. Diese Ergebnisse wurden in den darauf folgenden Studien bestätigt, wobei *Pacing*-Parameter und Versuchsaufbau variierten. Das von Tandon et al. (2009) erarbeitete Protokoll sah eine veränderte *Pacing*-Dauer von zehn Tagen vor. Den Einfluss unterschiedlicher *Pacing*-Parameter bei einer Stimulationsdauer von fünf Tagen untersuchten Chiu et al. (2011), in dem sie zwei Protokolle direkt miteinander verglichen: symmetrische biphasische Impulse (5 V/cm, 1 Hz, 2 ms) und monophasische Impulse (5 V/cm, 1 Hz, 2 ms). Die biphasische Stimulation zeigte deutliche Vorteile: Sowohl die Struktur als auch die funktionellen Eigenschaften der Herzgewebe verbesserten sich. Trotz dieser Erkenntnis führten Tandon et al. (2011) eine Studie zur Optimierung der Stimulations-Parameter durch, bei der sie weiterhin monophasische Impulse einsetzten. Darüber hinaus ermittelten sie die für ihren Versuchsaufbau optimalen Bedingungen bei einer Feldstärke von 3 V/cm und einer Frequenz von 3 Hz sowie einer Impulsdauer von 2 ms. Allerdings wurden die künstlichen Herzmuskelgewebe in Petrischalen mit größeren Mengen an Medium kultiviert. Die elektrische Stimulation von EHTs im *24-Well*-Format erfolgte bis dato ausschließlich von Lasher et al. (2012). In dieser Studie kamen die nach Hansen et

4 Diskussion

al. (2010) hergestellten Fibrin-EHTs zum Einsatz. Die Anwendung der Konfokalmikroskopie sollte hier die Frage nach der Längenzunahme der Kardiomyozyten sowie der Connexin-43-Verteilung innerhalb der Gewebe beantworten, wobei die technisch limitierte Tiefe von 50 μm nicht überschritten werden konnte. Bei allen genannten Studien wurde die Funktion der Gewebe lediglich als *Excitation Threshold* (ET = minimale Spannung, die benötigt wird, um eine synchrone Kontraktion des gesamten Gewebes auszulösen) und *Maximum Capture Rate* (MCR = maximale Frequenz der synchronen Kontraktionen bei einer definierten ET) angegeben. Die maximale Stimulationsdauer von künstlichen Herzmuskelgeweben lag bisher bei maximal zehn Tagen (Tandon et al. 2009).

Die vorliegende Arbeit vereint eine Vielzahl von neuen Ansätzen und Methoden: Nie zuvor wurden die funktionellen Parameter der EHTs unter elektrischer Stimulation detailliert analysiert und objektiviert, wie es durch das video-optische System möglich war; das Langzeit-*Pacing* von bis zu 36 (rEHTs) und 45 (hEHTs) Tagen stellte einen völlig neuen Ansatz dar; durch den Einsatz der Multiphoton-Mikroskopie konnten die technischen Limitationen der Konfokalmikroskopie (Maximale Eindringtiefe $\sim 50 \mu\text{m}$) umgangen und die Gewebe bis zu einer Tiefe von 200 μm untersucht werden (Kardiomyozyten deutlich unterhalb der oberflächlichen Bereiche, die Dicke der kompakten Kardiomyozytenschicht sowie die Connexin-43-Dichte und -Intensität konnten so untersucht werden); es wurde bislang nicht untersucht, inwiefern die dauerhafte Stimulation Einfluss auf die Genexpression der EHTs hat, durch die genomweite Transkriptanalyse konnte diese Frage beantwortet werden; weiterhin war unklar, ob sich durch die elektrische Stimulation die Antwort der EHTs auf steigende Kalzium-Konzentrationen in physiologischere Bereiche verschiebt, was mit Hilfe des *IonOptix*-Mehrkomponenten-Systems untersucht und bestätigt werden konnte (Hirt et al. 2014). Die von Radisic et al. (2004) stimulierten Konstrukte zeigten einen maximalen *Fractional Area Change* von 4%, was einem *Fractional Shortening* von 2,1% entspricht. Im Vergleich dazu stieg das *Fractional Shortening* der hier untersuchten rEHTs unter Stimulation auf bis zu 18,1% an (+ 88,5% gegenüber den Kontroll-EHTs). Ebenfalls neu war die Untersuchung der Funktion von elektrisch stimuliertem humanem Herzmuskelgewebe. Durch die Entdeckung und Erzeugung von iPS-Zellen durch Yamanaka (2007) können Hautzellen eines Menschen entnommen und zu induzierten pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden

4 Diskussion

(Takahashi et al. 2007). Die anschließende Differenzierung zu Kardiomyozyten ermöglicht die Herstellung von humanen EHTs. Nunes et al. (2013) untersuchten die Auswirkung elektrischer Stimulation auf humane Herzgewebe. Sie generierten Gewebe aus iPS-Zellen, die sieben Tage elektrisch stimuliert wurden. Das von ihnen eingesetzte „Hoch-Frequenz“-Protokoll (Steigerung von 1-6 Hz) zeigte Vorteile gegenüber dem „Niedrig-Frequenz“-Protokoll (Steigerung von 1-3 Hz). Neben Verbesserungen auf ultrastruktureller Ebene (eine verbesserte Sarkomer-Organisation) zeigten sich Veränderungen der Funktionalität (Abnahme der ET und Zunahme der MCR). Es ist überraschend, dass die Stimulation mit einer Frequenz von 6 Hz (360 Schläge pro Minute) zu einer möglichen Ausreifung der Gewebe führte, da die physiologische Herzfrequenz des Menschen deutlich niedriger ist (die Entstehung hypochloriger Säure wurde eventuell durch den Einsatz sehr großer Mengen an Medium kompensiert). Die hEHTs, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurden mit physiologischen Frequenzen von 1,5-2 Hz stimuliert (90-120 Schläge pro Minute), die ausreichten, um die Überstimulation der humanen Gewebe zu gewährleisten. Die dauerhafte elektrische Stimulation der hEHTs (2 Hz/1,5 Hz) führte sowohl zu einer morphologischen als auch zu einer funktionellen Optimierung. Die Kardiomyozyten waren länger und zeigten erstmals eine eindeutige longitudinale Ausrichtung entlang der Hauptachse der Gewebe. Die Querstreifung war deutlich zu erkennen und die Kraftentwicklung stieg um 50% gegenüber den Kontrollgeweben an. Das *Fractional Shortening* stieg bei den stimulierten hEHTs auf 6,9% an, was eine Zunahme um 50% gegenüber den Kontrollgeweben bedeutet. Bisher wurde keine Arbeit mit humanen künstlichen Herzmuskelgeweben publiziert, die qualitativ gleich- oder noch hochwertigere Konstrukte vorstellt als die nach dem hier vorgestellten elektrischen Stimulationsprotokoll hergestellten humanen EHTs (Hirt et al. 2014).

Das von uns entwickelte Protokoll zur dauerhaften elektrischen Stimulation von EHTs lässt sich in jedem Labor, das mit künstlichem Herzmuskelgewebe arbeitet, anwenden. Es bietet eine simple Handhabung und einen geringen Kosten-, jedoch relativ hohen Zeitaufwand in der Durchführung. Die Kompatibilität mit dem 24-Well-Format ermöglicht (auch durch die Leistung des Stimulators) die simultane Stimulation von bis zu 120 Herzgeweben, also einer sehr hohen Anzahl von Geweben. Gerade in dieser Hinsicht ist das von uns entwickelte System im

Gegensatz zu den anderen Ansätzen deutlich im Vorteil. Durch die Förderung der Ausreifung der EHTs verändert sich die Grundlage vieler Studien mit den nach Hansen et al. (2010) entwickelten Geweben. Durch Annäherung an einen kardialen Phänotyp sind die Versuche mit den EHTs aussagekräftiger in Bezug auf die Eigenschaften von nativem Herzgewebe. Die in Zukunft durchgeführten Experimente können von den besser ausgereiften Herzgeweben eindeutig profitieren. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit kommt es im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie mittlerweile bei allen laufenden Studien während der video-optischen Analyse der humanen Gewebe (und teilweise rEHTs) zur elektrischen Stimulation. 50 *Pacing*-Einheiten sind in ständigem Gebrauch.

4.7 Ausblick

Die funktionelle Optimierung und Ausreifung von künstlichem Herzmuskelgewebe durch dauerhafte elektrische Stimulation konnte in dieser Arbeit eindrücklich gezeigt werden. Der weitere Einsatz des *Pacings* ist von daher überaus sinnvoll. Ventrikuläres Herzgewebe schlägt physiologischerweise nicht spontan, sodass die elektrische Stimulation von EHTs aus reinen Ventrikelzellen essenziell ist. Es ist zudem anzunehmen, dass insbesondere die Ventrikelzellen der neugeborenen Ratten in der Kultur soweit dedifferenzieren (sie verlieren ihre Zelltyp-spezifischen Eigenschaften), dass sie beginnen spontan zu schlagen, was als unreifer Zustand angesehen werden kann. Die elektrische Stimulation scheint diesen Vorgang zumindest zu begrenzen und eventuell sogar teilweise zurückzusetzen. Die präklinische Testung neuer Medikamente an humanen EHTs ist darauf angewiesen, dass diese möglichst die gleichen physiologischen Eigenschaften wie natives humanes Herzgewebe aufweisen. Nur so kann sichergestellt werden, dass Substanzen, die *in vitro* getestet werden, auch später tatsächlich die gewünschte Wirkung im menschlichen Organismus erzielen. Es wäre denkbar, das EHT-Modell in Zukunft weiter zu miniaturisieren (zum Beispiel im 96-Well-Format). Je kleiner die Konstrukte, desto weniger Kardiomyozyten müssen pro EHT verwendet werden. Somit erhöhte sich nicht nur die Anzahl an gleichzeitig untersuchtem Gewebe, sondern der Kosten- und Zeitaufwand und die Anzahl der Versuchstiere im Falle von Ratten-EHTs würden ebenfalls minimiert werden. Voraussetzung dafür wäre die Anpassung der *Pacing*-Einheiten und des *Pacing*-Protokolls, was insbesondere in Bezug auf die Herstellung sehr kleiner Carbon-Elektroden eine Herausforderung

4 Diskussion

darstellen würde. Darüber hinaus müsste das eingesetzte Medienvolumen neu bestimmt und die Spannung ausgetestet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass es möglich ist, kleine (etwa 600 µm lange) EHTs herzustellen (Boudou et al. 2012; Ramade et al. 2014). Zur Herstellung von 200 EHTs wurden weniger als eine Million Rattenherzzellen (< ein neonatales Rattenherz) benötigt. Die Gewebe wurden mechanisch und elektrisch stimuliert. Um das Potenzial der Konstrukte für die präklinische Medikamententestung zu testen, wurden die Substanzen Isoprenalin und Digoxin eingesetzt und ihre Auswirkungen auf die Gewebe untersucht (Boudou et al. 2012). Ein weiterer Ansatz zur Optimierung der EHTs wäre die Austestung einer punktuellen Stimulation. Durch das Einbringen von Elektroden an beiden Enden der Gewebe könnte eine bessere Fortleitung der elektrischen Impulse in Längsrichtung provoziert werden (bei der Feld-Stimulation ist das gesamte Konstrukt gleichzeitig den Impulsen ausgesetzt). Besonders in Hinblick auf die Anordnung des Connexin-43 wäre die Punkt-Stimulation interessant zu untersuchen, da vermutet werden kann, dass durch den gerichteten Impulsfluss durch das EHT die Ausreifung der *Gap Junctions* und das Vorkommen an den End-zu-End-Kontakten der Kardiomyozyten zunimmt. Ein angestrebtes Ziel ist es, eines Tages künstlich hergestellte Herzgewebe zu transplantieren und dadurch eine Wiederherstellung beziehungsweise eine Verbesserung der physiologischen Herzfunktion zu erreichen. In frühen Studien konnte gezeigt werden, dass Gelatine- und Alginat-Transplantate, die mit Kardiomyozyten besiedelt waren, für einen längeren Zeitraum nach Transplantation sichtbar waren und einige Zellen trotz Immunreaktion des Empfänger-Organismus überlebten (Leor et al. 2000). Allerdings konnte nicht hinreichend bewiesen werden, ob es durch die Transplantation zur Bildung neuen Herzgewebes gekommen ist. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Konstrukte nach dem Aufbringen auf dem Empfängerherz eine Eigenkontraktilität entwickelten und anfangen zu schlagen (Shimizu 2002). Ebenfalls wurde beschrieben, dass sich die implantierten EHTs ins Empfängerherz integrieren (Furuta et al. 2006) und dessen Funktion verbessern (Zimmermann et al. 2002; Haraguchi et al. 2012). Zimmermann et al. (2006) zeigten erstmals, dass die Transplantation von EHTs auf die Oberfläche von Rattenherzen zu einer Verbesserung der Funktion nach künstlich induziertem Herzinfarkt führte.

4 Diskussion

Trotz der beschriebenen Entdeckungen wird es vermutlich noch Jahre bis zur Herstellung humaner Herzgewebe dauern, die die Voraussetzungen zur Transplantation und nachhaltiger Funktionsverbesserung des menschlichen Herzens erfüllen. Neben den optimalen kontraktile Eigenschaften sowie der elektromechanischen Kopplung stellt auch die physiologisch orientierte Struktur der Herzmatrix eine große Herausforderung für die Herstellung und spätere Transplantation von künstlich hergestelltem Herzgewebe *in vitro* dar (Akins 2002; Zandonella 2003; Radisic et al. 2007). Ebenfalls darf nicht vergessen werden, dass es in Folge von Transplantationen regelmäßig zu Abstoßungsreaktionen kommt, auch, wenn die Gewebe aus iPS-Zellen generiert werden. Das *Pacing* spielt bei der Entwicklung neuer EHTs eine entscheidende Rolle. Durch die gezeigte Ausreifung der Gewebe mit einer Zunahme des Connexin-43 (*Gap Junctions*) könnte die elektrische Kopplung zwischen transplantiertem Gewebe und Empfängerherz unterstützt werden. Der Verlust der Spontanaktivität der EHTs beugt zudem möglicherweise der Entstehung von Arrhythmien nach Transplantation vor. Durch die Annäherung der künstlichen Herzmuskelgewebe an den Phänotyp nativen Herzgewebes werden die Voraussetzungen für den klinischen Einsatz deutlich verbessert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Spontan schlagende künstliche Herzmuskelgewebe (*Engineered Heart Tissues* = EHTs) sind ein zukunftsweisendes *in vitro* Modell für präklinische Medikamentenstudien und die Untersuchung kardialer Erkrankungen. Allerdings sind Kardiomyozyten in EHTs unreif und entwickeln geringere Kräfte als im nativen Herzen. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges *Pacing*-System entwickelt, das mit einer etablierten video-optischen Messung zur Erfassung der kontraktiven Eigenschaften der EHTs kompatibel ist. Es wurde untersucht, inwiefern eine dauerhafte elektrische Stimulation die Eigenschaften der EHTs verbessert. Die Gewebe wurden aus Kardiomyozyten neugeborener Ratten (rEHT, n = 96) oder aus Kardiomyozyten, die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) generiert wurden (hEHTs, n = 19), hergestellt. Die elektrische Stimulation mit biphasischen Impulsen wurde am vierten Tag der Kultur gestartet. Die rEHTs entwickelten nach 16-18 Tagen dauerhafter Stimulation mit 0,5 Hz 2,2-fach höhere Kräfte als die unstimulierten rEHTs. Die Kardiomyozytendichte im Zentrum der stimulierten rEHTs nahm zu, die Connexin-43-Moleküle waren in der Multiphoton-Mikroskopie dichter und ihre Intensität höher. Die Ultrastruktur der Sarkomere zeigte sich in der Elektronenmikroskopie mit regelmäßigen M-Banden deutlich entwickelter. Auch die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalyse ließen sich mit der besseren Funktion und Struktur der EHTs in Einklang bringen. Weitere Zeichen der Ausreifung waren eine Rechtsverschiebung (zu physiologischeren Werten) der Kalzium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die gesteigerte Kraftzunahme als Antwort auf Isoprenalin und die Abnahme der spontanen Kontraktionsaktivität. Humane EHTs, die für eine Woche mit 2 Hz und anschließend mit 1,5 Hz stimuliert wurden entwickelten 1,5-fach höhere Kräfte als nicht stimulierte hEHTs. Die Gewebe zeigten am Tag 14 der Kultur ein verbessertes muskuläres Netzwerk, bestehend aus longitudinal ausgerichteten Kardiomyozyten und einer höheren Plasma-Kern-Relation. Das *Fractional Shortening* von rEHTs und hEHTs nahm durch die elektrische Stimulation zu. Zusammenfassend führt die dauerhafte elektrische Stimulation zu einer verbesserten Funktionalität und Ausreifung der rEHTs und hEHTs, wie sie bisher noch nicht gezeigt wurde. Das dauerhafte *Pacing* der künstlichen Herzmuskelgewebe stellt einen wichtigen Schritt in der Entwicklung voll ausgereifter EHTs dar.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Akins RE (2002) Can Tissue Engineering Mend Broken Hearts? *Circ Res* 2002;90:12:120–122. doi: 10.1161/hh0202.105219
- Anand SS, Islam S, Rosengren A, et al (2008) Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 29:932–40. doi: 10.1093/eurheartj/ehn018
- Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D (2007) The pacemaker current: from basics to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol* 18:342–7. doi: 10.1111/j.1540-8167.2006.00736.x
- Berger HJ, Prasad SK, Davidoff a J, et al (1994) Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol* 266:H341–9.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170:191–203. doi: 10.1016/S0021-9150(03)00097-2
- Boudou T, Legant WR, Mu A, et al (2012) A microfabricated platform to measure and manipulate the mechanics of engineered cardiac microtissues. *Tissue Eng Part A* 18:910–9. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0341
- Cain BS, Meldrum DR, Meng X, et al (1998) Calcium preconditioning in human myocardium. *Ann Thorac Surg* 65:1065–70.
- Carrier RL, Rupnick M, Langer R, et al (2002) Effects of oxygen on engineered cardiac muscle. *Biotechnol Bioeng* 78:617–25. doi: 10.1002/bit.10245
- Chiu LLY, Iyer RK, King J-P, Radisic M (2011) Biphasic electrical field stimulation aids in tissue engineering of multicell-type cardiac organoids. *Tissue Eng Part A* 17:1465–77. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0244
- Crocini C, Arimura T, Reischmann S, et al (2013) Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on contraction parameters of engineered heart tissue. *Basic Res Cardiol* 108:349. doi: 10.1007/s00395-013-0349-x
- Dhillon PS, Gray R, Kojodjojo P, et al (2013) Relationship between gap-junctional conductance and conduction velocity in mammalian myocardium. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 6:1208–14. doi: 10.1161/CIRCEP.113.000848
- Eschenhagen T, Eder A, Vollert I, Hansen A (2012) Physiological aspects of cardiac tissue engineering. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303:H133–43. doi: 10.1152/ajpheart.00007.2012
- Eschenhagen T, Zimmermann WH (2005) Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 97:1220–31. doi: 10.1161/01.RES.0000196562.73231.7d

6 Literaturverzeichnis

- Eschenhagen, Thomas; Fink, Christine; Remmers, Ute; Scholz, Hasso; Wattchow, Jens; Weil, Joachim; Zimmermann, Wolfram; Dohmen, Hans; Schäfer, Hansjörg; Bishopric, Nanette; Wakatsuki, Tetsuro; Elson E (1997) Three-dimensional cardiomyocytes muscle model reconstitution in a collagen system of embryonic matrix: a new heart. *FASEB J* 11:683–694.
- Farah Sheikh, Robert S. Ross JC (2009) Cell-Cell Connection to Cardiac Disease. *Trends Cardiovasc Med* 19:182–190. doi: 10.1016/j.tcm.2009.12.001.Cell-Cell
- Feletou M, Vanhoutte PM (1987) Relaxation of canine coronary artery to electrical stimulation: limited role of free radicals. *Am J Physiol* 253:H884–9.
- Frey N, Katus H a, Olson EN, Hill J a (2004) Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* 109:1580–9. doi: 10.1161/01.CIR.0000120390.68287.BB
- Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, et al (2006) Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res* 98:705–12. doi: 10.1161/01.RES.0000209515.59115.70
- Gordana Vunjak-Novakovic¹, Kathy O. Lui², Nina Tandon¹ and KRC (2011) Bioengineering Heart Muscle: A Paradigm for Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng* 245–267. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071910-124701.Bioengineering
- Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Thompson RP (1992) Anatomy and Embryology Immunolabelling patterns of gap junction connexins in the developing and mature rat heart. 1:363–378.
- Hansen A, Eder A, Bönstrup M, et al (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107:35–44. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211458
- Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, et al (2012) Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nat Protoc* 7:850–8. doi: 10.1038/nprot.2012.027
- Harding SE, Vescovo G, Kirby M, et al (1988) Contractile Responses of Isolated Adult Rat and Rabbit Cardiac Myocytes to Isoproterenol and Calcium Preparation of isolated myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 647:635–647.
- Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, et al (2014a) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 74C:151–161. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.05.009
- Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014b) Cardiac tissue engineering: state of the art. *Circ Res* 114:354–67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300522

6 Literaturverzeichnis

- Hirt MN, Sørensen NA, Bartholdt LM, et al (2012) Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. *Basic Res Cardiol* 107:307. doi: 10.1007/s00395-012-0307-z
- Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al (2007) Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 13:970–4. doi: 10.1038/nm1618
- Lasher RA, Pahnke AQ, Johnson JM, et al (2012) Electrical stimulation directs engineered cardiac tissue to an age-matched native phenotype. *J Tissue Eng* 3:2041731412455354. doi: 10.1177/2041731412455354
- Leor J, Aboulafia-etzion S, Dar A, et al (2000) Bioengineered Cardiac Grafts: A New Approach to Repair the Infarcted Myocardium? *Circulation* 102:56–61. doi: 10.1161/01.CIR.102.suppl
- Löwel H, Meisinger C (2006) [Epidemiology and demographic evolution exemplified for cardiovascular diseases in Germany]. *Med Klin (Munich)* 101:804–11. doi: 10.1007/s00063-006-1108-7
- Luther PK (2000) Three-dimensional structure of a vertebrate muscle Z-band: implications for titin and alpha-actinin binding. *J Struct Biol* 129:1–16. doi: 10.1006/jsbi.1999.4207
- Luther PK (2009) The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J Muscle Res Cell Motil* 30:171–85. doi: 10.1007/s10974-009-9189-6
- McMullen JR, Shioi T, Huang W-Y, et al (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *J Biol Chem* 279:4782–93. doi: 10.1074/jbc.M310405200
- McMurray JJV, Packer M, Desai AS, et al (2014) Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med* 371:140830040023009. doi: 10.1056/NEJMoa1409077
- Moretti A, Bellin M, Welling A, et al (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363:1397–409. doi: 10.1056/NEJMoa0908679
- Morritt AN, Bortolotto SK, Dilley RJ, et al (2007) Cardiac tissue engineering in an in vivo vascularized chamber. *Circulation* 115:353–60. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.657379
- MOSCONA AA (1959) Tissues from dissociated cells. *Sci Am* 200:132–4 passim.
- Naito H, Melnychenko I, Didié M, et al (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114:l72–8. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001560

6 Literaturverzeichnis

- Nuccitelli R (1992) Endogenous ionic currents and DC electric fields in multicellular animal tissues. *Bioelectromagnetics Suppl* 1:147–57.
- Nunes SS, Miklas JW, Liu J, et al (2013) Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 10:781–7. doi: 10.1038/nmeth.2524
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, et al (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 14:213–21. doi: 10.1038/nm1684
- Radisic M, Park H, Shing H, et al (2004) Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18129–34. doi: 10.1073/pnas.0407817101
- Radisic, Park H, Gerecht S, et al (2007) Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1357–68. doi: 10.1098/rstb.2007.2121
- Ramade A, Legant WR, Picart C, et al (2014) Microfabrication of a platform to measure and manipulate the mechanics of engineered microtissues. *Methods Cell Biol* 121:191–211. doi: 10.1016/B978-0-12-800281-0.00013-0
- Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, et al (2011) Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 6:e26397. doi: 10.1371/journal.pone.0026397
- Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493:433–6. doi: 10.1038/nature11682
- 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. doi: 10.1161/hh0302.105722
- Söhl G, Willecke K (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62:228–32. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.11.013
- Stoehr A, Neuber C, Baldauf C, et al (2014) Automated analysis of contractile force and Ca²⁺ transients in engineered heart tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306:H1353–63. doi: 10.1152/ajpheart.00705.2013
- Streckfuss-Bömeke K, Wolf F, Azizian A, et al (2013) Comparative study of human-induced pluripotent stem cells derived from bone marrow cells, hair keratinocytes, and skin fibroblasts. *Eur Heart J* 34:2618–29. doi: 10.1093/eurheartj/ehs203
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019

6 Literaturverzeichnis

- Tandon N, Cannizzaro C, Chao P-HG, et al (2009) Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering. *Nat Protoc* 4:155–73. doi: 10.1038/nprot.2008.183
- Tandon N, Marsano A, Maidhof R, et al (2011) Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 5:e115–e125. doi: 10.1002/term
- Thavandiran N, Dubois N, Mikryukov A, et al (2013) Design and formulation of functional pluripotent stem cell-derived cardiac microtissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E4698–707. doi: 10.1073/pnas.1311120110
- Thygesen K, Alpert JS, White HD (2007) Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 50:2173–95. doi: 10.1016/j.jacc.2007.09.011
- Tiburcy M, Didié M, Boy O, et al (2011a) Terminal Differentiation , Advanced Organotypic Maturation , and Modeling of Hypertrophic Growth in Engineered Heart Tissue The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at □: doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.251843
- Tiburcy M, Didié M, Boy O, et al (2011b) Terminal differentiation, advanced organotypic maturation, and modeling of hypertrophic growth in engineered heart tissue. *Circ Res* 109:1105–14. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.251843
- Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al (2013) Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12:127–37. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.013
- Tulloch NL, Muskheli V, Razumova M V, et al (2011) Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res* 109:47–59. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237206
- Van der Velden J, Klein LJ, van der Bijl M, et al (1998) Force production in mechanically isolated cardiac myocytes from human ventricular muscle tissue. *Cardiovasc Res* 38:414–23.
- Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, et al (2008) Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle Nerve* 37:438–47. doi: 10.1002/mus.20931
- Webster K a, Discher DJ, Bishopric NH (1993) Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268:16852–8.
- Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, et al (2012) Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circ Res* 110:1303–10. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259630
- Zandonella C (2003) The beat goes on. *Nat Med* 421:884–886. doi: doi:10.1038/421884a

6 Literaturverzeichnis

- Zeng Q, Guo Y, Liu L, et al (2013) Cardiac Fibroblast-Derived Extracellular Matrix Produced. *Int Hear J* 2013;54(1):40–4.
- Zhang D, Shadrin IY, Lam J, et al (2013) Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 34:5813–20. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.026
- Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104:e30–41. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.192237
- Zhu W-Z, Xie Y, Moyes KW, et al (2010) Neuregulin/ErbB signaling regulates cardiac subtype specification in differentiating human embryonic stem cells. *Circ Res* 107:776–86. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223917
- Zimmermann W, Didié M, Wasmeier G (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation*. doi: 10.1161/01.cir.0000032876.55215.10
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, et al (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68:106–14.
- Zimmermann W-H, Melnychenko I, Wasmeier G, et al (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12:452–8. doi: 10.1038/nm1394

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Originalarbeiten

Hirt MN*, **Boeddinghaus J***, Mitchell A, Schaaf S, Börnchen C, Müller C, Schulz H, Hubner N, Stenzig J, Stoehr A, Neuber C, Eder A, Luther PK, Hansen A, Eschenhagen T (2014) *Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation*. J Mol Cell Cardiol 74:151-61

(*) *Both authors contributed equally to this work*

Hirt MN, Sörensen NA, Bartholdt LM, **Boeddinghaus J**, Schaaf S, Eder A, Vollert I, Stöhr A, Schulze T, Witten A, Stoll M, Hansen A, Eschenhagen T (2012) *Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model*. Basic Res Cardiol 107:307-315

Abstracts und Kongressbeiträge

Boeddinghaus J, Hirt MN, Schaaf S, Mitchell A, Eder A, Luther PK, Börnchen C, Stenzig J, Hansen A, Eschenhagen T (2014) *Enhanced Maturation of Rat and Human Engineered Heart Tissue (EHT) by Electrical Stimulation*. 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 23.04. – 26.04.2014

Hirt MN, **Boeddinghaus J**, Schaaf S, Mitchell A, Eder A, Luther PK, Börnchen C, Stenzig J, Hansen A, Eschenhagen T (2014) *Maturation of Engineered Heart Tissue (EHT) by Permanent Electrical Stimulation*. 80. DGPT-Jahrestagung, Hannover, 01.04. – 03.04.2014

Hirt MN, Müller D, Alawi M, **Boeddinghaus J**, Stenzig J, Schaaf S, Stöhr A, Sörensen NA, Eder A, Hansen A, Fiedler A, Thum T, Eschenhagen T (2013) *Regulation and therapeutic effects of microRNAs in afterload enhanced engineered heart tissue*. XXI ISHR World Congress, San Diego, United States, 30.06. – 04.07.2013

Sörensen NA, Hirt MN, **Boeddinghaus J**, Bartholdt LM, Schaaf S, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T (2012) *Increased afterload in engineered heart tissue leads to pathological cardiac hypertrophy with irreversibly impaired contractility*. Herbsttagung und Jahrestagung der Arbeitsgruppe Rhythmologie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislauforschung e.V, Hamburg, 11.10 – 13.10.2012, BS44 (5)

7 Veröffentlichungen

Hirt MN, Bartholdt LM, Sörensen NA, **Boeddinghaus J**, Schaaf S, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T (2012) *Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy in engineered heart tissue*. European Society of Cardiology (ESC, International Society for Heart Research (ISHR) – European Section, Heart Failure 2012 Congress, Belgrade, Serbien, 19.05. – 22.05.2012

Hirt MN, Bartholdt LM, Sörensen NA, **Boeddinghaus J**, Schaaf S, Eder A, Hansen A, Eschenhagen T (2012) *Increased afterload is sufficient to induce pathological cardiac hypertrophy in engineered heart tissue*. 7th Ascona International Workshop on Cardiomyocyte Biology, Ascona, Switzerland, 22.04. – 26.04. 2012

Hua X, **Boeddinghaus J**, Gossler T, Stubbendorff M, Deuse T, Michelakis E, Tsao PS, Maegdefessel L, Erben R, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S (2012) *Translational models: A humanized model to study the development of intimal hyperplasia after stenting*. 41. Annual meeting of the german society of thoracic and cardiovascular surgery, Februar 2012, V134

Deuse T, **Boeddinghaus J**, Ricklefs F, Reichenspurner H, Robbins RC, Schrepfer S (2012; Hamburg, Stanford) *Mesenchymal stem cell migration in a murine model of myocardial infarction*. 41. Annual meeting of the german society of thoracic and cardiovascular surgery, February 2012, V245

8 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Professor Eschenhagen für die Überlassung des Themas, das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Dissertation. Die Zeit in seinem Institut hat mir gezeigt, wie beeindruckend und vielseitig die wissenschaftliche Medizin sein kann.

Mein größter Dank gilt Marc Hirt, der mir zu jeder Zeit mit freundschaftlichem Rat und seiner Erfahrung zur Seite stand. Seine Gelassenheit und Großzügigkeit auf der einen und seine Zielstrebigkeit, Hartnäckigkeit und Präzision auf der anderen Seite haben diese Arbeit ausschlaggebend geprägt. Die Zusammenarbeit hat mir stets viel Spaß gemacht und ich konnte eine Menge von ihm lernen (außer Fußballspielen). Er hat die Balance zwischen Fordern und Fördern perfekt hinbekommen und ist ein Freund und Mentor für mich geworden.

Ein herzlicher Dank gilt Professor Arne Hansen, der 2012 mein erster Ansprechpartner war. Er war ausschlaggebend dafür, dass ich meine Dissertation im Institut beginnen konnte.

Ich danke allen MitarbeiterInnen für ihre Kollegialität und die ausgesprochen angenehme Arbeitsatmosphäre. Herausheben möchte ich Bülent Aksehirlioglu, in dessen Werkstatt wir wochenlang gemeinsam getüftelt haben, um die „perfekten“ Elektroden zu entwickeln.

Sabine Koelling und Joachim Kunze vom Zentrallabor der TUHH danke ich für ihren fachkundigen Rat.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind und mich auf meinem Weg begleiten. Es ist ein Privileg, eine solche Familie zu haben.

Meiner Freundin Fabienne danke ich für ihre Seelenverwandtschaft. Ohne sie wäre alles nur halb so schön. Es isch e so!

9 LEBENS LAUF

10 ANHANG

10.1 Auswertungen der rEHTs

10.1.1 Funktionelle Parameter

10.1.1.1 Kräfte

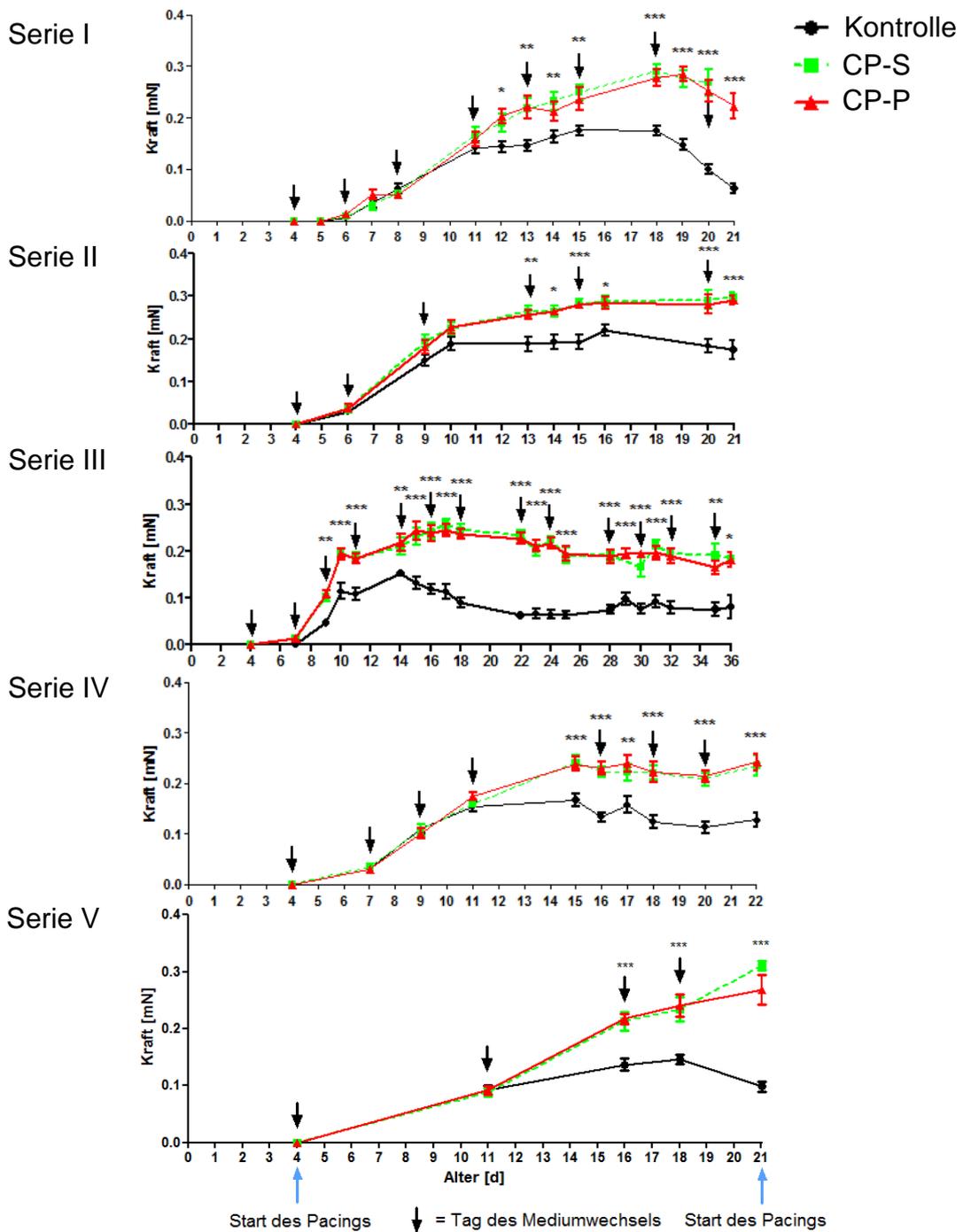


Abb. 10.1: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Kraftentwicklung. Vergleich der Kraftentwicklung von 8-12 Kontrollen gegenüber 8-12 stimulierten EHTs. Alle Langzeit-Pacings zeigten eine Kraftzunahme der stimulierten Gewebe.

10.1.1.2 Frequenzen

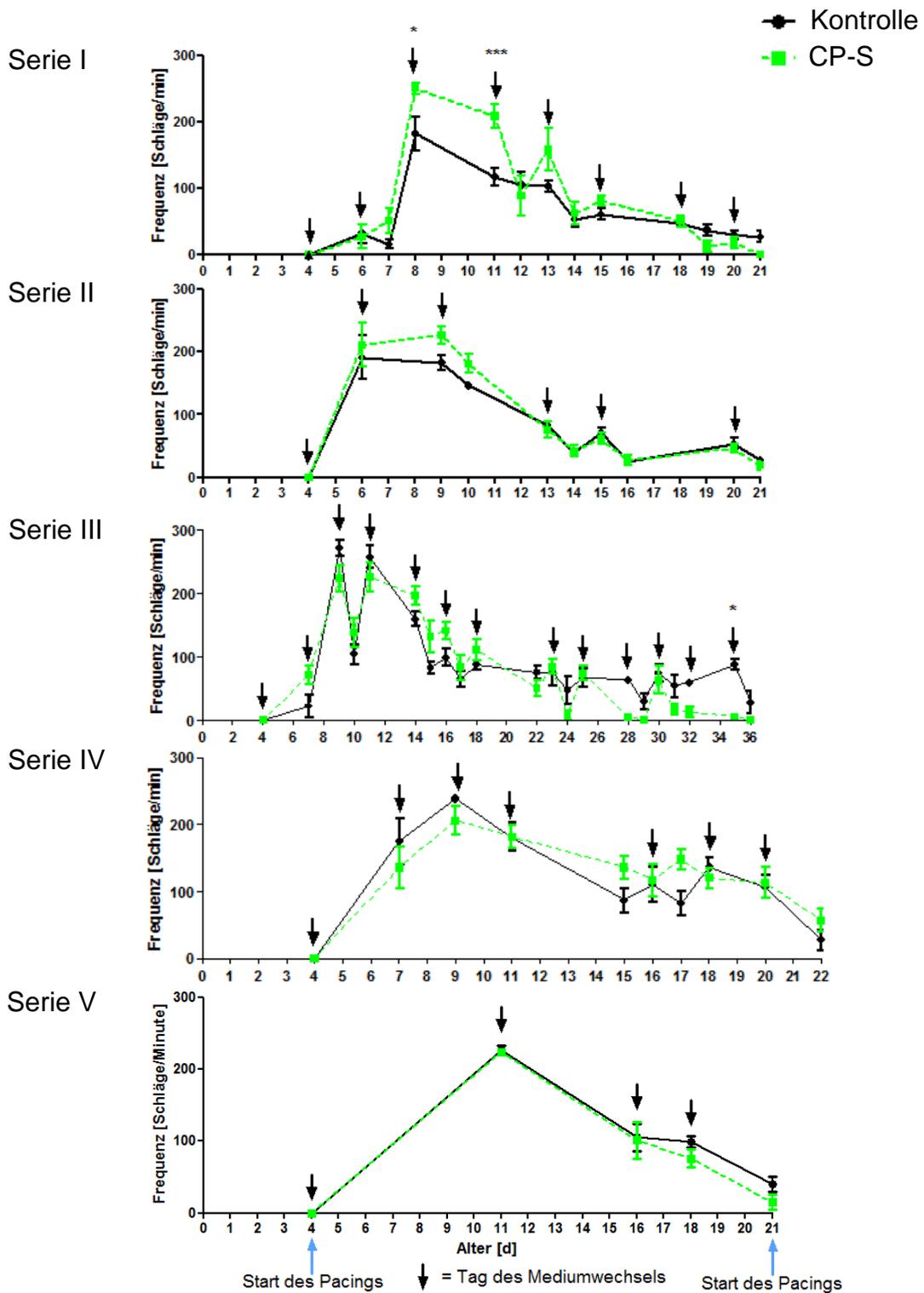


Abb. 10.2: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Frequenzentwicklung. Vergleich der Kraftentwicklung von 8-12 Kontrollen gegenüber 8-12 stimulierten EHTs. Die Stimulation wurde am vierten Tag nach Herstellung der Gewebe gestartet. Mit steigendem Alter der EHTs kam es zu einer Abnahme der Frequenz. Das Ausbleiben von Spontankontraktionen in der Gruppe CP-S ließ sich nicht in allen Langzeit-Pacings wiederfinden.

10.1.1.3 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (CV und RV)

Weitere durch die video-optischen Messungen analysierbare Parameter waren die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten. Sie geben an, mit welcher Geschwindigkeit ein EHT kontrahiert und relaxiert. Bezüglich der CV zeigte sich in allen Langzeit-*Pacings* ein einheitliches Bild: Die Kontraktionsgeschwindigkeit stieg gemeinsam mit der zunehmenden Kraftentwicklung der EHTs an. Somit kontrahierten die stimulierten EHTs schneller als die Kontrollen. Die Analyse der Langzeit-*Pacings* zeigte ebenfalls eine Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeiten in der Gruppe der stimulierten EHTs. Allerdings war der Unterschied zwischen Kontrollen und stimulierten EHTs, insbesondere beim Langzeit-*Pacing* Nr. III, nicht so stark, wie bei den Kontraktionsgeschwindigkeiten.

10 Anhang

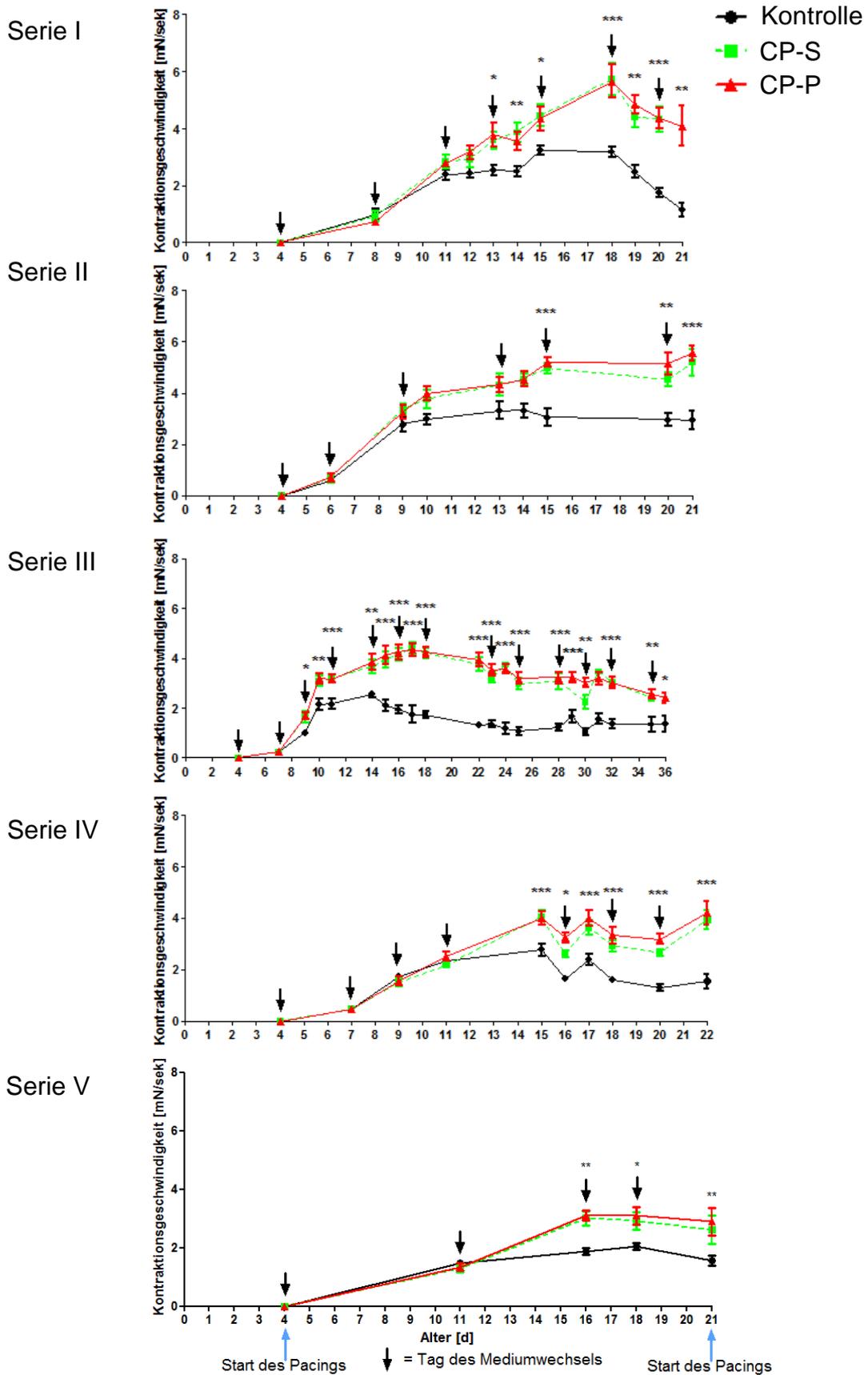


Abb. 10.3: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Kontraktionsgeschwindigkeit. Vergleich der Kontraktionsgeschwindigkeiten aller Langzeit-Pacings. Das einheitliche Bild zeigt, dass am Ende jedes Pacings die Kontraktionsgeschwindigkeiten der stimulierten EHTs gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht waren.

10 Anhang

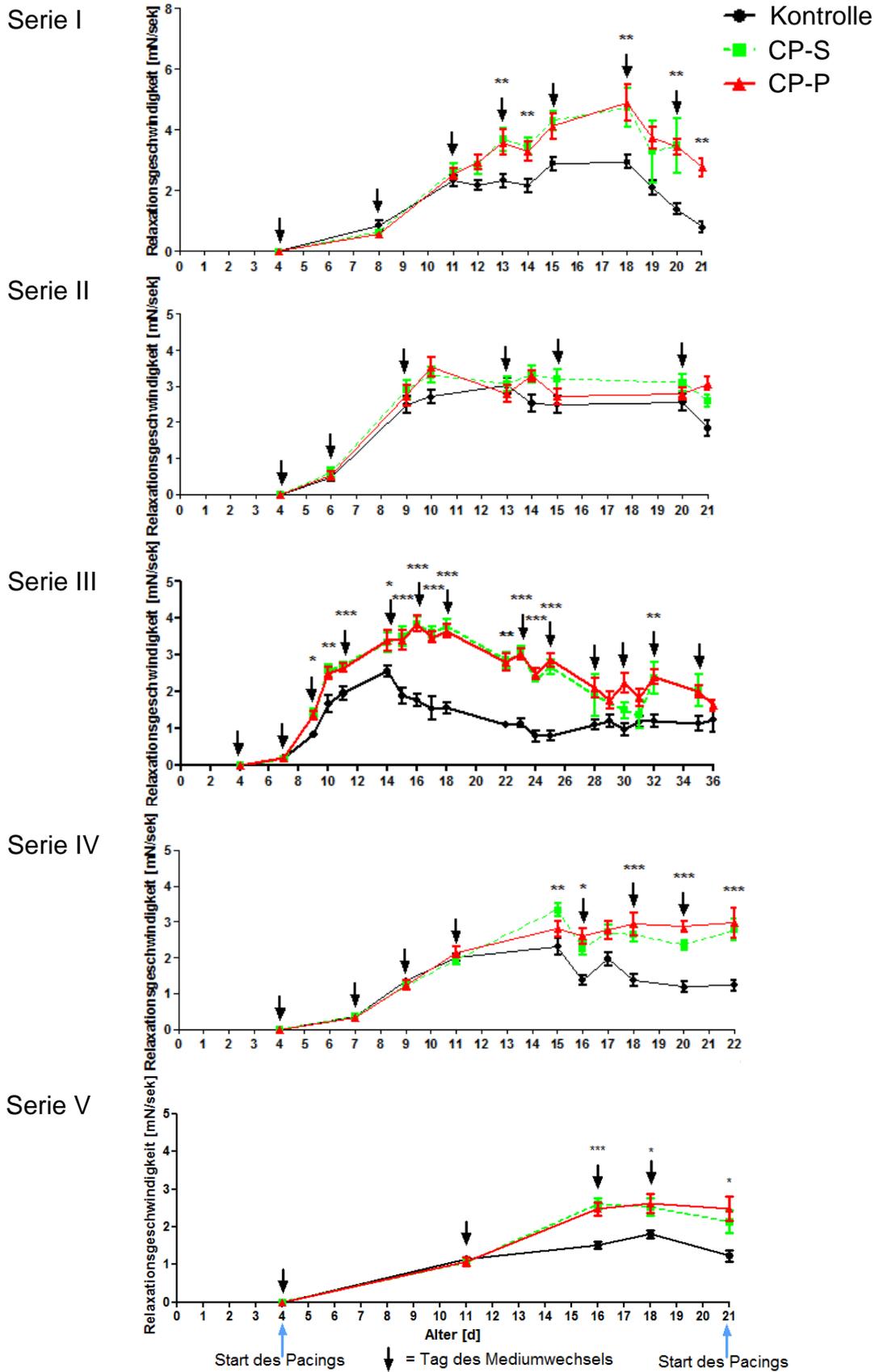
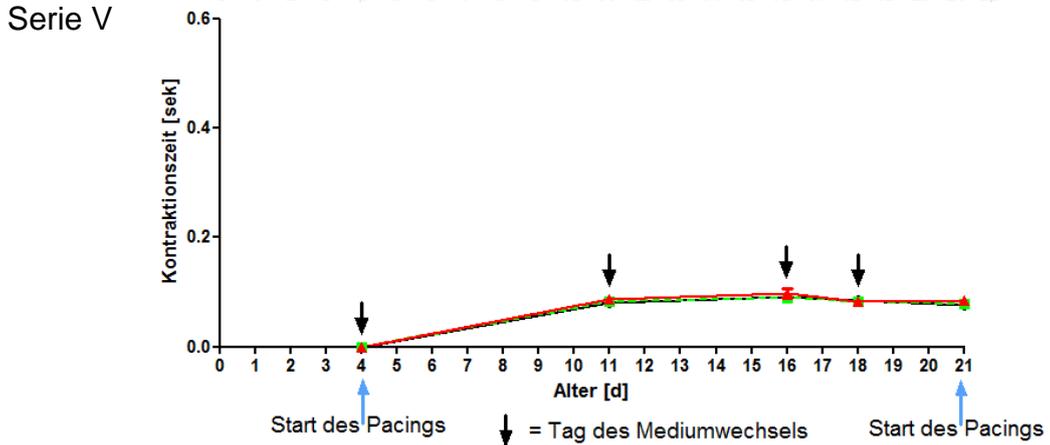
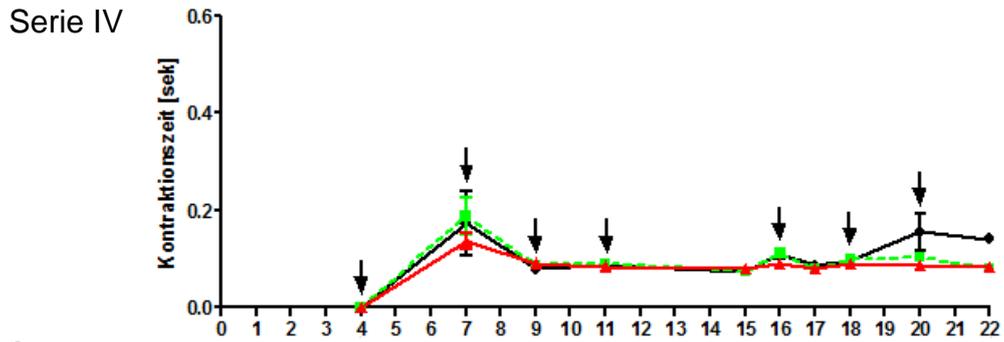
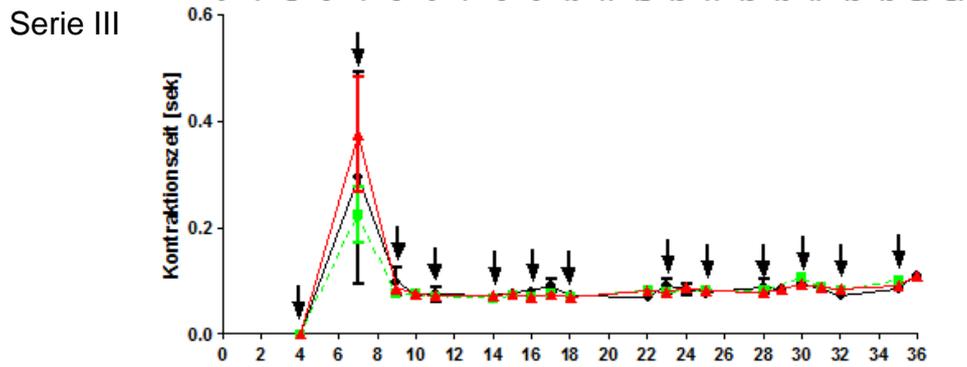
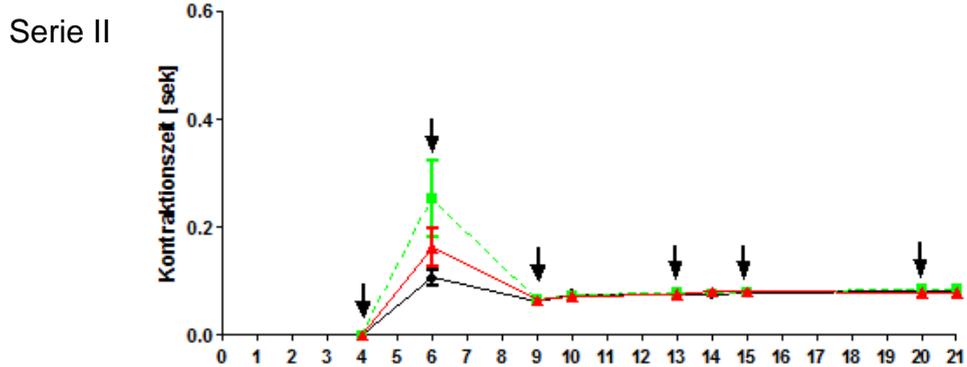
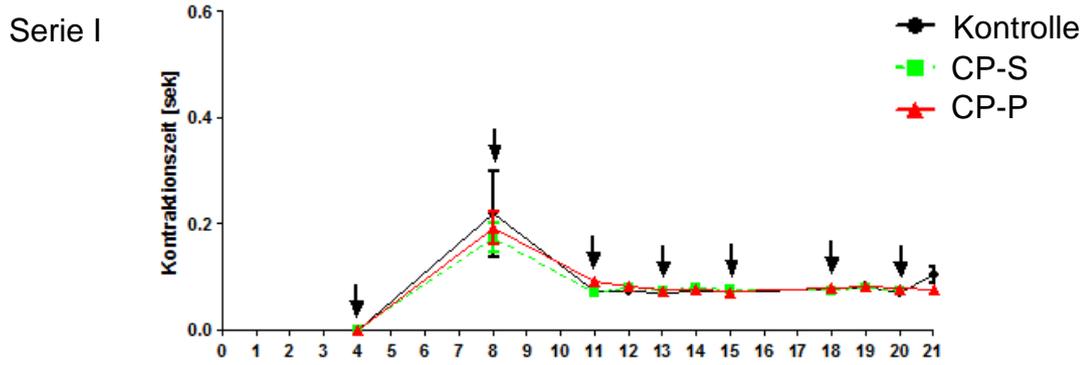


Abb. 10.4: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Relaxationsgeschwindigkeit. Vergleich der Relaxationsgeschwindigkeiten aller Langzeit-Pacings. Die stimulierten EHTs zeigten eine schnellere RV als die Kontrollen. Im Langzeit-Pacing III fiel der Effekt nach 36 Tagen nicht mehr ganz so stark aus.

10.1.1.4 Kontraktions- und Relaxationszeit (T_1 und T_2)

Die Kontraktionszeit beschreibt die Zeitdauer, die ein EHT braucht, um zu kontrahieren. Die Relaxationszeit beschreibt das darauf folgende Zeitintervall, indem sich ein EHT wieder entspannt. Hierbei ermittelt die Software des video-optischen Systems die Zeiten, indem es nicht von der Baseline der Aufzeichnung ausgeht, sondern von 20% der Maximalkontraktion. Effekte der elektrischen Stimulation auf die beiden Parameter waren nicht zu erkennen. Je jünger die EHTs waren, desto stärker variierten die Zeiten und desto größer war der Standardfehler des Mittelwertes. Nach etwa sieben Tagen näherten sich die Zeiten aller Gruppen an und zeigten konstante Werte ohne große Schwankungen. Offensichtlich wurden die höheren Kräfte der stimulierten EHTs von höheren Kontraktionsgeschwindigkeiten begleitet, so dass die Kontraktionszeit unverändert blieb. Entsprechendes gilt für die Relaxationsphase.

10 Anhang



10 Anhang

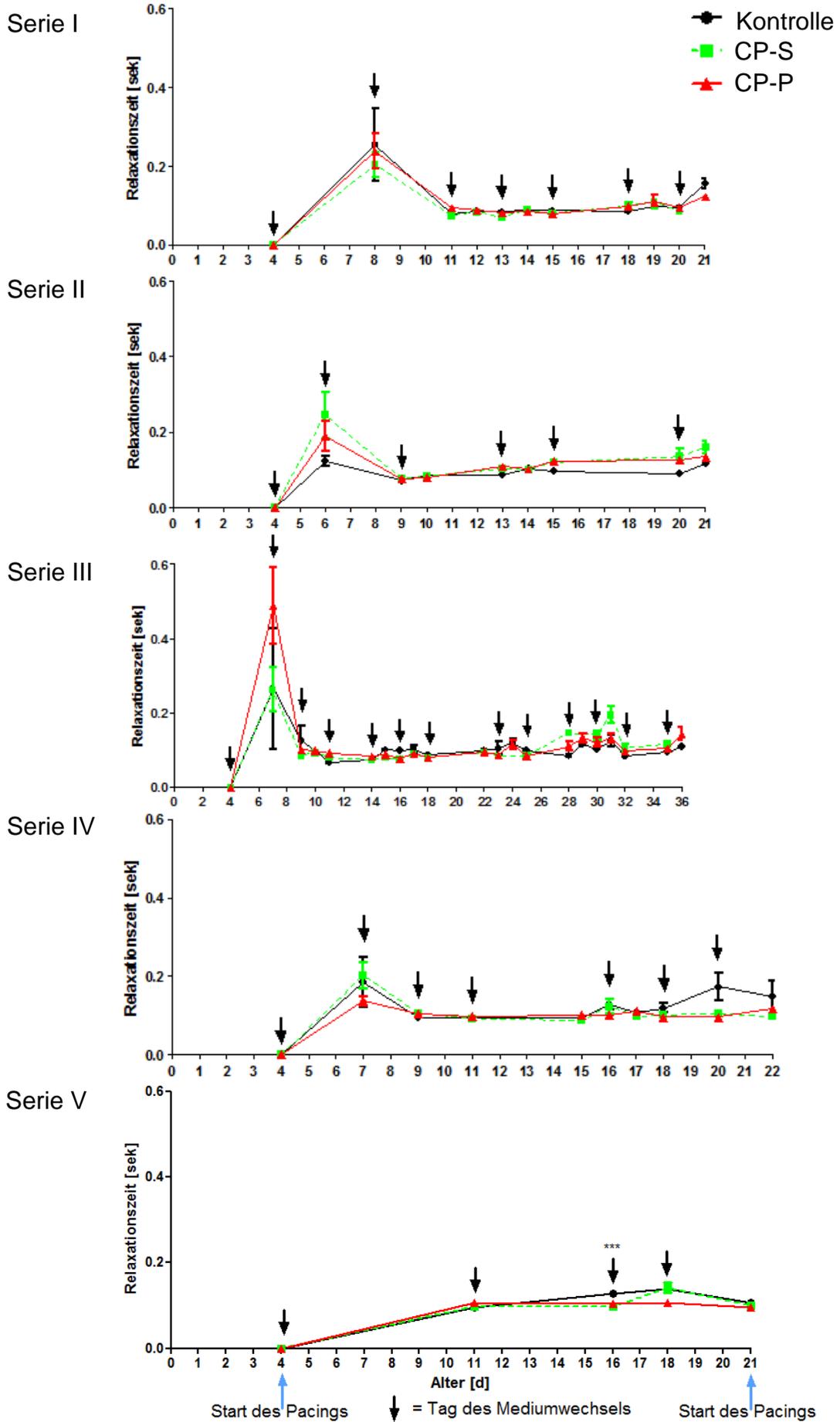


Abb. 10.5 und 10.6: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Kontraktions- und Relaxationszeit. Vergleich der Kontraktions- und Relaxationszeiten aller Langzeit-Pacings. Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht feststellbar.

10.1.2 Fractional Shortening

Das *Fractional Shortening* beschreibt den prozentualen Anteil der Gesamtlänge eines EHTs, um das es sich bei einer Kontraktion verkürzt. Die dauerhafte elektrische Stimulation führte zu einer Zunahme auf 18,1% (CP-S). Somit war das *Fractional Shortening* der stimulierten Gewebe (CP-S) im Vergleich zu den Kontrollen um 88,5% erhöht.

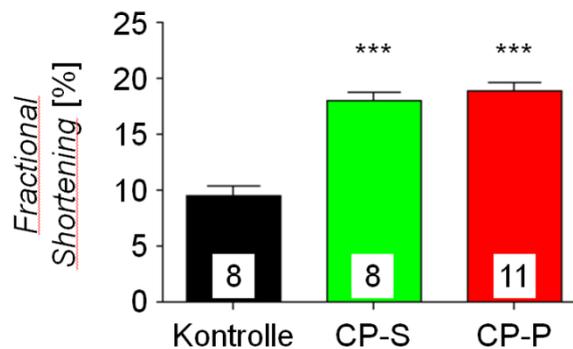


Abb. 10.7: Fractional Shortening von repräsentativen rEHTs nach 16 Tagen Stimulation. Die stimulierten rEHTs entwickelten analog zu den zunehmenden Kräften ein höheres *Fractional Shortening*.

10.1.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die für die qPCR verwendeten EHTs wurden unter Einsatz der *Pacing*-Einheiten, die aus Messing bestanden, gewonnen. Die folgenden Ergebnisse sind somit nicht repräsentativ, da die toxische Wirkung des Messings auf die Gewebe durch chemische Analysen gesichert werden konnte (siehe 3.1.1.2).

Von allen eingesetzten Primern zeigte sich lediglich beim Gja1-Gen (Connexin-43) eine signifikante Zunahme bei den dauerhaft elektrisch stimulierten EHTs, wie sie zu erwarten war. Ansonsten kam es zu einer veränderten Expression des Myl2-Gens (MLC-2a), des Tnn1-Gens (*Slow Skeletal Troponin I*) und des Nppb-Gens (BNP).

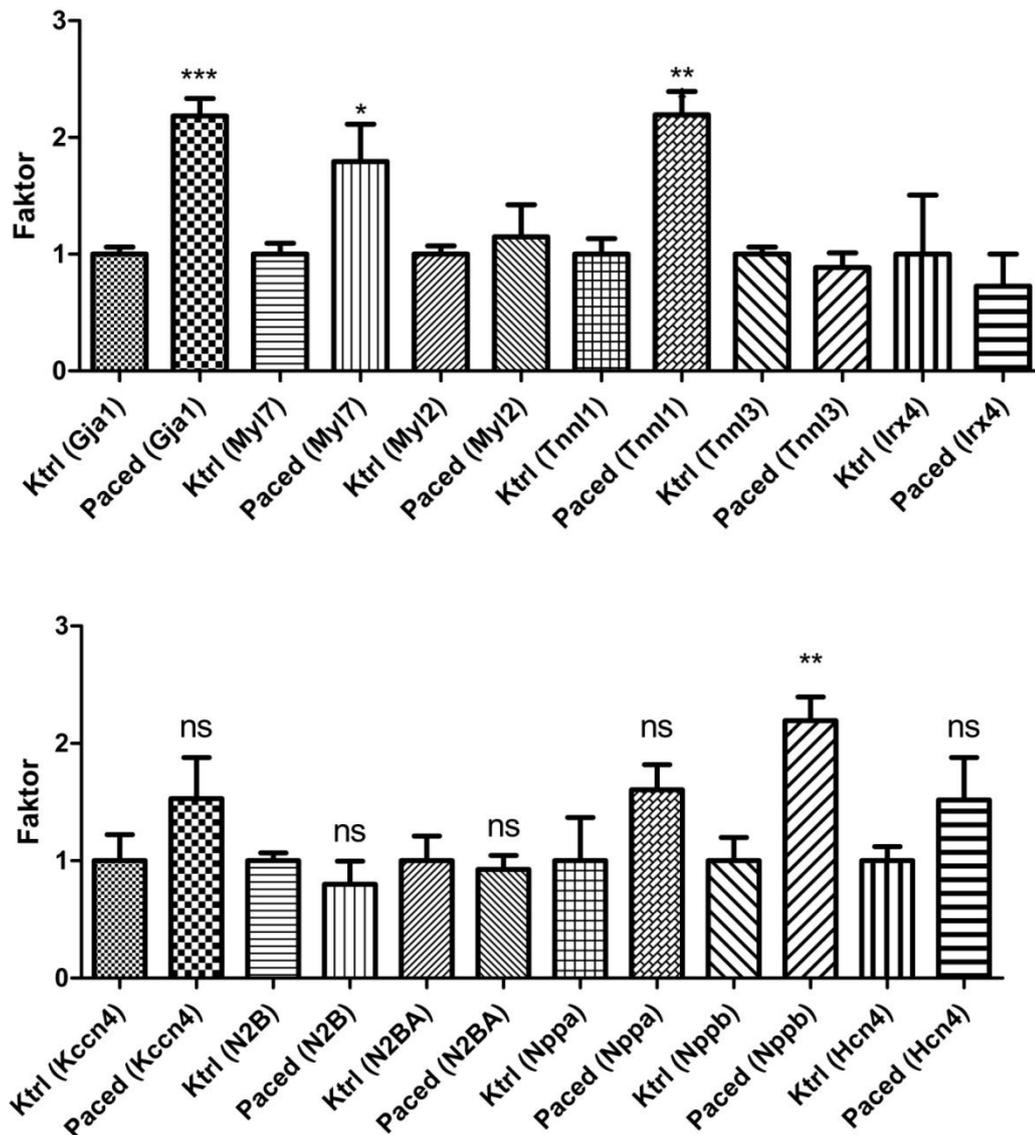


Abb. 10.8: Quantitative Echtzeit-PCR. Eine signifikante Änderung, wie sie erwartet wurde, ergab sich nur für Connexin-43.

10.2 Auswertungen der hEHTs

10.2.1 Funktionelle Parameter

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die humanen EHTs, die vor Etablierung des Laktat-Protokolls zum Einsatz kamen.

10.2.1.1 Kräfte

Die Entwicklung der Kräfte unterschied sich bei allen dauerhaft durchgeführten Stimulationen. Herzgewebe, die mit 0,5 Hz stimuliert wurden, zeigten zeitweise eine signifikante Zunahme ihrer Kräfte, die sich allerdings zum Ende des Versuches

wieder den Werten der Kontrollen annäherten. Die Stimulation mit 1 Hz zeigte ein ähnliches Bild, wobei der Zeitraum der zwischenzeitlich divergierenden Kraftkurven deutlich kürzer war. Das *Pacing* mit 1,5 Hz zeigte in Bezug auf die Kraftentwicklung den geringsten Effekt. Die graphische Auswertung zeigt ein sehr unklares Bild mit hohen Standardabweichungen der Mittelwerte. Diese Ergebnisse lassen sich vermutlich mit der Frequenz-abhängigen Bildung hypochloriger Säure erklären. Je höher die Frequenz, desto größer der Anfall an toxischen Metaboliten. Zudem reichten die eingesetzten Frequenzen scheinbar nicht aus, um eine Überstimulation und eine damit einhergehende nachhaltige Zunahme der Kräfte zu induzieren.

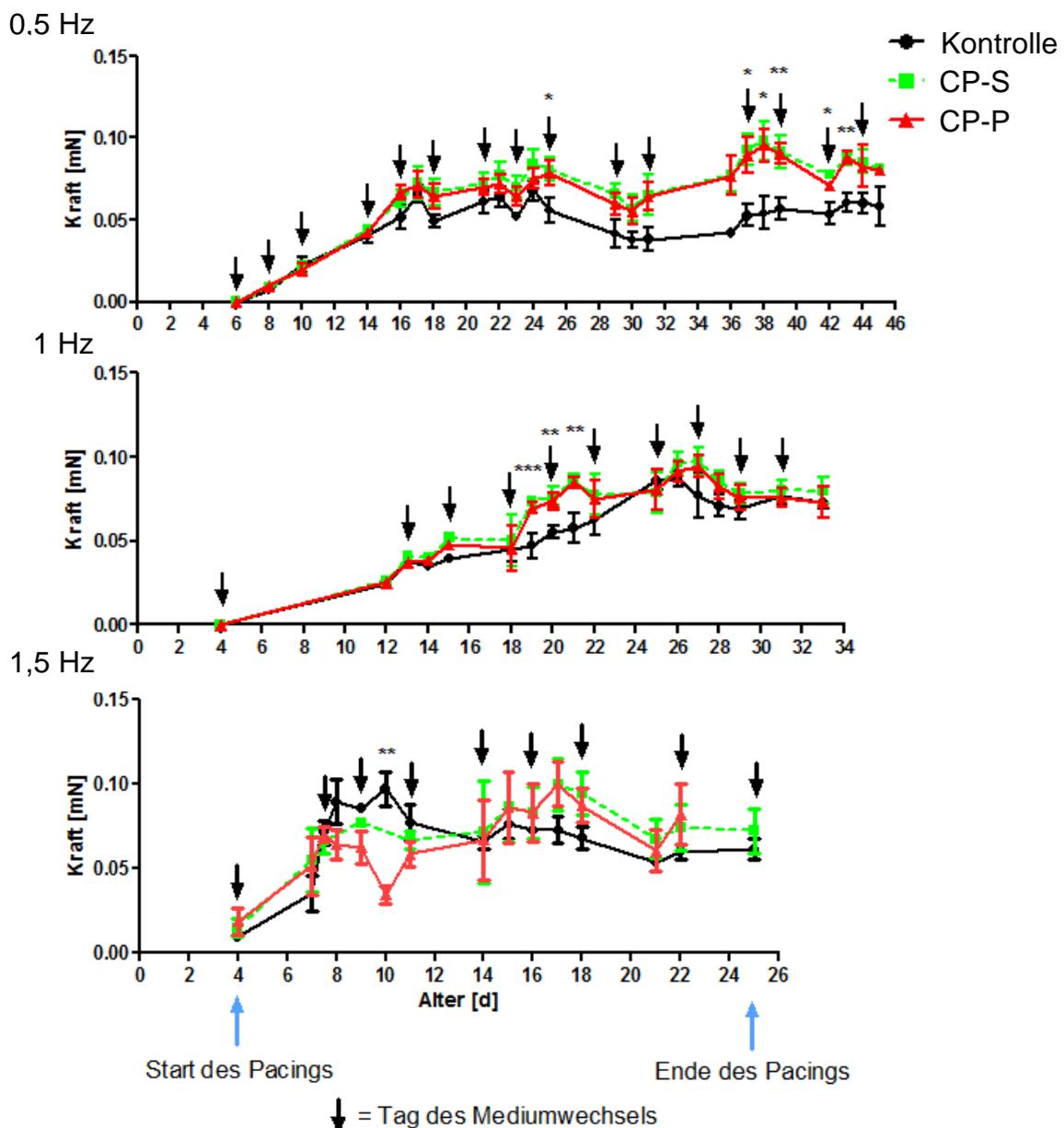


Abb. 10.9: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Kraftentwicklung. Vergleich der Kraftentwicklung von 4-8 Kontrollen gegenüber 4-8 stimulierten hEHTs.

10.2.1.2 Frequenzen

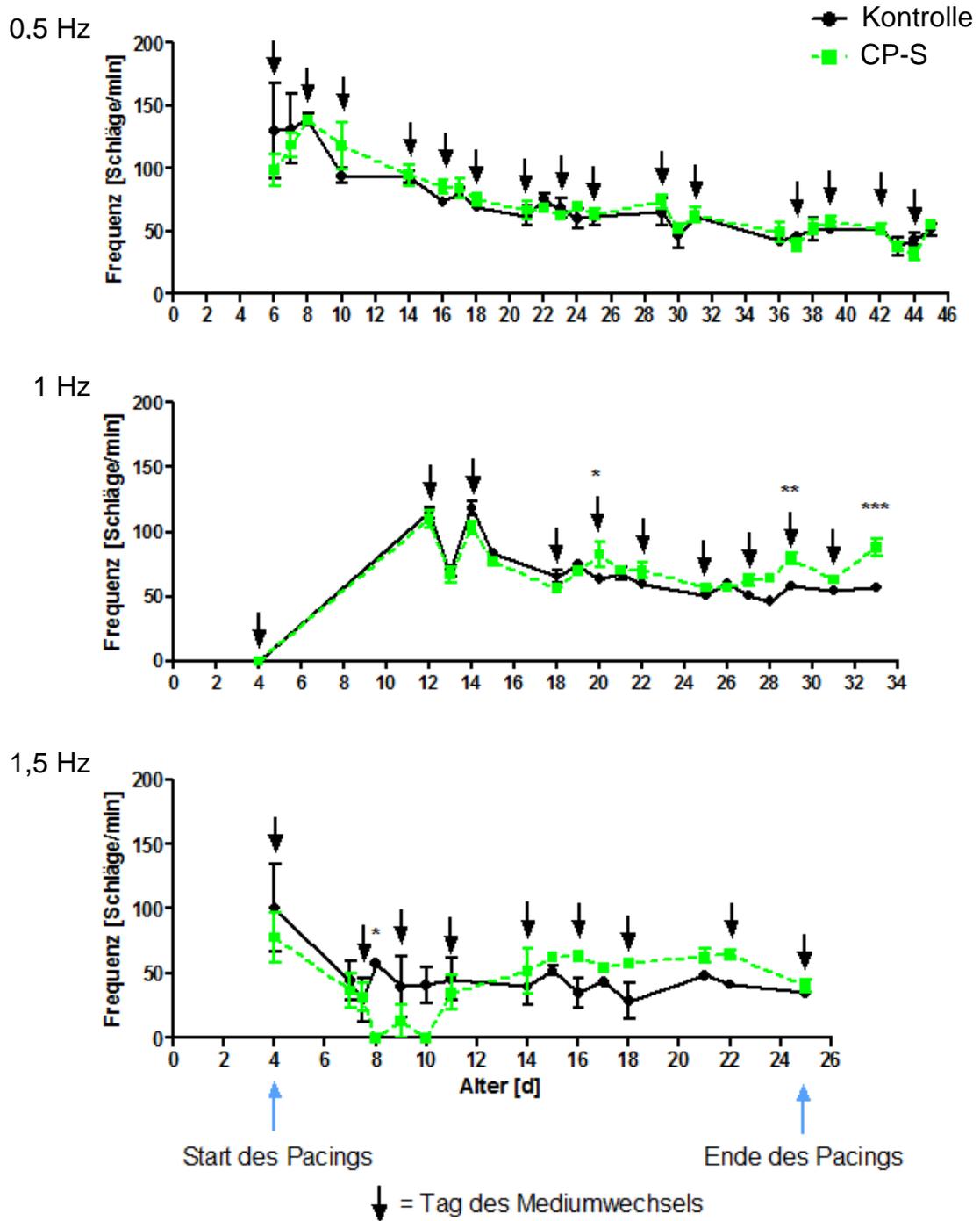


Abb. 10.9: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Frequenzentwicklung. Vergleich der Kraftentwicklung von 8-12 Kontrollen gegenüber 8-12 stimulierte hEHTs.

10.2.1.3 Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit (CV und RV)

Die Entwicklung der Kontraktionsgeschwindigkeiten verlief analog zur Kraftzunahme und zeigte insbesondere beim *Pacing* mit 0,5 Hz eine zwischenzeitlich deutliche Divergenz zwischen den EHTs der unterschiedlichen Gruppen. Ab Tag 24 bis zum Tag 42 war der Effekt am deutlichsten zu erkennen. Danach näherten sich die Kurven wieder an. Auch bei der Stimulation mit 1 Hz war eine Zunahme zwischen Tag 14 und 25 festzustellen. Diese war weniger deutlich als beim vorhergegangenen Protokoll mit 0,5 Hz, aber ebenfalls zu erkennen. Wurde mit 1,5 Hz stimuliert, war keine eindeutige Veränderung auszumachen. Ab Tag 22 waren die CP-P nicht mehr zu messen, da sich die Erkennung der EHTs im video-optischen System erschwerte.

Die Entwicklung der Relaxationsgeschwindigkeiten entsprach den Auswertungen der Kontraktionsgeschwindigkeiten. Die deutlichsten Effekte waren bei dem *Pacing* mit 0,5 Hz zu sehen, gefolgt von der Stimulation mit 1 Hz. Wurde mit 1,5 Hz stimuliert, war keine eindeutige Veränderung auszumachen.

10 Anhang

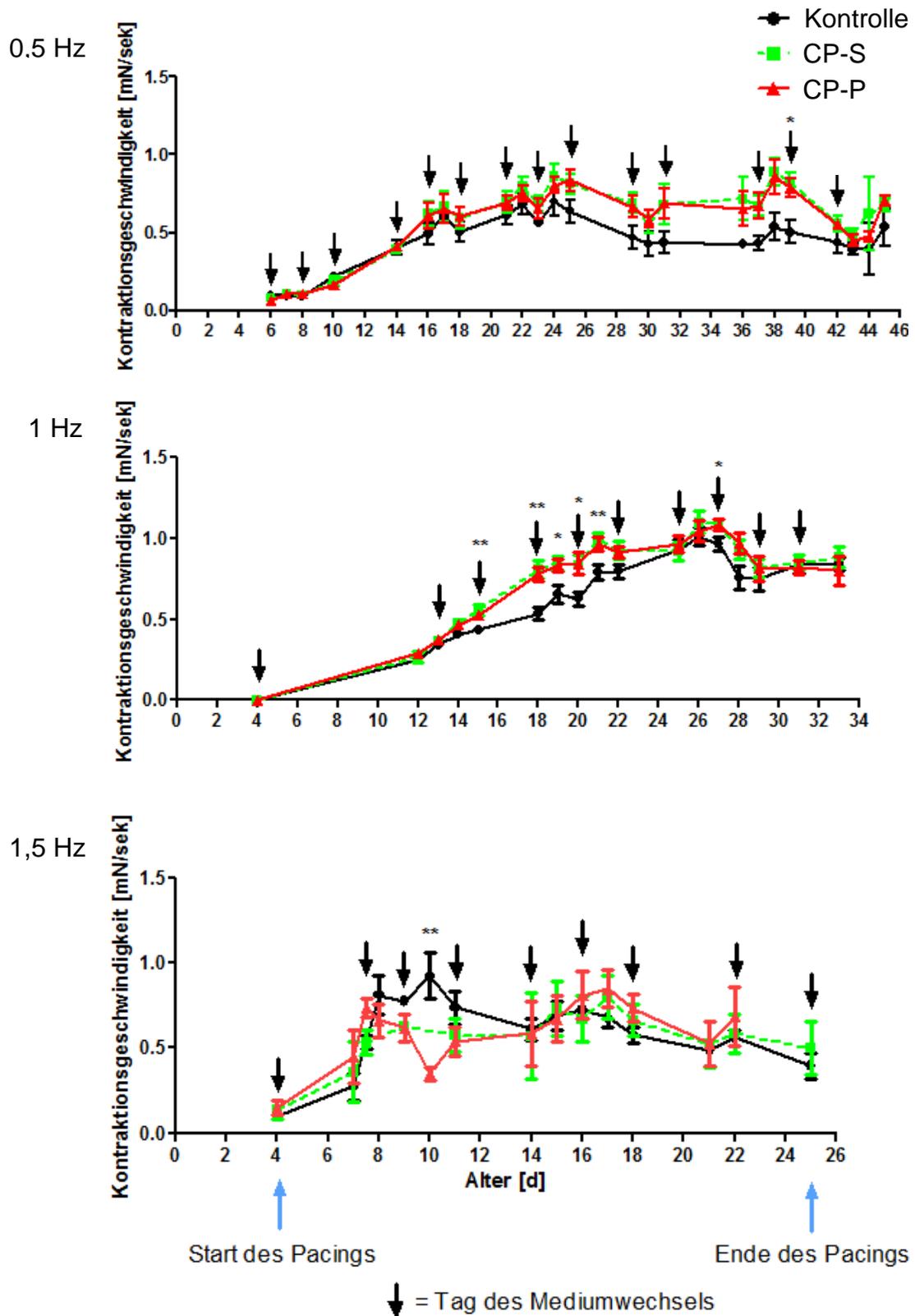


Abb. 10.11: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Kontraktionsgeschwindigkeit. Vergleich der Kontraktionsgeschwindigkeiten aller Langzeit-Pacings. Es besteht kein einheitliches Bild in Bezug auf die Auswirkungen unterschiedlicher Stimulations-Frequenzen auf die Kontraktionsgeschwindigkeiten der hEHTs.

10 Anhang

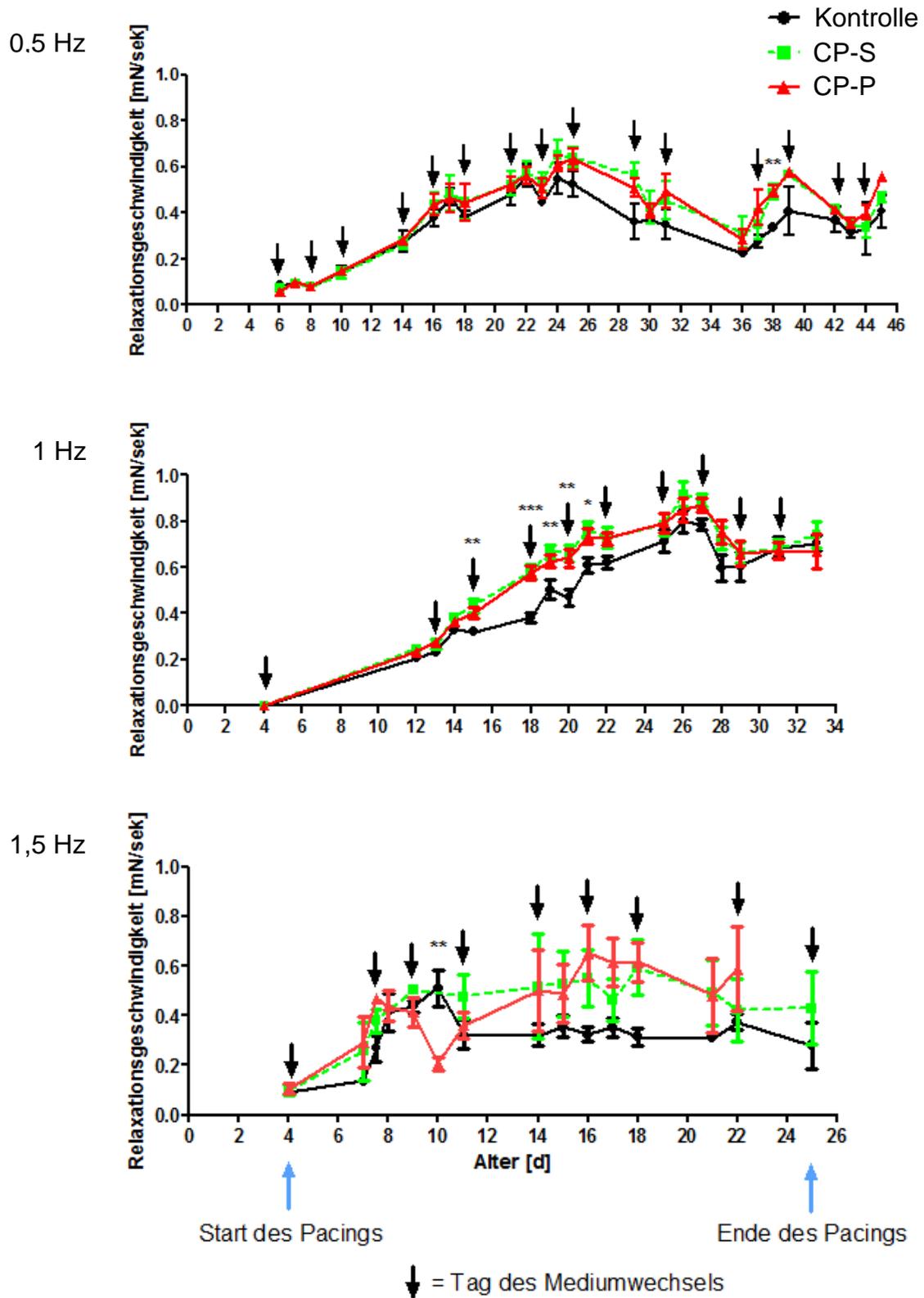
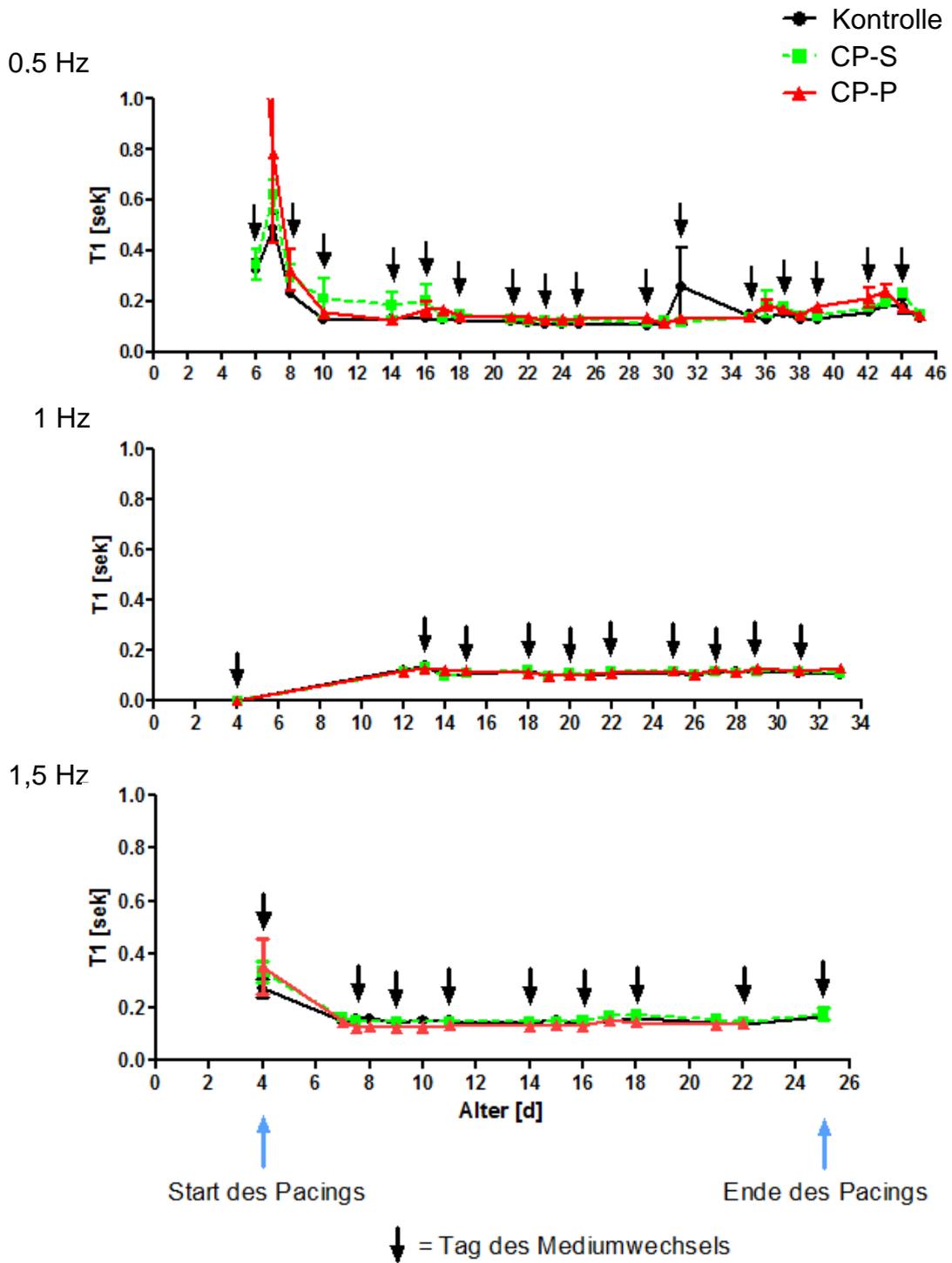


Abb. 10.12: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Relaxationssgeschwindigkeit. Vergleich der Relaxationsgeschwindigkeiten aller Langzeit-Pacings. Zwischen beiden Gruppen an EHTs waren keine einheitlichen Veränderungen der Relaxationsgeschwindigkeiten festzustellen.

10.2.1.4 Kontraktions- und Relaxationszeit (T_1 und T_2)

In keiner der Langzeitstimulationen kam es zu Unterschieden der Kontraktions- oder Relaxationszeiten.



10 Anhang

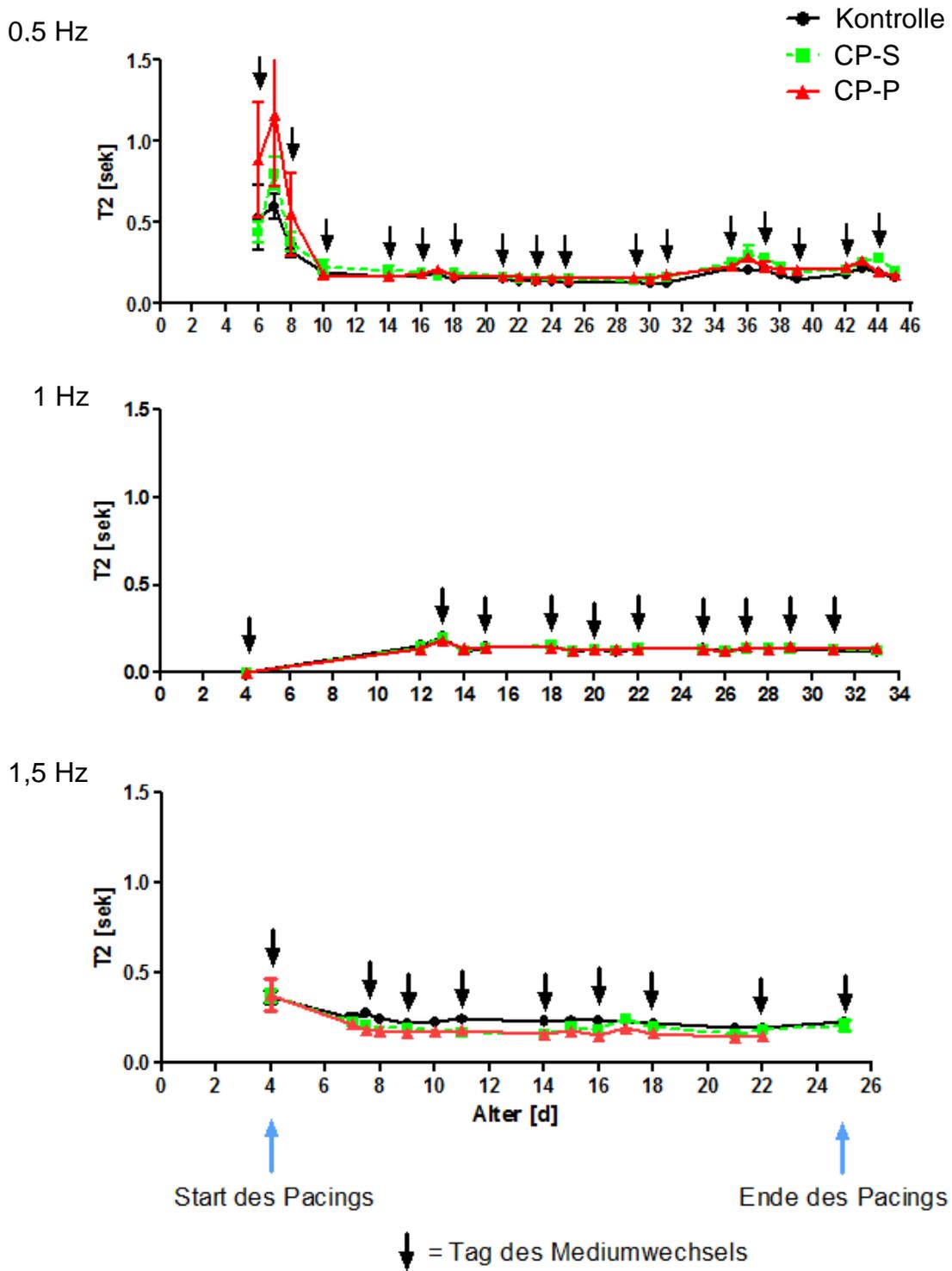


Abb. 10.13: Einfluss von elektrischer Stimulation auf die Kontraktions- und Relaxationszeit. Vergleich der Kontraktions- (T_1) und Relaxationszeiten (T_2) aller Langzeit-Pacings. Signifikante Unterschiede waren nicht feststellbar.

10.2.2 Fractional Shortening

Das *Fractional Shortening* steigerte sich entsprechend der Kraftzunahme der stimulierten EHTs auf zu bis 6,9% (Zunahme um 50%). Die Bestimmung erfolgte nach einer Stimulationszeit von zehn Tagen.

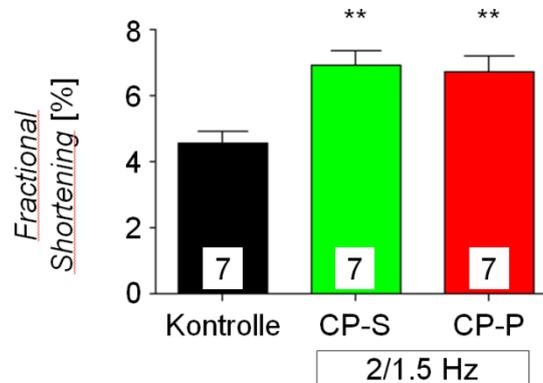


Abb. 10.14: Fractional Shortening von repräsentativen hEHTs nach zehn Tagen Stimulation. Die stimulierten hEHTs entwickelten analog zu den zunehmenden Kräften ein höheres *Fractional Shortening*.

10.2.3 Histologie

10.2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbungen von humanen EHTs ließen vermuten, dass die Kardiomyozyten in beiden Gruppen tendenziell in der Peripherie der Gewebe angesiedelt waren. Allerdings waren Kardiomyozyten nicht eindeutig zu erkennen, eine Ausreifung der hEHTs in der Histologie somit nicht klar zu erkennen: die Zellkerne waren überwiegend rund, das Verhältnis von Zytoplasma zum Zellkern niedrig und die Orientierung der Kardiomyozyten innerhalb des Gewebes uneinheitlich (vgl. Abb. 10.15).

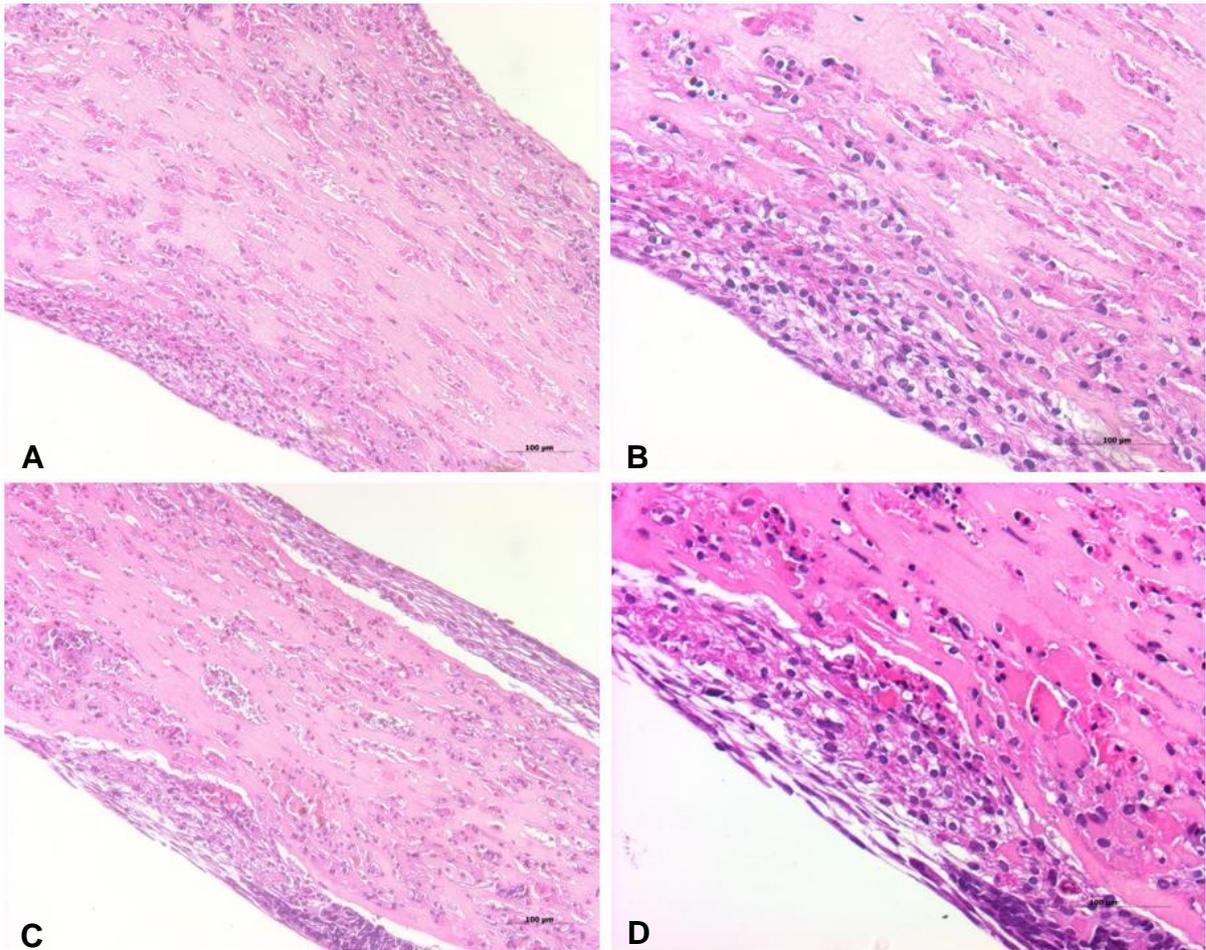


Abb. 10.15: HE-Färbungen von humanen EHTs vor Verwendung des Laktat-Protokolls. (A) Kontrollen in 10-facher und (B) 20-facher Vergrößerung sowie ein stimuliertes EHT in den gleichen Vergrößerungen (C und D). Alle EHTs wurden für 45 Tage kultiviert. Die elektrische Stimulation erfolgte für 41 Tage.

10.2.4 Immunhistochemie

10.2.4.1 Myosin-Leichte-Kette-2-atrial (MLC-2a) und -ventrikulär (MLC-2v)

Die Färbung für MLC-2v hingegen zeigte, dass die Kardiomyozyten in der Randregion der EHTs angesiedelt waren. Es war nicht eindeutig zu bestimmen, ob die dauerhaft stimulierten Gewebe kardiomyozytenreicher waren als die Kontroll-EHTs. Ebenfalls blieb unklar, warum die Herzzellen nur in den Randregionen zu finden waren (vgl. Abb. 10.16).

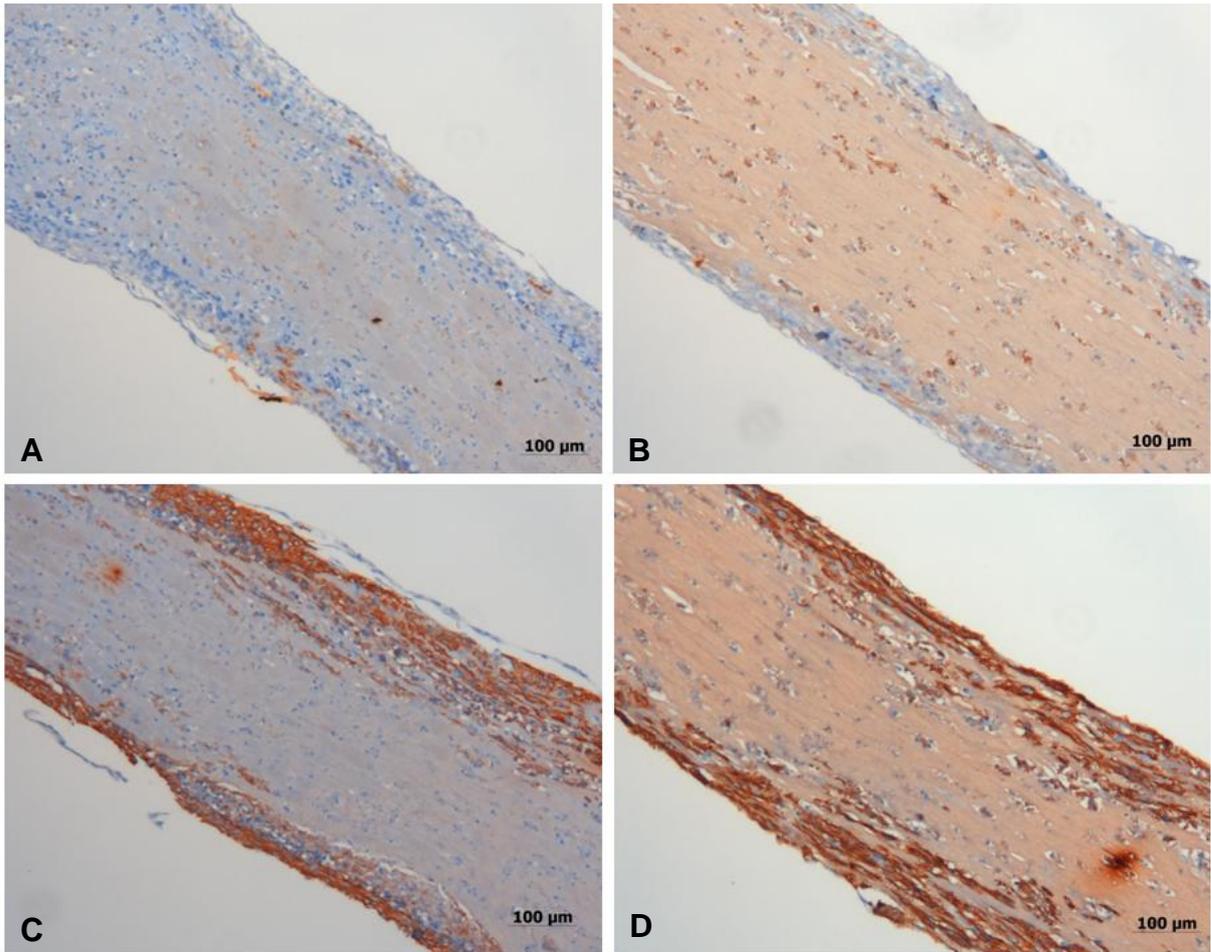


Abb. 10.16: Immunhistochemie von humanen EHTs für MLC-2a und MLC-2v vor Verwendung des Laktat-Protokolls. (A) Immunhistochemische MLC-2a-Färbung einer Kontrolle und (B) eines dauerhaft stimulierten EHT. (C) Immunhistochemische MLC-2v-Färbung einer Kontrolle und (D) eines stimulierten EHT. Alle EHTs wurden 25 Tage kultiviert. Die elektrische Stimulation erfolgte für 21 Tage.

10.2.4.2 Connexin-43

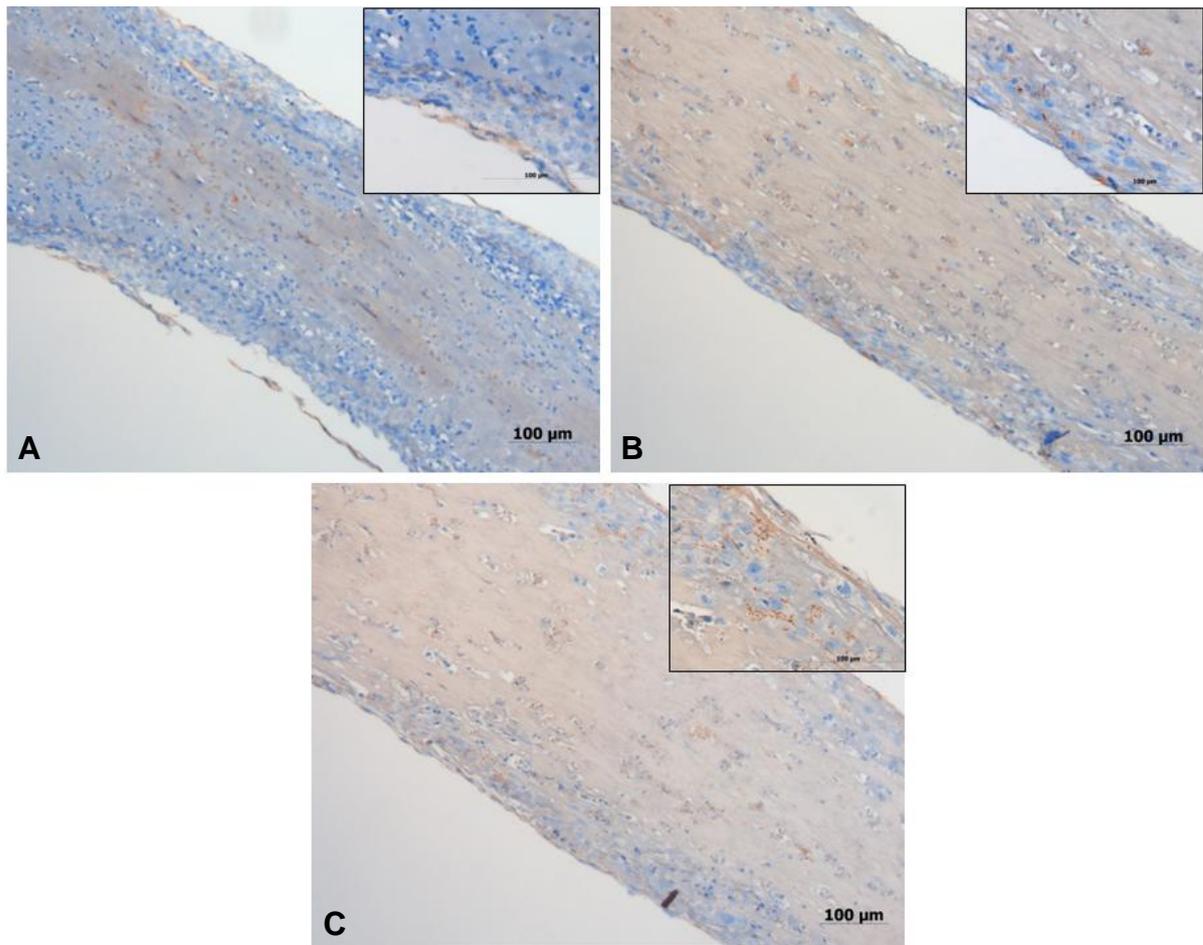


Abb. 10.17: Immunhistochemie von hEHTs für Connexin-43 vor Verwendung des Laktat-Protokolls. (A) Immunhistochemische Färbungen für Connexin-43 einer Kontrolle in 10- und 20-facher Vergrößerung und (B und C) zweier dauerhaft stimulierter EHTs. Alle EHTs wurden 25 Tage kultiviert. Die elektrische Stimulation erfolgte für 21 Tage.

10.2.5 Elektronenmikroskopie vor Verwendung des Laktat-Protokolls.

Vor Einführung des Laktat-Protokolls wurden die hEHTs für unterschiedlich lange Zeiträume stimuliert. Das erste Langzeit-*Pacing* lief über 45 Tage (41 Tage Stimulation), das zweite über 33 Tage (29 Tage Stimulation) und das dritte dauerte 25 Tage (21 Tage Stimulation). Die 25 Tage alten EHTs, die für 21 Tage stimuliert wurden, zeigten im Vergleich zu den Kontrollen geringe ultrastrukturelle Veränderungen. Auffallend war ein besser definierter A-I-Banden-Übergang in der Gruppe der stimulierten EHTs. Die Ausrichtung der Myofibrillen war sowohl bei den stimulierten als auch bei den Kontrollgeweben in manchen Präparaten gut zu sehen, wobei die Anordnung der Mitochondrien zwischen und entlang der Myofibrillen im Vergleich zu nativem Herzgewebe oder den stimulierten rEHTs nicht zu erkennen

war. Es fiel weiterhin in den EHTs beider Gruppen auf, dass die Myofibrillen in einigen Kardiomyozyten ungeordnet erschienen, d.h. entweder nur teilweise longitudinal oder komplett transversal angeordnet waren. *Fasciae adhaerentes* wurden in unstimulierten und stimulierten Geweben zwischen Sarkomeren als Verbindung zweier Zellen beobachtet. Allerdings erschienen diese ungeordneter als im nativen Gewebe oder in den rEHTs. Darüber hinaus imponierten deutliche Zeichen von Autophagie, insbesondere in den 45 Tage alten EHTs, was auf ein unnatürliches Verhalten der Zellen hindeutet. Die EHTs, die für 45 Tage in Kultur gehalten wurden, zeigten eine Vielzahl interessanter Auffälligkeiten. Am meisten beeindruckte, dass die Kardiomyozyten nicht länger in komplettem Kontakt mit der Fibrin-Matrix standen. Die Zellen schienen geschrumpft zu sein und wiesen nicht mehr ihre natürliche Form auf. Am deutlichsten fiel dies bei den 41 Tage lang stimulierten EHTs auf, bei denen die Definition der Z-Bande im Vergleich zu den 21 Tage lang stimulierten Geweben deutlich abnahm. Der A-I-Banden-Übergang war nicht länger zu erkennen, die Sarkomere erschienen kontrahiert. Die Sarkomere der Kontrollen der 45 Tage alten Gewebe waren besser strukturiert als die der stimulierten EHTs und wiesen teilweise sichtbare A-I-Banden auf. Insgesamt konnten keine eindeutigen Zeichen einer gesteigerten Ausreifung der EHTs am Tag 25 festgestellt werden. Ein noch längeres *Pacing* führte zudem zu einer weiteren Abnahme an Myofibrillen und Mitochondrien. Kurioserweise waren die *Fasciae adhaerentes* bei den Kontrollen und stimulierten EHTs nach 45 Tagen signifikant besser definiert.

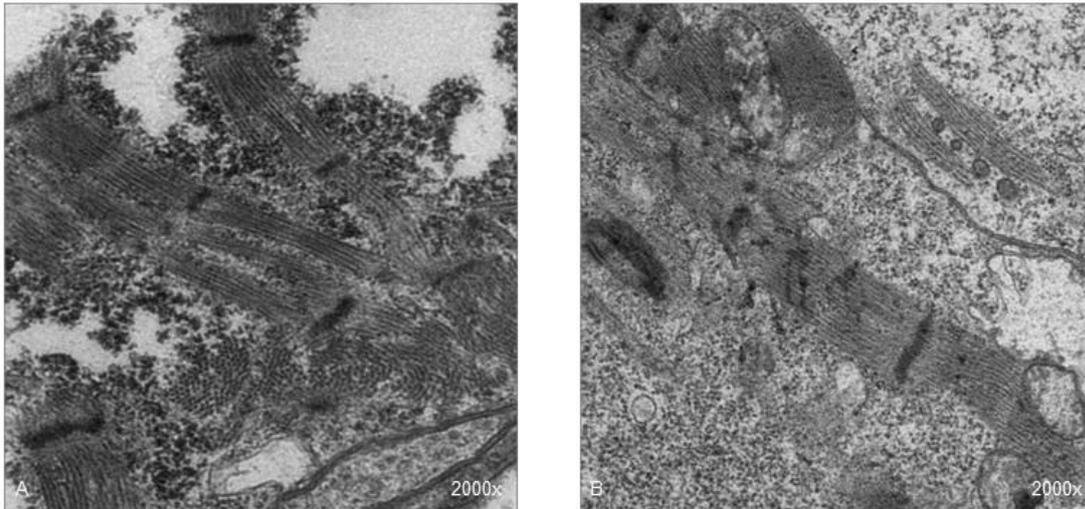


Abb. 10.18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nicht-Laktat-hEHTs. Vergleich von (A) Kontrollen und (B) stimulierten EHTs in der Elektronenmikroskopie. Die EHTs waren zum Zeitpunkt der EM-Anfertigung 25 Tage alt. Sie wurden für 21 Tage dauerhaft stimuliert.

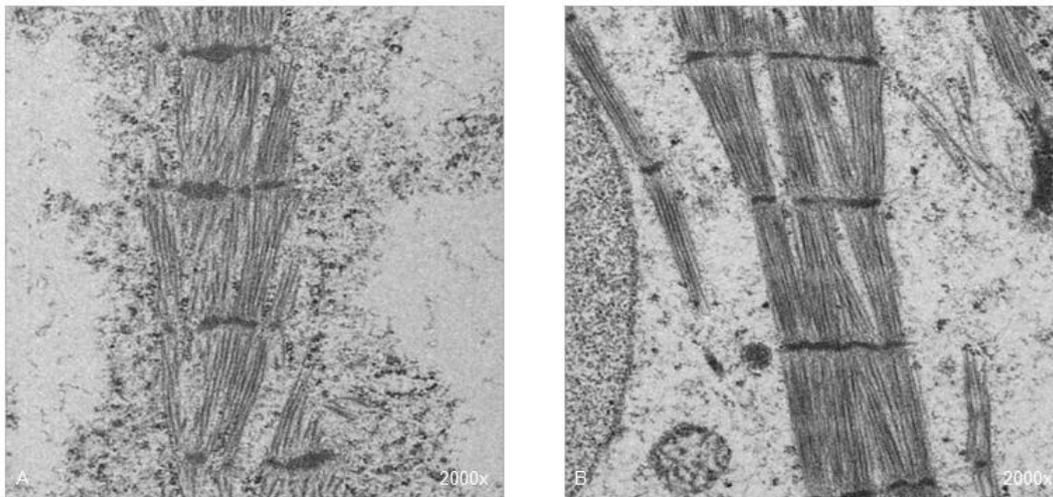


Abb. 10.19: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Nicht-Laktat-hEHTs. Vergleich von (A) Kontrollen und (B) stimulierten EHTs in der Elektronenmikroskopie. Die EHTs waren zum Zeitpunkt der Anfertigung der EM-Präparate 45 Tage alt. Sie wurden für 41 Tage dauerhaft stimuliert.

11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

Datum:

Unterschrift: