

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Th. Eschenhagen

Morphologische und molekulare Analyse eines dreidimensionalen Herzmuskelmodells

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Oliver Rüdiger Boy
aus
Erlangen

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 21.09.2006

Gedruckt mit der Genehmigung der Universität Hamburg am: 05.11.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2006

Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Eschenhagen

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

3. Gutachter: Prof. Dr. U. Schumacher

Einleitung	5
Material und Methoden	14
Konstruktion von Engineered Heart Tissue (EHT)	14
Tierhaltung	14
Organentnahme	14
Enzymatische Zellisolation	14
Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	16
Herstellung und Gehaltsbestimmung von Kollagen Typ I	17
Herstellung von Kulturschalen	18
Herstellung von EHT	18
Kultivierung von EHT	20
Morphologische Analyse der EHT-Entwicklung	20
Hämatoxylin-Eosin Färbung	20
Ultrastrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie	22
Bestimmung der Zellzahl in EHT	23
Analyse der Genkonzentration in EHT	24
RNA-Präparation	24
Reverse Transkription	25
Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	25
Validierung von „ <i>Housekeeping</i> -Genen“	32
DNA-Präparation	35
Proteinpräparation	35
Proteinbestimmung nach Lowry	36
Gelelektrophorese und Western-Blot	37
Statistik	40
Substanzen und Hilfsmittel	41
Substanzen	41
Hilfsmittel	44
Ergebnisse	46
Morphologische Analyse	46
Morphologische Charakterisierung	46
Histologische Charakterisierung	47
Genkonzentrationsanalyse	54
Bestimmung von Zellzahl, DNA, RNA und Protein in EHTs	54
Genkonzentrationsanalyse per qRT-PCR	56
Konzentrationsanalyse ausgewählter Proteine per Western Blot-Verfahren	73
Histomorphologische Veränderungen im EHT-Kulturverlauf	78

Etablierung von Calsequestrin als <i>housekeeping</i> Gen	79
Abnahme des Kardiomyozytenanteils in EHTs im Kulturverlauf	80
Alteration der Konzentration von für sarkomerische Proteine kodierenden Transkripten im EHT Kulturverlauf	81
Alteration von Transkriptkonzentrationen der Regulatoren der kardiomyozytären Kalziumhomöostase	83
Induktion von Apoptose im Rahmen der EHT-Kultur	87
Matrixumbau während der EHT-Kultur	88
Gesteigerte Transkriptkonzentration von Hypoxie-assoziiertem VEGF-A	92
Konzentration von ANF-Transkripten in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung	92
Zusammenfassung	94
Literaturverzeichnis	95
Veröffentlichungen	112
Danksagung	113
Lebenslauf	114
Erklärung	115

Einleitung

Aktuelle Zahlen des Statistischen Bundesamtes Deutschland belegen, dass Krankheiten des Kreislaufsystems nach wie vor die Haupttodesursache in Deutschland darstellen (insgesamt 46,4% aller Todesursachen 2003, Statistisches Bundesamt Deutschland 2005). Darunter nehmen ischämische Herzkrankheiten (ICD-10: I20-I25) mit 19,1% aller Todesursachen und die Herzinsuffizienz (ICD-10: I50) mit 6,9% aller Todesursachen in 2003 die ersten Plätze der Todesursachenstatistik ein. Darüber hinaus beziffert das Statistische Bundesamt für diesen Zeitraum die Anzahl der Personen, die nach einer vollstationären Behandlung mit der Diagnose Herzinsuffizienz entlassen wurden, auf 120 879 männliche (2002: 113 586) und 150 647 weibliche Patienten (2002: 149 421). Das bedeutet einen Anstieg von 6,42% bei den Männern und 0,82% bei den Frauen.

Diese Zahlen zeigen, dass die Prävalenz der Herzinsuffizienz weiter ansteigt, obwohl es in den letzten Jahren Verbesserungen auf dem Gebiet der medikamentösen Therapie als auch der interventionellen und thrombolytischen Therapieverfahren gab. Hierbei konnte insbesondere ein Absinken der Mortalität durch Myokardinfarkt verzeichnet werden (Handling und Vacek 1994, Pocock et al. 1996, Henderson et al. 1998, Kandzari et al. 2004). Somit liegen mögliche Ursachen für ein weiteres Ansteigen der Herzinsuffizienzprävalenz unter anderem gerade in einer verbesserten medizinischen Versorgung. Denn mit der Reduktion der Sterblichkeit im akuten Stadium erleben immer mehr Patienten die Spätstadien ihrer Herzkreislaufkrankung (kongestive Herzinsuffizienz) im Alter. Eine Reihe von Populationsstudien lässt erkennen, dass die Herzinsuffizienzprävalenz mit dem Alter zunimmt. Dieses wird eindrucksvoll durch die Framingham Studie und Framingham „*Offspring*“-Studie belegt (Dawber et al. 1951, Kannel et al. 1979). Bei Beginn der Studie waren 3 von 1.000 unter 63-jährigen Patienten herzinsuffizient. Über einen Beobachtungszeitraum von 34 Jahren stieg die Prävalenzrate in den Altersgruppen von 50 bis 59 auf 8, 60 bis 69 auf 23, 70 bis 79 auf 49 und in der Altersgruppe der über 80-jährigen auf 91/1.000 (McKee et al. 1971, Kannel et al. 1972).

Trotz einer Zunahme der Herzinsuffizienzprävalenz konnte jedoch die Lebenserwartung und Lebensqualität von herzinsuffizienten Patienten durch neue pharmakologische Therapieprinzipien deutlich gesteigert werden (Pitt 1995, Bohm et al. 2003, Janosi et al. 2003, Willenheimer et al. 2004, Gullestad et al. 2005). Pharmakologische Interventionen zielen hier besonders darauf ab, pathologische Umbauvorgänge nach Myokardinfarkt zu hemmen, eine chronisch-mechanische sowie neurohumorale Überladung zu vermindern und so der Entwicklung einer progredienten Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Hierzu werden

heute vor allem β -Adrenozeptorblocker, ACE-Hemmer, AT_1 -Rezeptor-Antagonisten und Aldosteronrezeptorantagonisten verordnet. So konnte die Mortalität in den letzten 50 Jahren weiter gesenkt werden. Die alterskorrigierte 30 Tage, 1-Jahres und 5-Jahres Mortalität der an den Folgen von Herzinsuffizienz verstorbenen Männer sank von 12, 30, 70% im Zeitraum von 1950 bis 1969 auf bemerkenswerte 11, 28, 59% zwischen 1990 und 1999. Gleichfalls reduzierte sich die Mortalität der Frauen von 18, 28, 57% zwischen 1950 und 1969 auf 10, 24, 45% in der Zeit zwischen 1990 und 1999 (Levy et al. 2002). Diese Ergebnisse dürfen jedoch nicht darüber hinwegtäuschen, dass Erkrankungen des Herzkreislaufsystems immer noch weit vor anderen Erkrankungen die Spitzenplätze der Todesursachenstatistik belegen (Statistisches Bundesamt Deutschland 2005). Diesen hohen Zahlen liegt zugrunde, dass der Verlust von Herzmuskelzellen durch etablierte Therapien nicht ausreichend ausgeglichen werden kann. Die Folgen sind eine chronische Überbelastung des Restmyokards, eine Minderperfusion lebenswichtiger Organe und eine Aktivierung neurohumoraler Systeme, was wiederum zu einer weiteren Überlastung des Herzens führt. Während heute der Schutz vor chronischer Überlastung im Zentrum moderner Therapien steht (s. o.), wäre der Ersatz des defekten Myokards durch funktionelles Gewebe im Sinne einer echten Kausaltherapie wünschenswert.

Im Gegensatz zu Fischen und Amphibien (Oberpriller et Oberpriller 1974, Poss et al. 2002) ist das Säugerherz nicht zu einer endogenen Regeneration nach einem Myokarddefekt in der Lage. Eine wesentliche Ursache dafür ist die Teilungsunfähigkeit von Säugerherzmuskelzellen nach der Geburt. Dieses Dogma wird weitestgehend akzeptiert, hat in den letzten Jahren jedoch eine zum Teil kontroverse Diskussion ausgelöst (Beltrami et al. 2001, Pasumarthi et Field 2002). Unabhängig von dieser Kontroverse besteht Konsens darüber, dass selbst bei einem Vorhandensein von endogenen Reparaturmechanismen keine ausreichende Selbstheilung nach myokardialen Schaden stattfindet. Das zentrale Problem der Kardiologie bleibt also der Untergang kontraktile Elemente und damit verbunden ein Verlust von funktioneller Herzmasse.

Bei heutigen Überlebensraten von 87% bzw. 79% im ersten bzw. fünften postoperativen Jahr (Colombo et al. 1998) stellt die Herztransplantation eine sehr erfolgreiche Therapieform der terminalen Herzinsuffizienz dar. Nachteile sind vor allem die lebensnotwendige Immunsuppression, postoperative Infektion und - ganz entscheidend - ein Mangel an Spenderorganen. Dadurch ist die Herztransplantation leider nur wenigen Patienten vorbehalten, und die Mortalität von Patienten auf der Warteliste für eine Herztransplantation bleibt hoch. Eine Alternative ist der Einsatz von mechanischen Links-Herz-Unterstützungssystemen (*LVAD = left ventricular assist device*), die jedoch langfristig dem

Vergleich mit biologischem Gewebe nicht standhalten. Thrombosierungsneigung, Kalziumablagerung sowie mechanisches Versagen sind entscheidende Probleme der heute als Überbrückung (*bridge to transplantation*) verwendeten mechanischen Systeme. Darüber hinaus fehlen diesen Systemen wichtige biologische Eigenschaften zur Anpassung an einen Organismus, der ständigen Umbauprozessen und nicht zuletzt Wachstum unterlegen ist.

Neben den erwähnten medizinischen Problemen bei der Behandlung der Herzinsuffizienz entstehen ebenfalls wesentliche volkswirtschaftliche Schäden. Laut Statistischem Bundesamt führten Kreislauferkrankungen im Jahre 2002 zu 35,5 Mrd. Euro direkten Krankheitskosten. Kein anderes Krankheitsbild bedingt eine größere ökonomische Belastung. Aus medizinischen wie auch ökonomischen Gründen ist daher die Entwicklung neuer innovativer Therapieansätze zur Behandlung chronischer Herzkrankheiten unbedingt erforderlich. Dabei sollten diese nicht nur auf eine Verzögerung der Krankheitsprogression ausgerichtet sein, sondern eine Regeneration von defektem Myokard im Sinne einer kausalen Therapie ermöglichen.

Verheißungsvolle aber bisher nur experimentelle Therapiekonzepte sind in den letzten 10 Jahren insbesondere auf dem Gebiet der Zellimplantation entwickelt worden. Erste Ansätze zur Wiederherstellung von Herzmuskelgewebe basierten auf der Injektion isolierter Zellen unterschiedlicher Herkunft (Reinlib und Field 2000). Neben nativen und transgen modifizierten Kardiomyozyten (Koh et al. 1993, Soonpaa et al. 1994, Scorsin et al. 1996, Li et al. 1999, Matsushita et al. 1999, Reinecke et al. 1999) sind bereits Skelettmuskelzellen (Marelli et al. 1992, Taylor et al. 1998, Kessler und Byrne 1999), glatte Muskelzellen (Li et al. 1999), Fibroblasten (Hutcheson et al. 2000), embryonale Stammzellen (Klug et al. 1996), Knochenmark-Stromazellen (Wang et al. 2000) sowie Knochenmark- und Blutstammzellen (Orlic et al. 2001, Assmus et al. 2002, Strauer et al. 2002) implantiert worden. Die umfassendsten Untersuchungen zur Zellimplantation, inklusive klinischer Studien, sind mit skelettalen Myoblasten und Knochenmark- bzw. Blutstammzellen durchgeführt worden (Menasche et al. 2001, Assmus et al. 2002, Strauer et al. 2002, Kang et al. 2004). Ein Vorteil dieser Zellspezies ist, dass sie bei einer klinischen Anwendung auch autolog gewonnen und theoretisch ohne begleitende Immunsuppression implantiert werden können.

In ersten tierexperimentellen Studien an Hunden wurden autologe Myoblasten in einem vorgeschädigten Myokard implantiert, welche dort neues Gewebe bildeten, das Ähnlichkeiten mit Herzgewebe aufwies (Chiu et al. 1995). Versuche an Tieren konnten bis heute mehrfach reproduziert werden, vereinzelt wurde sogar eine Besserung der Herzfunktion beschrieben (Taylor et al 1998, Atkins 1999, Rajnoch 2001). Aktuelle Veröffentlichungen lassen jedoch

Zweifel aufkommen, ob eine Transdifferenzierung in Kardiomyozyten bzw. eine elektrische Kopplung implantierter Myoblasten *in vivo* überhaupt stattfindet (Reinecke et al. 2002, Menasche 2003). Dennoch werden zurzeit erste groß angelegte Patientenstudien durchgeführt (Menasche et al. 2001, MAGIC-Studie: *Myoblast Autologous Graft in Ischemic Cardiomyopathy*, multizentrische Studie an mehr als 12 Zentren in Europa und Nordamerika mit mehr als 300 Patienten). Die Tatsache, dass bei einer kleineren Studie bei vier von zehn Patienten lebensbedrohliche Arrhythmien aufgetreten sind (Menasche 2002), führte dazu, dass alle Patienten, die zurzeit an der MAGIC-Studie teilnehmen, einen Defibrillator implantiert bekamen. Bei der Implantation von Knochenmark- und Blutstammzellen per intramyokardialer Injektion oder intrakoronarer Perfusion in Patienten wurden dagegen bisher keine Rhythmusstörungen beobachtet (Assmuss et al. 2002, Strauer et al. 2002, Stamm et al. 2004). Tatsächlich verbesserte sich bei einzelnen Patienten nach Zellimplantation scheinbar die Herzfunktion. Ob diese Funktionsverbesserungen Einzelfälle bleiben oder Effekte mit einer klinischen Relevanz darstellen, bleibt noch zu klären.

Im Gegensatz zur Implantation von Stamm- oder Vorläuferzellen hätte die direkte Anwendung von Kardiomyozyten den Vorteil, dass diese Zellen bereits einen kardialen Phänotyp aufweisen. Koh et al. zeigten erstmalig, dass sich in infarktgeschädigtem Gewebe transgener Mäuse injizierte fetale Kardiomyozyten zu einem stabilen Gewebeverband organisieren (Koh et al. 1993). Anzeichen für Arrhythmien oder Transplantatabstoßung wurden nicht beobachtet. In späteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung von Narbengewebe sowie die Ausbildung einer Herzinsuffizienz nach Infarkt durch die Implantation fetaler Kardiomyozyten gemindert werden können (Etzion et al. 2001, Chachques et al. 2002, Gao et al. 2003). Da primäre Herzzellen für eine klinische Anwendung nicht zur Verfügung stehen, wäre die Verwendung von aus Stammzellen gewonnenen Herzmuskelzellen eine interessante Alternative.

Es ist unumstritten, dass sich aus embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eine Vielzahl differenzierter Zellentypen, wie auch Herzzellen, entwickeln können (Wobus et al. 1991, Doetschman et al. 1993, Maltsev et al. 1993, Kehat et al. 2001). Ein wichtiger Vorteil von aus ES-Zellen gewonnenen Herzmuskelzellen ist deren theoretisch unbegrenzte Verfügbarkeit. Dem stehen drei wesentliche Nachteile gegenüber: (1) Die Gewinnung von humanen ES-Zellen ist ethisch umstritten, da sie mit der Zerstörung von Embryonen verbunden ist. (2) ES-Zellen verfügen über ein teratogenes Potential. (3) ES-Zellen sind grundsätzlich allogene. Gegenüber ES-Zellen haben adulte Stammzellen den Vorteil, dass sie, wie bereits oben erwähnt, autolog verwendet werden könnten. Auch aus ethischer Sicht wäre der Einsatz adulter Stammzellen besser vermittelbar. Nach ersten Untersuchungen, die von einer

kardialen Transdifferenzierung adulter Knochenmarkstammzellen berichteten (Orlic et al. 2001), werden in aktuellen Publikationen Zweifel an der Transdifferenzierungskapazität von Knochenmarkstammzellen geäußert (Balsam et al. 2004, Murry et al. 2004, Nygren et al. 2004).

Im Gegensatz zur Zellimplantation durch Injektion oder Infusion unterschiedlicher Zellsuspensionen in infarktgeschädigtes Gewebe verfolgt die Gewebeersatztherapie mit *in vitro* hergestellten Herzmuskeläquivalenten einen prinzipiell anderen Ansatz. Hier werden gezielt komplexe Gewebekonstrukte mit strukturellen und funktionellen Eigenschaften von nativem Myokard *in vitro* hergestellt, um diese schließlich als gleichwertigen Gewebeersatz *in vivo* zu implantieren. Für eine *in vivo* Anwendung zur kardialen Regeneration sollten Gewebekonstrukte folgende Anforderungen erfüllen: (1) Sie müssen biokompatibel sein, damit Transplantatabstoßungen verhindert und lebenslange Immunsuppression vermieden werden können. (2) Nach der Implantation sollten sie mit dem nativen Gewebe mitwachsen können. (3) Eine „nahtlose“ strukturelle wie auch funktionelle Integration in das Empfängermyokard muss möglich sein. (4) Das Gewebe muss vaskularisiert sein oder nach Implantation möglichst schnell vaskularisiert werden. (5) Eine einfache Handhabung wäre hilfreich, damit diese Gewebe schnell, individuell angepasst und in ausreichender Menge produziert und implantiert werden können. Bis heute wurden unterschiedliche Methoden zur Konstruktion von künstlichem Herzgewebe entwickelt: (1) Zellansiedelung auf festen, vorgeformten Matrizes, (2) Konstruktion von *Engineered Heart Tissue* (EHT) aus zunächst flüssigen Herzzell-Matrix-Mischungen, (3) Stapelung von Herzmuskelzelleinzelschichten unter gänzlichem Verzicht auf eine exogene Matrix (Abb. 1).

Das klassische Konzept der Gewebeersatztherapie befasst sich mit der Zellansiedelung auf vorgeformter Matrix (Langer und Vacanti 1993). Theoretisch denkbar wäre hierbei eine freie Gestaltung der Gewebe in Form und Größe bis hin zur Konstruktion komplexer Strukturen und im Idealfall ganzer Organe. Fortschritte konnten hier vor allem auf Gebieten des Gewebeersatzes von Knorpel, Knochen, Leber, Darm und urologischen Geweben gemacht werden (Vacanti et al. 1998). In der kardiovaskulären Gewebeersatztherapie wurden in jüngster Zeit insbesondere in den Bereichen Klappenersatz und Gefäßersatz Erfolge erzielt, die zu einer baldigen klinischen Erprobung des kardialen *Tissue Engineering* Konzeptes führen könnten (Hoerstrup et al. 2000, Sodian et al. 2000, Steinhoff et al. 2000, Teebken et al. 2002). Das klassische *Tissue Engineering* Konzept (Besiedlung von vorgeformten Matrizes) wurde von unterschiedlichen Gruppen auch zur Herstellung von künstlichem Herzgewebe verwendet (Carrier et al. 1999, Li et al. 1999, Leor et al. 2000, Kofidis et al. 2002).

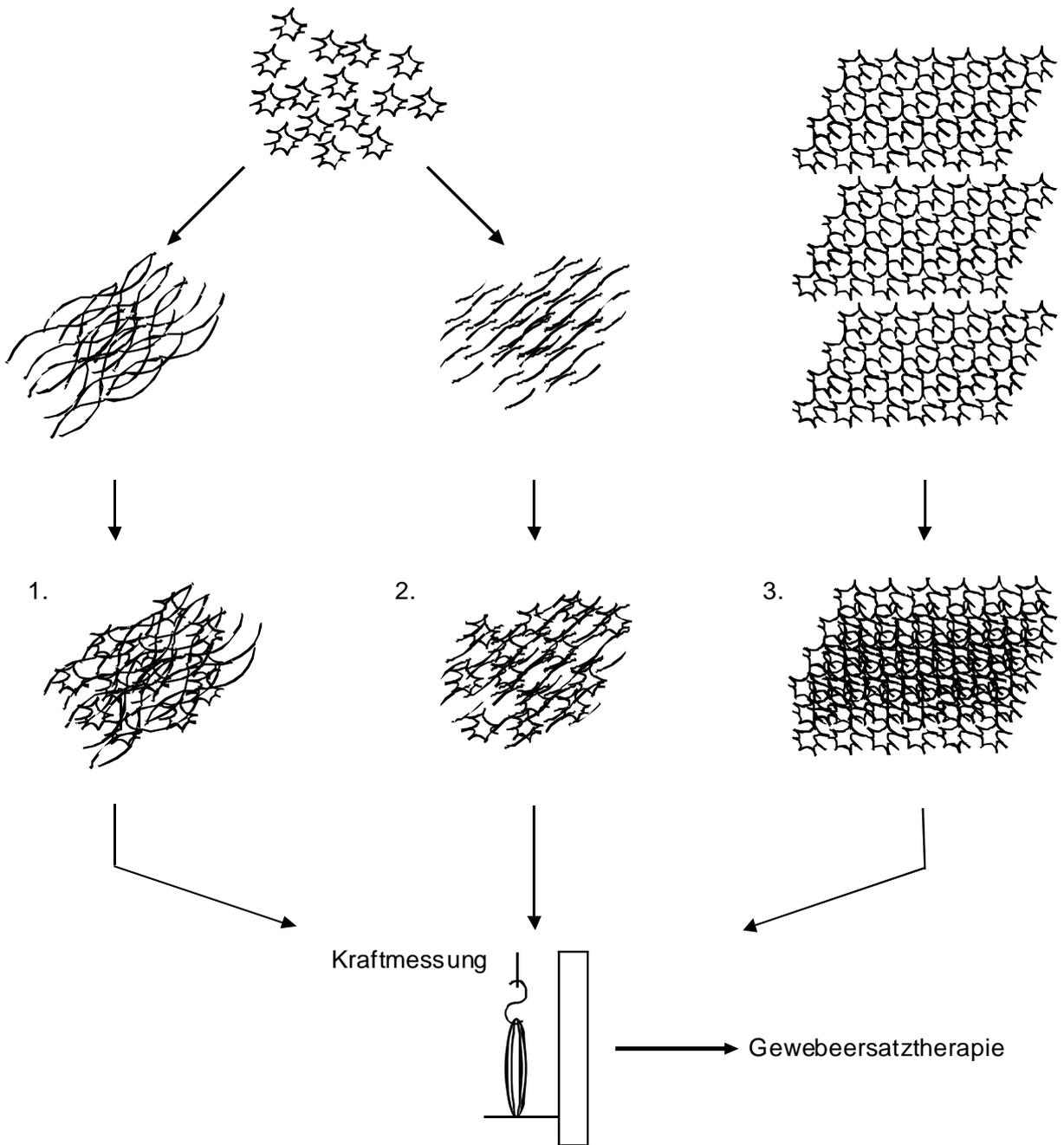


Abbildung 1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Strategien zur Konstruktion von künstlichem Herzgewebe: (1) Besiedelung vorgeformter, fester Matrices mit Kardiomyozyten. (2) Mischung gelöster Matrixbestandteile mit isolierten Herzmuskelzellen und Förderung einer spontanen kardialen Organisation. (3) Stapelung mehrerer Einzelzellschichten aus Kardiomyozyten.

Hier wurden vorgeformte Matrizes aus Kollagen, Alginaten und Polyglykolsäure zur Besiedelung mit Herzzellen von embryonalen Hühnchen und neonatalen Ratten verwendet. Wesentliche Nachteile dieser Technologien waren jedoch die nur unbefriedigende Ausbildung eines differenzierten, dreidimensionalen Herzmuskelgeflechts sowie die Entwicklung von nur geringen Kontraktionskräften. Neue Befunde zeigen jedoch, dass auch mit dem klassischen *Tissue Engineering* Konzept unter gleichzeitiger Anwendung von Matrigel und elektrischer Stimulation zumindest morphologisch hoch differenzierte kardiale Gewebekonstrukte hergestellt werden können (Radisic et al. 2004).

Grundlegende Probleme bei der Verwendung von vorgeformten Matrizes zur Herstellung von künstlichem Herzgewebe sind (1) die endogene Steifigkeit der verwendeten Matrizes und (2) eine Einschränkung der Sauerstoffdiffusion in kompakten Matrixstrukturen. Herzmuskelgewebe erfordern zur dynamischen Kraftausbildung ein hohes Maß an Flexibilität bei gleichzeitig großer Stabilität. Eine starre Matrix als Gewebegerüst behindert möglicherweise eine Ausbildung von kontraktilem Muskelgewebe. Zusätzlich stellen Matrizes eine Diffusionsbarriere dar, die zu einer Hypoxieentwicklung in dicken Gewebekonstrukten führen könnte. Diese Nachteile werden durch eine von Shimizu et al. entwickelte Technik umgangen, bei der einzelne Herzmuskelzellschichten gestapelt werden (Shimizu et al. 2002). Diese Zellstapel bilden nach subkutaner Implantation in Ratten einen dünnen Zellfilm bestehend aus maximal 4 Zellschichten. Bereits nach 3 Wochen können elektrische Ströme, generiert vom transplantierten Gewebe, über Elektroden auf der Hautoberfläche des Tieres gemessen werden (Shimizu et al. 2002). Mit bloßem Auge lassen sich gleichförmige Spontankontraktionen erkennen, wobei der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von Connexin 43 auf Interzellularkontakte schließen lässt, die für die Fortleitung elektrischer Ströme von großer Bedeutung sein dürften. Ein Vorteil dieser Methode ist die theoretische Möglichkeit einer Stapelung unterschiedlicher Zellspezies, um komplexe künstliche Herzgewebe mit physiologischen Zellanteilen herzustellen (Zak et al. 1974). So könnten zum Beispiel Endothelzellen zur Generierung von Gefäßen, und Fibroblasten für die Ausbildung einer endogenen Matrix verwendet werden.

Eine alternative Methode des kardialen *Tissue Engineering* wurde durch Mischen von Herzzellen embryonaler Hühnchen und neonataler Ratten mit Matrixproteinen (v. a. Kollagen) entwickelt (*Engineered Heart Tissue*, EHT; Eschenhagen et al. 1997, Zimmermann et al. 2000). Für eine *in vivo* Anwendung von EHTs als potentieller Gewebeersatz sprechen folgende Eigenschaften: (1) EHTs zeigen strukturelle und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard. (2) Die Methode der EHT-Herstellung ist einfach und gut reproduzierbar, so dass große Stückzahlen schnell produziert werden können. (3) Durch Variationen von

EHT-Größe und -Form können Ersatzgewebe je nach Anforderung hergestellt werden. (4) Die Qualität von EHTs in Bezug auf ihre kontraktile Fähigkeiten lässt sich vor einer Implantation im einfachen Kontraktionsexperiment erfassen. Tatsächlich konnte in ersten Implantationsstudien bereits gezeigt werden, dass EHTs *in vivo* mindestens 8 Wochen überleben, darüber hinaus weiter differenzieren, vaskularisiert und innerviert werden sowie ihre kontraktile Funktion beibehalten (Abb. 2 A; Zimmermann et al. 2002a, Didié 2005).

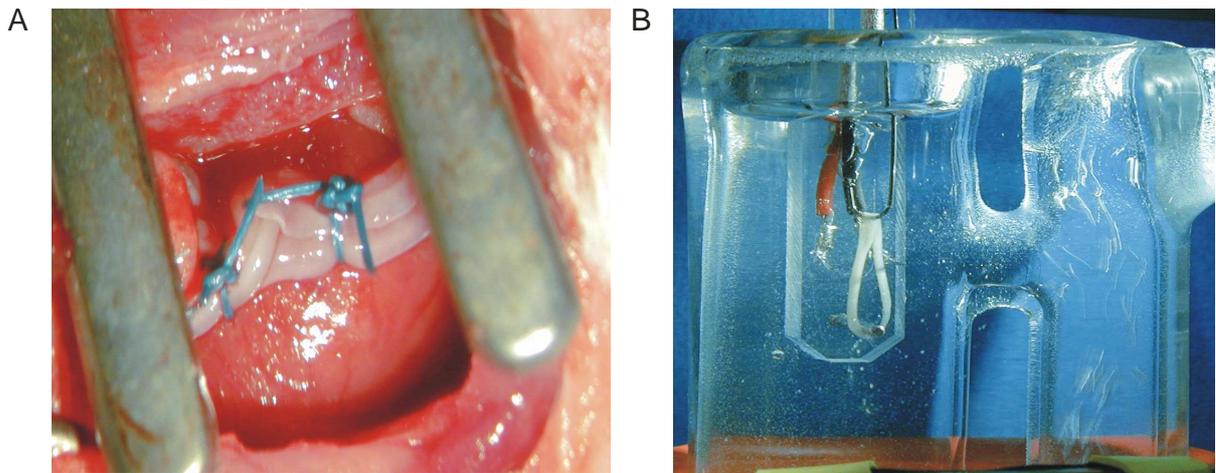


Abbildung 2: In *in vivo* und *in vitro* Anwendungsmöglichkeiten von *Engineered Heart Tissue*. Die Beispiele zeigen exemplarisch implantierte EHTs auf dem Herzen einer Wistar-Ratte (A) und im Organbad auf einer Apparatur zur Kontraktionskraftmessung unter isometrischen Bedingungen (B).

Neben einer Anwendung als Gewebeersatz *in vivo* dienen EHTs als pharmakologisches Herzmodell *in vitro* (Abb. 2 B; Zimmermann et al. 2002b). Durch die dreidimensionale Beschaffenheit der EHTs ist es möglich, direkte Messungen diverser Kontraktionsparameter (Kontraktionskraft, -kinetik, -frequenz, Grundspannung) unter standardisierten Bedingungen in Anlehnung an klassische Papillarmuskelmodelle durchzuführen (Zimmermann et al. 2000). Darüber hinaus bieten EHTs die Möglichkeit, durch adenoviralen Gentransfer ausgewählte Proteine gezielt zu überexprimieren, und somit deren Rolle für die Herzmuskelfunktion zu untersuchen (El-Armouche et al. 2003, Remppis et al. 2004).

Während die kontraktile Funktion und Struktur von EHTs nach einer Konstruktions- und Kulturphase von 12-14 Tagen bereits gut untersucht ist (Zimmermann et al. 2000, Zimmermann et al. 2002), ist wenig über den Verlauf der tatsächlichen Entwicklung von EHTs aus isolierten Zellen zu einem 3D Herzmuskelmodell bekannt. Gerade für die *in vitro* Anwendung als Herzmuskelmodell ist es allerdings essentiell, ein besseres Verständnis der EHT-Entwicklung auch im Vergleich zur Entwicklung von nativem Gewebe zu erlangen.

Im Einzelnen sollte diese Promotionsarbeit zur Klärung folgender Fragen beitragen:

1. Zeigt die Entwicklung von EHTs Parallelen zur physiologischen Herzmuskelentwicklung?
2. Ist die mRNA-Konzentration von sarkomerischen Proteinen in EHTs und nativem Gewebe vergleichbar?
3. Ist die mRNA-Konzentration von Regulatoren der Kalziumhomöostase in EHTs und nativem Gewebe vergleichbar?
4. Kommt es im Rahmen der massiven Umbauvorgänge während der EHT-Entwicklung zu einer veränderten mRNA-Konzentration von Apoptose- und Matrix-modulierender Proteine?
5. Kommt es im Verlauf der EHT-Entwicklung zur Induktion Hypoxie-assoziiierter Proteine?
6. Gibt es Anzeichen einer physiologischen bzw. pathologischen Hypertrophie während der EHT-Entwicklung?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden morphologische sowie molekulare Charakteristika von frisch isolierten Herzzellen neonataler Ratten, EHTs der Kulturstage 3, 7 und 12 sowie Herzgewebe fetaler, neonataler und adulter Ratten verglichen.

Material und Methoden

Konstruktion von Engineered Heart Tissue (EHT)

Tierhaltung

Männliche und weibliche Wistar-Ratten aus der Eigenzucht des Instituts für Pharmakologie der Universität Erlangen-Nürnberg wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Altromin®) und Leitungswasser *ad libitum* gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden fetale (18. Tag post partum (E18)), neonatale (1.-3. Tag postnatal) und adulte (300 g) Wistar-Ratten verwendet.

Organentnahme

Die Tiere wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in gekühlte kalzium- und bikarbonatfreie *Hanks-Balanced-Salt-Solution* mit HEPES (CBFHH) transferiert. Nach Abtrennung der Vorhöfe und Gefäße wurden die Ventrikel in CBFHH gespült und schließlich in flüssigem Stickstoff (-198 °C) schockgefroren oder einem enzymatischen Gewebeaufschluss zur Isolation von Einzelzellen zugeführt. Eine Genehmigung zur Organentnahme (gemäß § 4 Tierschutzgesetz) durch die Regierung von Mittelfranken lag vor (# TS-09/00, # TS-20/00, # TS -6/03).

CBFHH: 136,9 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,81 mM MgSO₄ (H₂O)₇, 5,55 mM Dextrose, 0,44 mM KH₂PO₄, 0,34 mM Na₂HPO₄ (H₂O)₇, 20 mM HEPES (2-Hydroxyethyl)piperazin-N-(2-ethansulfonsäure)) in destilliertem, deionisiertem und pyrogenfreiem Wasser (*Aqua ad iniectabilia*), pH 7,5 wurde mit NaOH eingestellt. CBFHH wurde steril filtriert und bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Enzymatische Zellisolation

Der enzymatische Gewebeverdau und die anschließende Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen. Zur Antibiose wurden Penicillin G und Streptomycin (P/S; 100 U/ml und 100 µg/ml) eingesetzt. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren,

Pinzetten) und das später verwendete Zellsieb wurden ebenfalls vor jeder Präparation autoklaviert.

Die Ventrikel neonataler Ratten wurden in eine neue Kulturschale mit CBFHH transferiert und in der Mitte zweigeteilt. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere auf eine maximale Größe von 1 mm^3 zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß, in dem nach weiterem dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin nach einer modifizierten Methode von Webster et al. durchgeführt wurde (Webster et al. 1993). Die Anzahl der Herzen pro Verdau schwankte zwischen 20 und 140, wobei zwei parallele Ansätze ab 90 Herzen durchgeführt wurden. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 10 ml (bei 60-70 Herzen) Trypsin/DNase-Arbeitslösung versetzt und für 10 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15° ; 60 Kippbewegungen/min) inkubiert. Der trübe Überstand dieses Vorverdaus wurde anschließend verworfen. Nach Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin/DNase-Arbeitslösung und einer erneuten Inkubation für 10 min unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml Sammelgefäß mit 2 ml durch Erhitzung inaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung des Trypsins überführt. Nach Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (9 ml) und Triturierung (Auf- und Abpipettieren, weitlumige Pipette, 25-30x) wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Die Zeiten der weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung wurden dem Maß der Trübung angepasst, wobei eine maximale Zeit von 5 min nicht überschritten wurde. Dieser Wechsel von Protein/DNA-Verdau und reinem DNA-Verdau wurde unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin/DNase-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung) jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes durchgeführt. Der komplette Verdau der Gewebestücke dauerte bei 60-70 Herzen im Mittel 4 Stunden, wobei durchschnittlich 7 Sammelgefäße gefüllt wurden. Gefüllte Sammelgefäße wurden in der Zwischenzeit auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Sammelgefäße in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnehmen des klaren Überstandes wurden die pelletierten Zellen in den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen und anschließend in einem einzigen Sammelgefäß (50 ml) zusammengeführt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml NKM gespült. Diese Volumina wurden ebenfalls in das Sammelgefäß gegeben. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (0,7% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert. Es wurde erneut trituriert und wiederum zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 32 ml NKM aufgenommen. Die

Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (Maschengröße: 250 µm) gegeben, das Sammelgefäß und Sieb mit 10 ml NKM gespült. Nach Färbung mit Trypanblau (250 µl Trypanblau, 150 µl PBS, 100 µl Zellsuspension, 10 min Inkubationszeit, Raumtemperatur) wurde die Zahl der vitalen, in diesem Fall nicht gefärbten Zellen, in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Daraufhin wurde die Zellkonzentration auf $6,4 \times 10^6$ /ml Kulturmedium eingestellt. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt gelagert.

Fetales Kälberserum (FKS), inaktiv: FKS wurde 1 Std. im Wasserbad bei mehrmaligem Umschwenken auf 56 °C erhitzt.

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

Trypsin/DNase-Arbeitslösung: 1,5 ml Trypsin-Stammlösung, 0,7 ml DNase-Stammlösung, 0,5 ml P/S, ad 50 ml mit CBFHH (auf Eis lagern).

DNase-Stammlösung (71x): 100 mg DNase in 50 ml PBS ansetzen. Durch 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei -20 °C lagern.

DNase-Arbeitslösung: 1 ml FKS (inaktiviert), 0,7 ml DNase-Stammlösung, 0,5 ml P/S, ad 50 ml mit CBFHH (auf Eis lagern).

Phosphat-gepufferte Lösung (PBS): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 (\text{H}_2\text{O})_7$, 0,2 g KH_2PO_4 , ad 1000 ml mit H_2O , pH 7,4

NKM: Dulbeccos Minimal Essential Medium (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO_3 ; DMEM), 10% FKS (inaktiviert), 100 U/ml Penicillin (P), 100 µg/ml Streptomycin (S), 2 mM L-Glutamin

Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

120 angebrütete Eier (7.-9. Bruttag, Landesversuchsanstalt für Kleintierzucht, Kitzingen) wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Schalen wurden am flachen runden Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und die Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen. Nach Dekapitation wurden Köpfe und Körper in zwei 500 ml Flaschen mit je 150 ml eisgekühltem CBFHH + 4% P/S (400 U/ml Penicillin / 400 µg/ml Streptomycin) gesammelt. Nach Verteilung der Embryonen auf insgesamt 4 Zellkulturflaschen (150 ml) wurden diese

homogenisiert (Polytron-Homogenisator: 6 x 15 Sek. bei Stufe 11) und anschließend zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Die Überstände wurden abgenommen und gesammelt, die Pellets in zwei 150 ml Sammelgefäßen vereinigt, mit CBFHH auf je 150 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert (6 x 15 Sek. bei Stufe 11 und 3 x 5 Sek. bei Stufe 20). Nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4 °C) und dem Sammeln aller Überstände wurde der Hühnerembryonenextrakt zur weiteren Verwendung in 14 ml Aliquots bei -20 °C bis gelagert. Eine Präparation mit 120 angebrüteten Eiern ergab durchschnittlich 360-460 ml Hühnerembryonenextrakt.

Herstellung und Gehaltsbestimmung von Kollagen Typ I

Sechs Schwänze ausgewachsener Wistar-Ratten wurden von den Kadavern abgetrennt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor der Kollagenpräparation wurden die Rattenschwänze aufgetaut und mit Ethanol (70% in H₂O) desinfiziert. Die Durchführung der gesamten Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Inzision in der Längsachse des Schwanzes wurde die Haut mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette entfernt. Danach konnten die bindegewebigen, Kollagen Typ I-Fasern enthaltenden Sehnenstränge, die auf den Wirbelknochen aufliegen, an der Schwanzbasis beginnend mit einer Pinzette abgezogen werden. Diese wurden anschließend in eine Schale mit „Earle's based salt solution“ (EBSS) überführt und dort zweimal mit EBSS gewaschen. Nach Überführung der kollagenhaltigen Sehnenfäden in ein 500 ml Glasgefäß erfolgte die Zugabe von 300 ml Essigsäure (0,1% in H₂O). Bei 4 °C wurden die Sehnenfäden über mehrere Tage bis zur fast vollständigen Auflösung gerührt und anschließend in Zentrifugengefäße überführt. Nach einer Zentrifugation (20.000 g, 2 Std., 4 °C) zur Abtrennung von nicht gelösten Geweberesten wurde der Überstand gesammelt. Durch eine langsame Zugabe eisgekühlter NaCl-Lösung (25%) wurde die Salzkonzentration in der Suspension unter ständigem Rühren auf etwa 4% angehoben und damit das Kollagen ausgefällt. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Suspension erneut zentrifugiert (20.000 g, 30 min, 4 °C). Die Überstände wurden anschließend verworfen und die Pellets in jeweils 250 ml kalter Essigsäure (0,1% in H₂O) aufgenommen. Die Lösung der Pellets erfolgte durch Rühren über Nacht bei 4 °C. Durch zweimalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1% in H₂O) wurde der NaCl-Gehalt in der Kollagensuspension auf unter 0,2% reduziert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Lösen des Kollagens in 0,003% SDS bei 95 °C und anschließender photometrischer Bestimmung nach der Methode von Bradford (1976).

Herstellung von Kulturschalen

In autoklavierbare Kulturschalen (\varnothing 6 cm, Glas) wurden je zwei Silikondochte (\varnothing 2 mm, etwa 80% der Schalenhöhe) eingeklebt. Anschließend wurden Teflonscheiben (\varnothing 16 mm) über diese Dochte gestülpt und die Schalen bis zu 1/3 ihrer Höhe mit Silikon ausgegossen. Nach Aushärten des Silikons wurden die Teflonscheiben entfernt. Vor der Verwendung als Gussform wurden Zylinder aus Teflon (\varnothing 8 mm) auf die Dochte aufgebracht, so dass zwei ringförmige Mulden (Innendurchmesser 8 mm, Außendurchmesser 16 mm) mit einem Fassungsvermögen von $\sim 750 \mu\text{l}$ entstanden. Die Kulturschalen wurden schließlich vor Benutzung intensiv ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert. Abbildung (3 A) zeigt die schematische Darstellung einer Kulturschale.

Herstellung von EHT

Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt. Zur EHT-Herstellung wurde Kollagen Typ I vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem EHT-Medium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemischs wurde mit NaOH (0,1 N) neutralisiert. Die Zugabe von Exsudat des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors der Maus (extrazelluläre Matrix) erfolgte im Anschluss noch vor der Vermengung mit der Zellsuspension. Nach wiederholtem Triturieren des Kollagen-Zell-Gemischs wurden je $900 \mu\text{l}$ zügig in die Gussformen pipettiert (Abb. 3 B). Trotz des geringeren Fassungsvermögens der Gussformen ($\sim 750 \mu\text{l}$) konnte der Volumenüberschuss ($150 \mu\text{l}$) durch die hohe Viskosität des Kollagen-Zell-Gemischs auf die ausgegossene Gussform aufgeschichtet werden. Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert, um eine leichte Aushärtung des Kollagen-Zell-Gemischs zu erreichen, und nachfolgend vorsichtig mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2 EHTs) überschichtet.

10x DMEM: 13,3 mg DMEM Pulver (100x) in 10 ml H_2O lösen und vor Gebrauch durch $0,2 \mu\text{m}$ Filter steril filtrieren. Bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ lagern.

Konzentriertes (2x) EHT-Medium: 1 ml 10x DMEM, 1 ml Pferdeserum (inaktiviert; 20%), 0,2 ml Hühnerembryonenextrakt (4%), 0,1 ml P/S (200 U/ml bzw. $200 \mu\text{g/ml}$), ad 5 ml mit H_2O . Vor Herstellung der EHTs frisch herstellen.

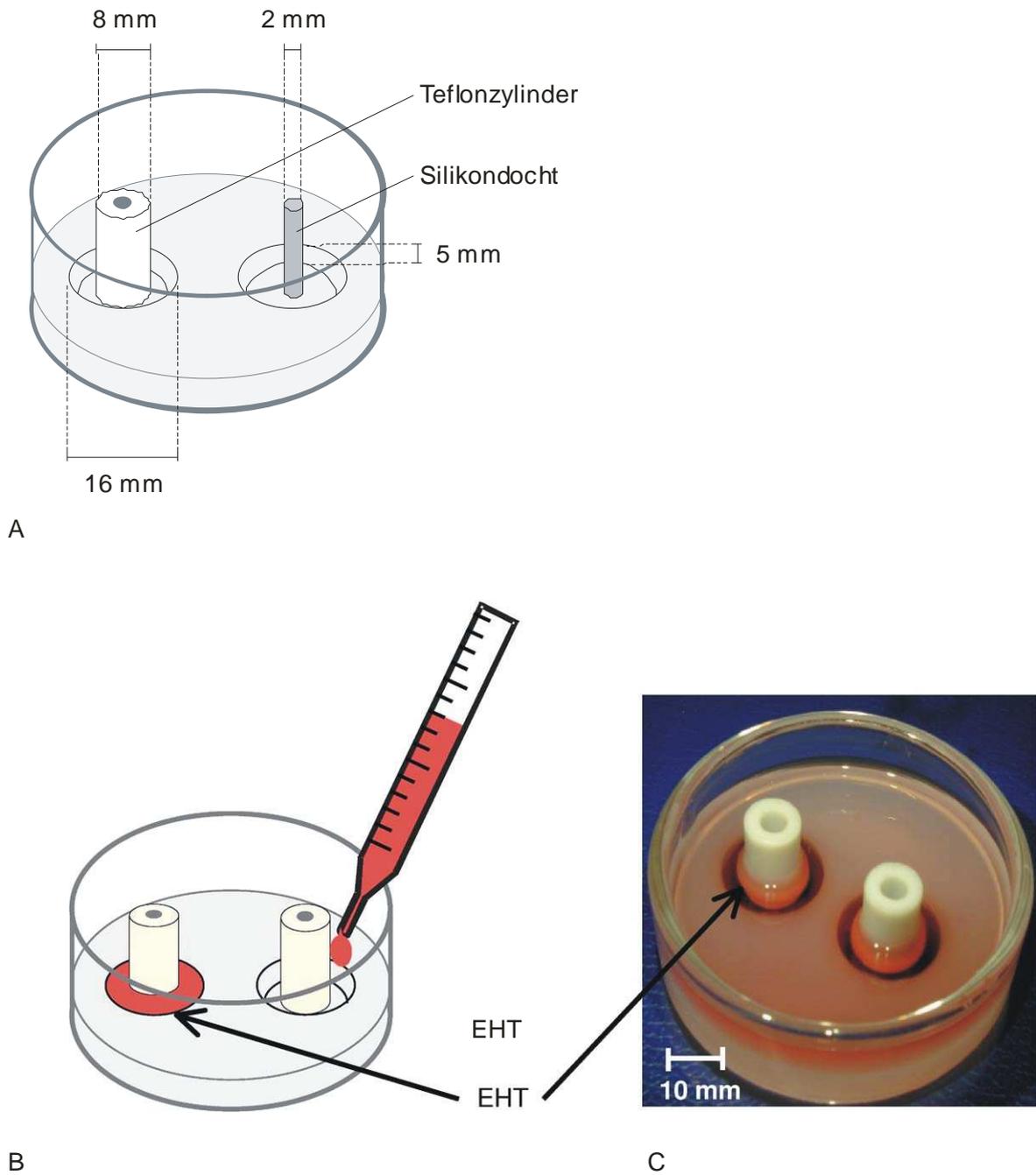


Abbildung 3: Schematische Darstellungen einer Kulturschale (A) und des Gießens der flüssigen Rekonstitutionsmischung zur Herstellung von EHT (B). Das Foto zeigt die Gussform mit 2 EHTs am 7. Kulturtag.

2). Die mikroskopische Darstellung erfolgte in 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung. Dabei wurden die Schnitte fotografisch festgehalten.

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

Tabelle 1: Protokoll der Paraffineinbettung

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

Tabelle 2: Protokoll der HE-Färbung

Hämalaunlösung nach Meyer: 1 g Hämatoxylin in 1 l H₂O lösen, darauf Zugabe von 0,2 g Natriumjodat und 50 g Kaliumaluminiumsulfat und Lösung unter mehrmaligem Schütteln. Zugabe von 50 g Chloralhydrat und 1 g kristalliner Zitronensäure (Farbumschlag von blauviolett zu rotviolett). Haltbarkeit: 1-2 Jahre. Vor Gebrauch durch Faltenfilter filtrieren.

Eosinlösung (0,1%): 0,5 g Eosin G auf 500 ml H₂O

Ultrastrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie

EHTs und frisch isolierte Zellen wurden mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS mit 1 mmol/l Kalziumchlorid und 30 mmol/l 2,3-Butandione-Monoxime (BDM) über Nacht bei 4 °C fixiert.

Um die Zelldichte für die Analyse von Einzelzellen in TEM-Präparaten zu erhöhen, wurden die Einzelzellsuspensionen direkt nach der Fixierung in Agarose eingegossen. Dafür wurde 2% Agaroselösung in 0,9% NaCl unter gelegentlichem Umrühren auf 50 °C erhitzt und in ein Zentrifugengefäß (1,5 ml) überführt. Parallel hierzu wurden die Herzzellen herunterzentrifugiert (15 min, 4 °C, 60 g) und nach Entfernen des Überstandes vorsichtig mit einer Pipette (max. 100 µl) unter die Agaroselösung pipettiert. Darauf wurde das Reaktionsgefäß in ein mit angewärmtem Wasser (45 °C) gefülltes Reagenzglas (50 ml) gesteckt. Durch Zentrifugation (10 min, 60 g, RT) wurden die in dem jetzt gelierenden Agarose eingeschlossenen Zellen in der Gefäßspitze konzentriert. Nach einer Aushärtungszeit von mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur wurde die Spitze des Reaktionsgefäßes abgetrennt, und die Agaroseblöcke für eine Einbettung in Epon zugeschnitten.

Fixierte EHTs und Herzzellen in Agaroseblöcken wurden in 0,1 M Phosphat Puffer (PB) über Nacht bei 4 °C gespült und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur in gleichen Teilen Osmiumtetroxyd (2% in PB; Endkonzentration: 1%) und Kaliumferricyanid (3% in PB; Endkonzentration: 1,5%) postfixiert. Nach erneutem Waschen in PB über Nacht bei 4 °C wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Epon eingebettet (Tab. 3). Mit einem Ultramikrotom wurden 50 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt und auf Kupfernetze (Maschengrids) aufgezogen. Schließlich wurden die Präparate 20 min mit Uranylacetat sowie nach dem Spülen mit H₂O für 10 min in Bleicitrat kontrastiert. Nach erneutem Spülen mit H₂O konnten die Präparate per Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert werden.

0,1 M PB: 10,9 g Na₂HPO₄, 3,2 g NaH₂PO₄, ad 1 l mit H₂O, pH 7,4

Epongemisch: Lösung 1: 200 µl Glycidether 100, 320 µl 2-Dodecenylnorbornene-2,3-dicarbonsäure-anhydrid (DBA),
Lösung 2: 320 µl Glycidether 100, 280 µl 1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäurehydrid (MNA),
Zusammenführen von Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1

Uranylacetat: 1 g Uranylacetat, 6 ml H₂O, 4 ml Ethanol 100%, filtrieren (Sterilfilter);
Aufbewahrung bei 4 °C, dunkel

Bleicitrat:

1,4 g Bleicitrat-III-hydrat, 40 ml heißes H₂O (~60 °C), 8 ml 1 M NaOH schrittweise hinzufügen bis Bleicitrat-III-hydrat gelöst ist, ad 50 ml mit H₂O.

1.	70% Ethanol	1 Std.	Raumtemperatur
2.	80% Ethanol	30 min	Raumtemperatur
3.	90% Ethanol	30 min	Raumtemperatur
4.	100% Ethanol	30 min	Raumtemperatur
5.	Ethanol + Aceton im Verhältnis 1:1	30 min	Raumtemperatur
6.	Aceton	30 min	Raumtemperatur
7.	2/3 Aceton + 1/3 Epongemisch	30 min	Raumtemperatur
8.	1/3 Aceton + 2/3 Epongemisch	30 min	Raumtemperatur
9.	Epongemisch mit 2% 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)-phenol 30 (DMP 30)	über Nacht im Anschluss: mind. 2 Std.	4 °C (Epon härtet bei 4 °C nicht aus und kann das Gewebe durchdringen) Raumtemperatur
10.	Auspolymerisieren (in 2 Schritten)	über Nacht über Nacht	60 °C 80 °C

Tabelle 3: Protokoll der Eponeinbettung

Bestimmung der Zellzahl in EHT

EHTs wurden an Kulturtag 3, 7 und 12 aus der Kulturschale entnommen und zweimalig in PBS gewaschen, in 1,5 ml Gefäße überführt und mit 600 µl Kollagenase bedeckt (Kollagenase Typ 2, 273 U/ml PBS). Anschließend wurden EHTs im Schüttelinkubator bei 800 U/min und 37 °C inkubiert, um die Matrix aufzulösen. Damit es zu keinem Überverdau kam, wurden die Zellen nach einer Stunde auf Eis gebracht und zusätzlich mit 500 µl PBS verdünnt. Die Zellzahl wurde schließlich in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Analyse der Genkonzentration in EHT

RNA-Präparation

Die Präparation der RNA aus EHTs und Gewebe erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Dafür wurden EHTs mit PBS gewaschen und separat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit 600 µl TRIzol® versehen und anschließend auf Eis homogenisiert (Polytron). Zu den Homogenaten wurden je 120 µl Chloroform hinzupipettiert und die Proben für 15 sec geschüttelt (Vortex). Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zentrifugierung der Proben zur Beschleunigung der Phasenauftrennung für 15 min bei 4 °C mit 12.000 g. Danach wurde die wässrige, hydrophile Phase vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Diese enthielt die RNA. Die hydrophobe, phenolische Phase und die Interphase wurden für die anschließende DNA-Präparation auf Eis aufbewahrt, der wässrige Überstand mit 600 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt und nach erneutem, kurzen Schütteln (Vortex) wiederum 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die RNA bei 12.000 g, 4 °C für 10 min pelletiert. Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet in 75% Ethanol gewaschen. Das Gefäß wurde wiederholt kurz geschüttelt, um das präzipitierte Pellet vom Gefäßboden zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (7.500 g, 4 °C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknet. Das Präzipitat wurde in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und 10 min bei 60 °C zur Lösung von RNA-Doppelsträngen erwärmt. Danach kamen die Proben direkt auf Eis. Im Anschluss erfolgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 260 nm. Alle aufgeführten Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet (Mittelwert±SEM aller gemessenen Proben dieser Arbeit: 1,775±0,185). Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C.

DEPC-Wasser: 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) auf 1 l H₂O (0,1%) über Nacht bei Raumtemperatur (alternativ 1 Stunde bei 37 °C) unter ständigem Rühren. Vor Verwendung autoklavieren.

Reverse Transkription

Nach der Gehaltsbestimmung mittels Spektrophotometrie wurden 2 µg RNA in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 0,75 µl *Random Primer* (p(dN)₆, Roche Diagnostics, Mannheim) versehen. Zur Auftrennung von RNA/Primer-Doppelsträngen mussten die Proben denaturiert (5 min, 70 °C) und im Anschluss sofort auf Eis abgekühlt werden. Danach wurden die Reaktionsmischungen, wie unten dargestellt, komplettiert und die reverse Transkription für 60 min bei 37 °C durchgeführt und durch erneute Inkubation für 2 min bei 94 °C gestoppt. Zum Schluss wurden die Proben auf Eis mit H₂O auf 44 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert (~2 µg cDNA/44 µl = 46 ng cDNA/µl).

Reaktionsmischung: 2 µg RNA
0,75 µl Random Primer

5 µl 5x First Strand Buffer
5 µl dNTP-Mix (10 mM)
2 µl DTT
1 µl MMLV-RT
ad 25 µl mit DEPC-H₂O

Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Prinzip

Die mRNA-Konzentration wurde mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) in einem ABI PRISM 7900 System (TaqMan) durchgeführt. Neben spezifischen Primern werden für die TaqMan qRT-PCR sequenzspezifische, fluorogene Hybridisierungs sonden (5'-Ende: 6-Carboxyfluorescein, FAM; 3'-Ende: 6-Carboxy-tetramethylrhodamin; TAMRA) verwendet. Nach Anregung der FAM-Fluoreszenz (Reporterfluorochrom) wird dessen Fluoreszenzenergie auf das Quencherfluorochrom (TAMRA) übertragen (FRET = Fluoreszenz-Energietransfer). Der FRET-Mechanismus funktioniert nur, wenn die beiden Fluorochrome in einer engen räumlichen Beziehung zueinander stehen (bei intakter Hybridisierungssonde). Während der PCR-Reaktion wird die Hybridisierungssonde durch die 5'-Exonuklease-Aktivität einer DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold[®]) zerschnitten, was zu einer Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher und damit zu einem verminderten FRET führt. Bei gleichzeitiger Spektralanalyse unter Argonlaseranregung (488 nm) lässt sich dieses durch eine Zunahme der FAM-Fluoreszenz bei gleichzeitiger leichter Abnahme der TAMRA-Fluoreszenz detektieren. Abbildung 4 A zeigt schematisch das Prinzip

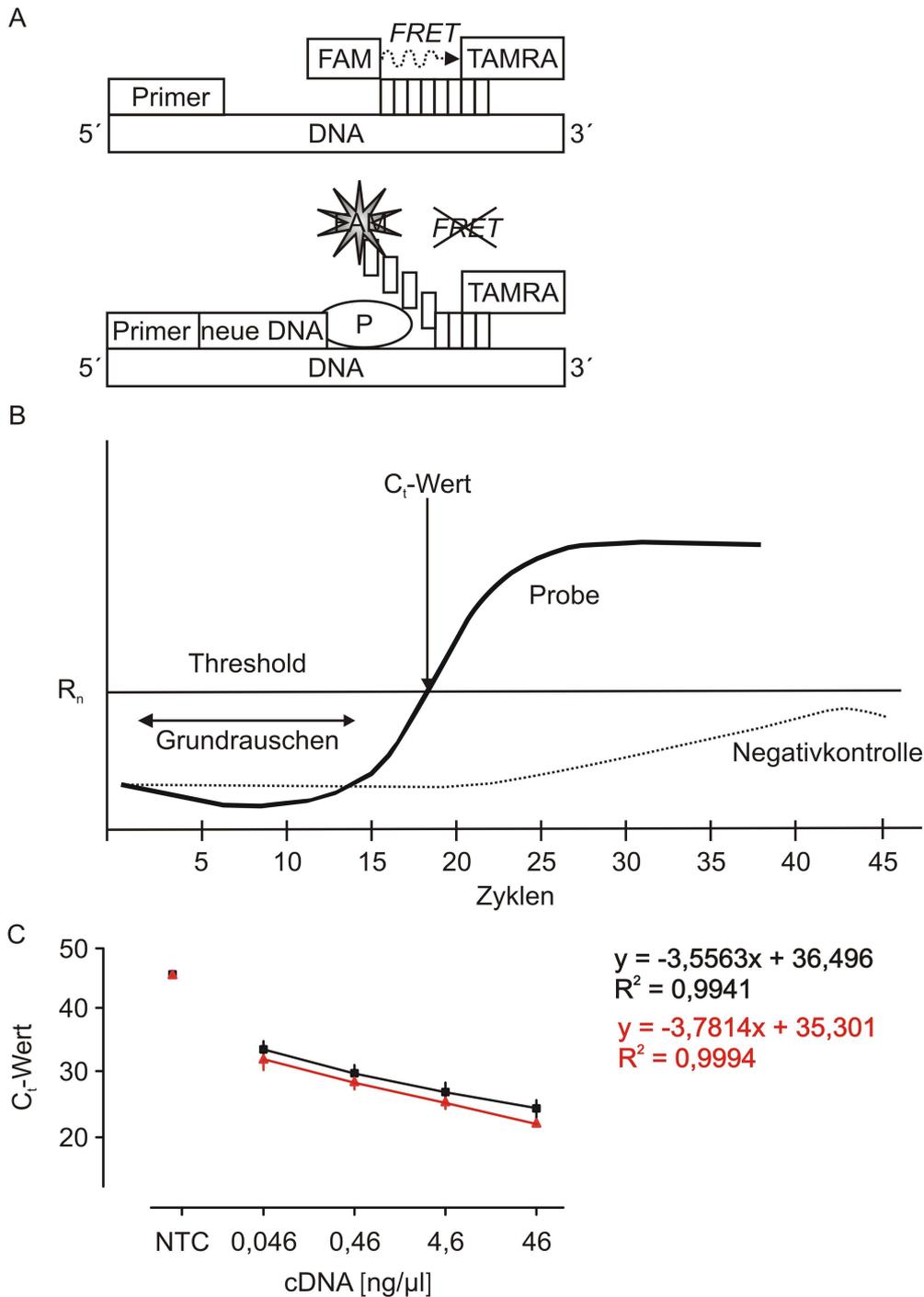


Abbildung 4: Prinzip der TaqMan-PCR. (A) Sequenzspezifische Anlagerung von Sonde und Primer. Synthese der neuen DNA und Hydrolyse der Sonde durch die Polymerase (P). Durch die räumliche Trennung von FAM und TAMRA wird der FRET aufgehoben, so dass FAM ein eigenständiges Fluoreszenzsignal emittieren kann. (B) Darstellung der individuellen Festlegung des Schwellenwertes zur Ermittlung der C_t -Werte. (C) Darstellung von 2 Standardreihen für die Amplifikation von GAPDH (schwarz) und CSQ (rot). Eine Voraussetzung für die Anwendung der ΔC_t -Methode sind gleiche PCR-Effizienzen der unterschiedlichen TaqMan-Amplifikationssysteme, d. h. die Steigungen der Standardgeraden müssen identisch sein.

der qRT-PCR. Die Hydrolyse der Hybridisierungssonde durch die 5'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Bindung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. In direkter Abhängigkeit von der Zielsequenzmenge kommt es schließlich zu einer Zunahme des FAM-Signals. Sonden und Primer liegen in der PCR-Reaktionsmischung im Überschuss vor. Dadurch wird garantiert, dass auch während der PCR-Amplifikation immer ausreichend Primer-Sonden-Paare vorliegen und es dadurch zu einer zur Ziel-cDNA-Menge proportionalen Zunahme des FAM-Signals kommen kann. Während eine Proportionalität von PCR-Reaktionen zu Beginn (~1-15. Zyklus) und gegen Ende (Zyklen >30) der Amplifikation aufgrund von PCR-spezifischen Limitationen (z.B. PCR-Inhibition zu Beginn und zum Ende der PCR) nicht gewährleistet werden kann, erreicht die Amplifikation in der Regel zwischen den Zyklen 15-30 einen linearen Verlauf. Die Quantifizierung der Amplifikation erfolgt über den sogenannten C_t -Wert (Schwellenwert, "threshold cycle"). Dieser Schwellenwert beschreibt den Zeitpunkt, an dem das Signal der FAM-Fluoreszenz in allen Versuchsgruppen auf dem gleichen, definierten Niveau über dem Grundrauschen liegt und sich die PCR dabei in einem linearen Bereich befindet (Abb. 4 B). Die Amplifikatmenge ist zu diesem Zeitpunkt gleich. Da idealerweise bei jedem Zyklus der PCR eine Verdoppelung der Zielsequenzen stattfindet, lassen sich aus der Differenz der Zyklen, die benötigt wurden, um ein gleiches Amplifikationsniveau zu erreichen (C_t -Wert Ctr - C_t -Wert Vergleichsgruppe = ΔC_t), die absoluten Unterschiede der cDNA Ausgangsmenge quantitativ erfassen. Dabei gilt im linearen Bereich der PCR:

$$\text{cDNA-Menge} \times 2^{\text{Zyklus}}$$

Durchführung

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie unten beschrieben zusammen. Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in Tabelle 5 aufgeführt. Zur Kontrolle der Linearität und Effizienz der PCR wurden für jedes Primer-Sonden-Paar im jeweiligen Lauf eine Verdünnungsreihe aus einer cDNA-Mischung, bestehend aus gleichen Anteilen aller Proben in Doppelbestimmung und eine Wasserkontrolle (NTC = *no template control*) mitgeführt. In Abbildung 4 C sind Standardgeraden für die Primer-Sonden-Paare (TaqMan-Systeme) GAPDH und CSQ gezeigt.

1x Reaktionsansatz: 0,4 µl cDNA (~18,4 ng/Ansatz)
 1,6 µl H₂O dest.
 1,0 µl 10 x Reaktionspuffer
 1,2 µl MgCl₂ (von 25 mM Stammlösung)
 0,2 µl Forward Primer (von 20 µM Stammlösung)
 0,2 µl Reverse Primer (von 20 µM Stammlösung)
 0,05 µl TaqMan[®]-Sonde (von 100 µM Stammlösung)
 0,8 µl dNTP-Mix (jeweils 0,2 µl von 10 mM ATP, CTP, GTP, TTP)
 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl AmpliTaq-Gold)

5'-Primer (20 µM):

GAPDH	5'-AAC TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'
Calsequestrin	5'-TTT CTG ACG GAG ACG TTC AGG-3'
α-MHC	5'-ACA GAG TGC TTC GTG CCT GAT-3'
β-MHC	5'-GCC TAC AAG CGC CAG GCT-3'
MLC-2v	5'-CAG CCA GCC TCA GAC ACC AT-3'
α-sm Aktin	5'-GGA GAT CAC AGC CCT CGC T-3'
α-sm Aktin	5'-GGA GAT CAC AGC CCT CGC T-3'
α-cd Aktin	5'-TGA TGC TCC CAG AGC TGT CTT-3'
BCL-2	5'-CCT GGT GGA CCA CAT CGC T-3'
Bax	5'-ATC CAC CAA GAA GCT GAG CG-3'
SERCA 2°	5'-CAG CTC ATT TTC CAG ATC ACA CC-3'
PLB	5'-GCA GCT GAG CTC CCA GAC TT-3'
NCX	5'-GGA GAT CTG GCT TCC CAC TTT-3'
DHPR 1a	5'-GCA GCA GTT TCG CTG TCT TC-3'
Ryanodin Rez. 2	5'-AGA ATC AGC GAG CTT CTG GG-3'
Coll. a1 Typ I	5'-TGG TCC TCA AGG TTT CCA AG-3'
Coll. Typ III	5'-AAT GGT GGC TTT CAG TTC AGC T-3'
MMP-2	5'-CCG AGG ACT ATG ACC GGG ATA A-3'
MMP-3	5'-CCG TTT CCA TCT CTC TCA AGA TGA-3'
MMP-13	5'-GGA AGA CCC TCT TCT TCT CA-3'
MMP-14	5'-GAA CTT TGA CAC CGT GGC CAT-3'
TIMP 1	5'-TCC TCT TGT TGC TAT CAT TGA TAG CTT-3'
TIMP 2	5'-GCT GGA CGT TGG AGG AAA GA-3'
VEGF-A	5'-ACT GTA CCT CCA CCA TGC-3'

VEGF-B	5'-CTG TGT GAC TGT GCA GCG CT-3'
TGFβ -1	5'-AGT CAC CCG CGT GCT AAT-3'
ANP	5'-CTG GGA CCC CTC CGA TAG AT-3'

3'-Primer (20 μM):

GAPDH	5'-CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA TG-3'
Calsequestrin	5'-TAG CAG GAC AGA GAG GGT GCA-3'
α-MHC	5'-CGA ATT TCG GAG GGT TCT GC-3'
β-MHC	5'-CAT CCT TAG GGT TGG GTA GCA-3'
MLC-2v	5'-CTT GTC AAT GAA GCC CTC TCT GT-3'
α-sm Aktin	5'-GAG AAG CCA GGA TGG AGC C-3'
α-sm Aktin	5'-GCT TCT CTT TGA TGT CGC GC-3'
α-cd Aktin	5'-GAT GCC TCG CTT GCT CTG AG-3'
BCL-2	5'-AAT CAA ACA GAG GTC GCA TGC-3'
Bax	5'-ACG GAA GAA GAC CTC TCG GG-3'
SERCA2a	5'-CCG AAC ACC CTT ATA TTT CTG CA-3'
PLB	5'-TTT CCA TGA TGC CAG GAA GAC-3'
NCX	5'-GAC ATT GCC TAT GGA CGC ATC-3'
DHPR 1a	5'-TGG CTT CAG GGT CAT ATT CG-3'
Ryanodin Rez. 2	5'-TGA ACA CGA CTCCAA GTT TCC A-3'
Koll. α1 Typ I	5'-TTA CCA GCT TCC CCA TCA TC-3'
Koll. Typ III	5'-TGT AAT GTT CTG GGA GGC CC-3'
MMP-2	5'-CTT GTT GCC CAG GAA AGT GAA G-3'
MMP-3	5'-CAG AGA GTT AGA TTT GGT GGG TAC CA-3'
MMP-13	5'-TCA TAG ACA GCA TCT ACT TTG TC-3'
MMP-14	5'-CCG TCC ATC ACT TGG TTA TTC CT-3'
TIMP 1	5'-CGC TGG TAT AAG GTG GTC TCG AT-3'
TIMP 2	5'-GCA CAA TAA AGT CAC AGA GGG TAA T-3'
VEGF-A	5'-AAG ATG TCC ACC AGG GTC TCA-3'
VEGF-B	5'-GAC TGC TCG GGT ACT GGA TCA-3'
TGFβ -1	5'-CCC GAA TGT CTG ACG TAT TG-3'
ANP	5'-TCG GTA CCG GAA GCT GTT G-3'

Sonde mit 5'-FAM und 3'-TAMRA:

GAPDH	5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG CCC TTC A-3'	172 µM
Calsequestrin	5'-TGG CTG CCT ACA GTA CGC TGG GAA C-3'	82 µM
α-MHC	5'-ACA GTC ACC GTC TTG CCG TTT TCA GT-3'	68,5 µM
β-MHC	5'-TTC ATT CAG GCC CTT GGC GCC AAT-3'	100 µM
MLC-2v	5'-TGA TTG TGA AGG CCT CCT TGA ACT CCT G-3'	102 µM
α-sm Aktin	5'-TTA TTG CTC CTC CAG AAC GCA AAT ATT-3'	46 µM
α-sm Aktin	5'-AAT CTC ACG TTC AGC TGT GGT CAC GAA GG-3'	148 µM
α-cd Aktin	5'-CCA CGC CAC CAG GGT GTC ATG GTA-3'	174 µM
BCL-2	5'-AAC GGA GGC TGG GAT GCC TTT GTG-3'	23 µM
Bax	5'-ATC AGC AAT CAT CCT CTG CAG CTC CA-3'	106 µM
SERCA2a	5'-TTA CTC CAG TAT TGC AGG CTC CAG GTA-3'	38 µM
PLB	5'-CAC AGA AGC CAA GGC CTC CTA AAA GGA G-3'	67 µM
NCX	5'-CTG GCA AAT GTG TCT GGC ACT GAG GTT-3'	157 µM
DHPR 1a	5'-CTG TGC CTT CCT GAT CAT CAA CCT C-3'	147 µM
Ryanodin Rez. 2	5'-ATG GAT AAG GTC GCA CTG GAT TTC AGC G-3'	98 µM
Koll. α1 Typ I	5'-TGG CGG TTC AGG TCC AAT GG-3'	250 µM
Koll. Typ III	5'-TGG AA GAA GTC TGA GGA AGG CCA GCT G-3'	121 µM
MMP-2	5'-TCT GCC CCG AGA CCG CTA TGT CCA-3'	23 µM
MMP-3	5'-AGA TGG TAT TCA ATC CCT CTA TGG ACC TCC-3'	25 µM
MMP-13	5'-TCT GGT TAG CAT CAT CAT AAC TCC ACA CGT-3'	50 µM
MMP-14	5'-CAG AAC CAT CGC TCC TTG AAG ACA AAC ATC-3'	70 µM
TIMP 1	5'-TTC TGC AAC TCG GAC CTG GTT ATA AGG-3'	20 µM
TIMP 2	5'-TCT CCT TCC GCC TTC CCT GCA ATT AGA-3'	124 µM
VEGF-A	5'-AAG TGG TCC CAG GCT GCA CCC A-3'	40 µM
VEGF-B	5'-TGG TGG CTG CTG TCC TGA CGA TG-3'	57 µM
TGFβ -1	5'-ACC GCA ACA ACG CAA TCT ATG ACA-3'	61 µM
ANP	5'-TAG TCC GCT CTG GGC TCC AAT CCT-3'	97 µM

Tabelle 4: Sequenzen der Primer und Sonden

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
50 °C	30 sec	1
95 °C	10 min	1
95 °C 58 °C	30 sec 1 min	45

Tabelle 5: Temperaturbedingungen für Taq-Man PCR

Auswertung der PCR

Die Intensitäten der Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des ABI PRISM 7900 Systems in Echtzeit gemessen und alle Änderungen der Fluoreszenzintensität (ΔR) der Zyklen (n) bezogen auf die TAMRA-Fluoreszenz für jeden einzelnen Zyklus berechnet ($\Delta \text{FAM-TAMRA}/\text{Zyklus} = \Delta R_n$). Zur Kontrolle von Ungleichheiten der Ausgangs-RNA-Menge bzw. der RT-Reaktion wurde bei jedem Lauf die GAPDH-mRNA-Konzentration aller Proben bestimmt und die C_t -Werte entsprechend korrigiert. Die Konzentration von Herzmuskel-spezifischer cDNA wurde zusätzlich auf CSQ und alle anderen Werte auf GAPDH bezogen. Die relativen Konzentrationsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden schließlich mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechnet (Livak und Schmittgen 2001; s.u.) und als prozentuale Änderung von der Kontrollgruppe (frisch isolierte Zellen an Tag 0) dargestellt.

Im Einzelnen wurde die Datenanalyse mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wie folgt durchgeführt:

- [1] GAPDH-Werte derselben Proben aus 7 unabhängigen Messungen wurden zur Berechnung des durchschnittlichen C_t -Niveaus einzelner Proben gemittelt:

$$\text{MW } C_{t \text{ GAPDH Einzelproben}}$$

- [2] Alle GAPDH-Werte wurden zur Berechnung des durchschnittlichen C_t -Niveau aller Proben gemittelt:

$$\text{MW } C_{t \text{ GAPDH alle Proben}} (16,805)$$

- [3] Durch Subtraktion des Mittelwerts aller GAPDH C_t -Werte mit den Mittelwerten der Einzel-GAPDH- C_t -Werte erfolgte die Berechnung eines individuellen Korrekturfaktors für alle Proben:

$$\text{MW } C_{t \text{ GAPDH alle Proben}} - \text{MW } C_{t \text{ GAPDH Einzelprobe}} = \text{GAPDH Korrekturfaktor (KF)}$$

- [4] Durch Addition der Korrekturfaktoren auf jeden Einzel- C_t -Wert wurden Ladungsunterschiede (bei der Annahme einer gleichmäßigen GAPDH-Konzentration in allen Proben) korrigiert:
 C_t -Wert Einzelmessung + GAPDH KF = beladungskorrigierter C_t -Wert (C_t korrigiert)
- [5] $C_{t \text{ GAPDH korrigiert}}$ oder $C_{t \text{ CSQ korrigiert}} - C_{t \text{ x korrigiert}} = \Delta C_{t \text{ x}}$
- [6] $\Delta C_{t \text{ x}} - \text{Mittelwert } \Delta C_{t \text{ x Tag 0}} = \Delta \Delta C_{t \text{ x}}$
- [7] $2^{-\Delta \Delta C_{t \text{ x}}} = \text{mRNA-Konzentration als Faktor bezogen auf die mRNA-Konzentration an Tag 0}$
- [8] $2^{-\Delta \Delta C_{t \text{ x}}} \times 100 = \text{mRNA-Konzentration in Prozent bezogen auf die mRNA-Konzentration an Tag 0}$

Validierung von „Housekeeping-Genen“

Die Anwendung von GAPDH als nicht reguliertes Kontrollprotein (*housekeeping* Gen) ist gut etabliert. Dagegen ist eine Verwendung von CSQ als Herzmuskelzell-spezifisches „*housekeeping* Gen“ im Rahmen von PCR-Analysen im Gegensatz zu Proteinanalysen weniger gebräuchlich. In einer getrennten Versuchsserie wurde die Eignung der in dieser Arbeit verwendeten *housekeeping* Gene (GAPDH: allgemeines *housekeeping* Gen; CSQ: Herzmuskelzell-spezifisches *housekeeping* Gen) überprüft. Dafür wurde die GAPDH- und CSQ-mRNA-Konzentration in definierten Zellpopulationen mit einem unterschiedlichen Anteil von Herzmuskelzellen und Nicht-Herzmuskelzellen aus neonatalen Rattenherzen untersucht. Für diese Versuchsserie wurden Herzmuskelzellen neonataler Ratten durch ein selektives Anheftungsverfahren (*Preplating*) angereichert (60-70% Kardiomyozyten nach *Preplating* vs. 40-50% vor *Preplating*) und mit Nicht-Herzmuskelzellen vermischt. Als Nicht-Herzmuskelzellen fanden die während der *Preplating*-Phase selektiv angehefteten Zellen (v. a. Fibroblasten) Verwendung. Nach mehrfacher Passage sowie Kryokonservierung in Flüssigstickstoff (N_2) und erneuter Kultur waren in dieser Zellpopulation keine Herzmuskelzellen mehr nachweisbar. Zur Vermischung in definierten Verhältnissen wurden die Nicht-Herzmuskelzellen und Herzmuskelzellen nach Trypan-Blau-Vitalfärbung in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch ausgezählt und anschließend, wie in Tabelle 6

dargestellt, zusammengefügt. Nach dem Mischen der Zellen wurden diese auf Eis homogenisiert und die RNA, wie unter 2.4.1 beschrieben, isoliert.

Selektioniertes Kardiomyozytenkollektiv (%)	100	50	10	1	0,1	0
Kardiale Nicht-Kardiomyozyten (%)	0	50	90	99	99,9	100

Tabelle 6: Zusammensetzung der Zellsuspension für die qRT-PCR-Analyse zur Überprüfung der Eignung von GAPDH und CSQ als *housekeeping* Gene.

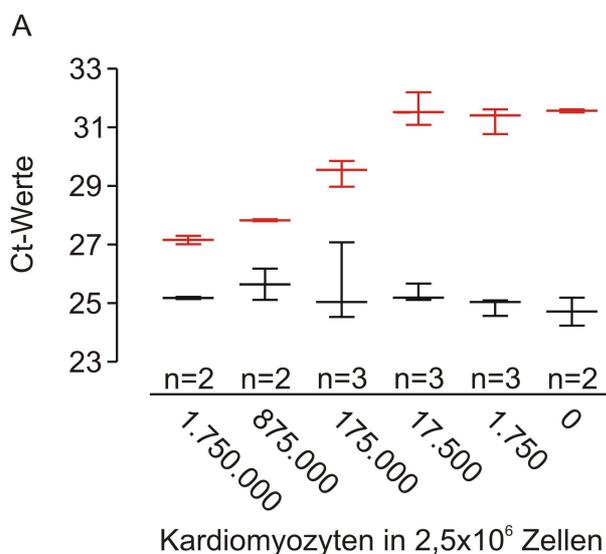
Wie erwartet, zeigten sich keine signifikanten Variationen der GAPDH-Konzentration in den unterschiedlichen Zellkollektiven (Abb. 5). Dagegen war die Konzentration von CSQ parallel zu der Abnahme des Herzmuskelzellanteils reduziert (Zunahme der C_t -Werte in der qRT-PCR).

Bis zu einem Kardiomyozyten/Fibroblasten-Verhältnis von 1:100 ließ sich ein annähernd lineares Verhältnis zwischen der Abnahme der CSQ-Konzentration und des Kardiomyozytenanteils nachweisen. Dies entsprach einer Kardiomyozytenanzahl von umgerechnet etwa 17.500 Zellen. Ab einem C_t -Wert von 31 waren keine weiteren Veränderungen festzustellen. Der Unterschied im durchschnittlichen C_t -Wert-Niveau zwischen dieser Versuchsserie und der generellen mRNA-Konzentrationsanalyse in EHTs erklärt sich aus der Verwendung unterschiedlicher Mengen an cDNA in der qRT-PCR.

Herzmuskelzell-spezifisch exprimierte Gene (s. Tabelle 7) wurden schließlich auf die CSQ-Konzentrationslevel bezogen, um vor allem in EHTs ($\leq 50\%$ Herzmuskelzellen) eine Aussage zur Konzentrationsänderungen in Kardiomyozyten zu ermöglichen.

<u>CSQ-Korrektur:</u>	α -cd-Aktin	α -MHC	MLC2v
	α -sk-Aktin	β -MHC	
	SERCA2a	NCX	RYR-2
	PLB	DHPR-1 α	
	ANF		

Tabelle 7: Herzmuskelzell-spezifisch exprimierte Gene. Die C_t -Werte wurden zur Analyse des Konzentrationsniveaus der Gene über die CSQ-Konzentration korrigiert (s. o.).



B

Kardiomyozyten (KM)/ Fibroblasten (in % KM)	100	50	10	1	0,1	0
Zellzahl (insgesamt)	2.500.000	2.500.000	2.500.000	2.500.000	2.500.000	2.500.000
Kardiomyozytenanteil (~70%)	1.750.000	875.000	175.000	17.500	1.750	0
Anteil der Fibroblasten (Nicht-Kardiomyozyten)	750.000	1.625.000	2.325.000	2.482.500	2.498.250	2.500.000
CSQ-Expr. (Ct-Werte)	27,2	27,8	29,5	31,6	31,3	31,6
GAPDH-Expr. (Ct-Werte)	25,2	25,6	25,6	25,3	24,9	24,7

Abbildung 5: Validierung von *Housekeeping* Genen. (A) Darstellung der Expressionen von GAPDH (alle Zellen, schwarz) und CSQ (Kardiomyozyten-spezifisch, rot) in Zellgemischen mit definierten Anteilen von Kardiomyozyten und Fibroblasten. (B) Tabellarische Zusammenstellung von in dieser Versuchsserie eingesetzten Zellzahlen sowie Berechnung der Kardiomyozyten/Nicht-Kardiomyozyten-Anteile in den untersuchten Zellsuspensionen. Zusätzlich sind die gemittelten Ct-Werte für CSQ und GAPDH dargestellt.

DNA-Präparation

Die DNA-Präparation erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolation aus der phenolischen Phase des Trizol[®]-Reagenz. Nach kompletter Abnahme der RNA-haltigen, hydrophilen Phase wurde die phenolische Phase mit 240 µl Ethanol (100%) supplementiert. Nach mehrfacher Inversion erfolgte die Inkubation der Mischung für 3 min bei Raumtemperatur. Durch Zentrifugation (2.000 g, 4 °C, 5 min) wurde die DNA pelletiert, der Überstand vorsichtig entfernt und verworfen. Zur Entfernung von Phenolresten wurde die DNA in 500 µl 0,1 M Natrium-Citrat für 30 min gewaschen (Schüttelinkubator, Raumtemperatur, 1200 U/min) und darauf durch Zentrifugation (2000 g, 5 min, 4 °C) erneut pelletiert. Dieser Waschvorgang erfolgte zweimal. Hiernach wurde das DNA-Pellet in 1200 µl 75% Ethanol aufgenommen und 10-20 min bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator (1200 U/min, Raumtemperatur) inkubiert. Die Auftrennung erfolgte wieder mittels Zentrifugation (2.000 g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets 15 min an der Luft getrocknet, diese anschließend in 500 µl 8 mM NaOH (pH 9) aufgenommen und über Nacht bei 37 °C und 1200 U/min im Schüttelinkubator belassen. Im Anschluss wurden nicht gelöste Teilchen mittels Zentrifugation (12.000 g, 4 °C, 10 min) von der gelösten DNA abgetrennt. Der DNA-haltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße (1,5 ml) transferiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand einer photometrischen Dreifachbestimmung bei 260 nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg (Sambrook und Gething 1989). Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Proteinpräparation

EHTs wurden nach Entnahme aus der Kulturschale zweimal in PBS gewaschen, in 300 µl Lysispuffer überführt und sofort mit einem Glas-Teflon-Homogenisator bei 1100 U/min für 60 sec auf Eis homogenisiert. Zusätzlich wurden frisch isolierte Zellen ($2,5 \times 10^6$) und die Matrixbestandteile (Kollagen und extrazelluläre Matrix) der EHT-Rekonstitutionsmischung in Lysispuffer aufgenommen. Die Bestimmung des Volumens der Homogenate (Tab. 8) erfolgte vor Bestimmung der Proteinkonzentration per Biorad DC Assay, modifiziert nach Lowry (Lowry 1951).

Kulturtag	Volumen (µl)	Anzahl (n)
0	287±19,87*	10
3	422,5±39,809	10
7	312,25±20,15	12
12	272,455±16,729	11
Matrix	400±3,78**	7

Tabelle 8: Volumina von Lysispuffer und EHT nach Homogenisierung (* frisch isolierte Zellen ohne Matrix und ohne Kulturmedium, ** Matrix (Kollagen+Matrigel) ohne Zellen und Kulturmedium)

Lysispuffer: 2 ml Tris HCl (1,5 mol/l, pH 8,8), 1 ml EDTA (0,5 mol/l, pH 8,0), 3 ml NaF (1 mol/l), 15 ml SDS (20%), 10 ml Glycerol, ad 100 ml mit H₂O. Zugabe von Aprotinin (2 µg/ml Lysispuffer) direkt vor der Verwendung.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung nach Lowry (1951) beruht auf zwei Reaktionen: (1) Reduktion von Heteropolysäuren (Phosphormolybdän-, Phosphorwolframsäure, beide im Folin-, Phenolreagenz enthalten) durch aromatische Aminosäuren unter Bildung von Mischoxiden; (2) Bildung eines farbigen (blau-violetten) Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer-(II)-Ionen in alkalischer Lösung. Dieser Reaktionsschritt entspricht der Biuretreaktion. Die Proteinbestimmung nach Lowry ist hinsichtlich der Sensitivität der Bradford-Reaktion überlegen (Goshev und Nedkov 1979) und darüber hinaus weniger anfällig auf SDS.

Zur Proteinmessung (Biorad DC Protein Assay) wurden 1 ml Lösung A und 20 µl Lösung S zu Lösung A` vermischt (1 Woche stabil), 5 µl jeder Proteinprobe in Reaktionsgefäßen mit 15 µl Lysispuffer versehen und mit 100 µl Lösung A` und 800 µl Reagenz B aufgefüllt. Zur besseren Durchmischung der Substanzen wurde jede Probe kurz geschüttelt (Vortex) und anschließend in Einmalküvetten überführt. Während der folgenden Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur bildeten sich die eingangs beschriebenen farbigen Komplexe. Die Absorbation konnte für eine Stunde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm stabil gemessen werden. Zur Überprüfung der Linearität des Assays wurde bei jeder Messung eine Standardreihe mit IgG (1 mg/ml) mitgeführt. Die Zusammensetzung der einzelnen Proben kann der Tabelle 9 entnommen werden. Abbildung 6 zeigt in graphischer Darstellung die Linearität der Standardreihe.

Probe	Volumen Reagent A (µl)	Volumen Reagent B (µl)	Lysis-puffer (µl)	IgG (1 mg/ml) (µl)	Gesamtvolumen der Probe (µl)	Proteinkonz. (µg/ml)
Leerwert	100	800	20	0	920	0
Standard 1	100	800	18	2	920	2,17
Standard 2	100	800	16	4	920	4,35
Standard 3	100	800	14	6	920	6,52
Standard 4	100	800	12	8	920	8,7
Standard 5	100	800	10	10	920	10,87

Tabelle 9: Zusammensetzung der Probengemische der Proteinstandardreihe

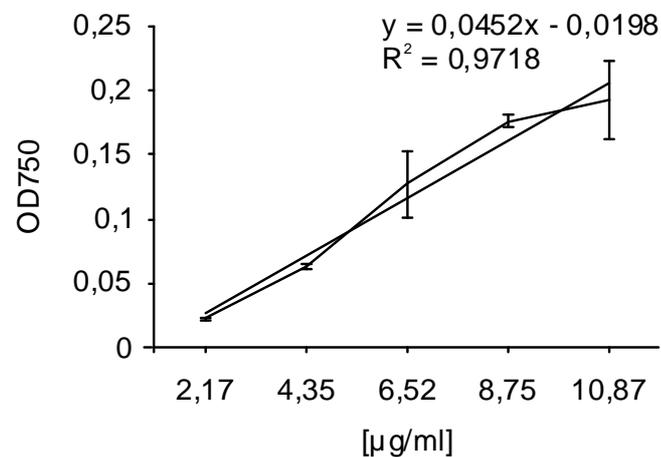


Abbildung 6: Exemplarische Darstellung einer mit dem DC Biorad Assay System bestimmten IgG-Standardgeraden (Messung in Doppelbestimmung).

Gelelektrophorese und Western-Blot

Die Proteine wurden über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 12%) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und neben einem Molekulargewichtstandard eine Probenstandardreihe einer Querschnittprobe bestehend aus gleichen Teilen aller Versuchsgruppen („pool“) von 10, 30 und 50 µg aufgetragen. Schließlich wurden jeweils 30 µg Protein aus den Versuchsgruppen (fetales, neonatales, adultes Gewebe, Zellen und EHTs) auf das Gel geladen. Alle Proben wurden mit Lämmli-Puffer versehen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte unter einer Stromstärke von 10-20 mA/Gel und konstanter Spannung von 200 V. Sobald die Lauffront die Unterkante der Blotkammer erreicht hatte (nach ca. 5 Std.), wurde die Elektrophorese

gestoppt, das Sammelgel vom Trenngel gelöst und die Proteine mittels Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) übertragen. Die PVDF-Membrane wurden direkt vor der Verwendung kurz in Methanol getaucht, darauf 2 min in H₂O gespült und schließlich für 5 min im Transferpuffer inkubiert. Der Proteintransfer erfolgte in einer Nassblotkammer für 90 min bei einem konstanten Gleichstrom von 300 mA und wurde anschließend durch Ponceau-Färbung die Membran überprüft. Die Membran wurde mit TBS mit TWEEN-20 (TBST) entfärbt und unspezifische Bindungsstellen mit Trockenmilch-Lösung (60 min, Raumtemperatur) geblockt. Nach erneuter zweimaliger Waschung (2x5 min) in TBST wurden die Membrane mit spezifischen, primären Antikörpern in TBST mit 1% BSA inkubiert. Die Inkubation der primären Antikörper gegen das proteinspezifische Antigen erfolgte in der Regel über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C. Nach viermaligem Waschen mit TBST für je 5 min folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichteten und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelten sekundären Antikörper. Die Konzentrationen, Spezies und Bezugsquellen der einzelnen Antikörper sind den Tabellen 10 und 11 zu entnehmen.

Protein	Verdünnung	Hersteller	Spezies (Isotyp)
α-sarkom. Aktin	1:5.000 (TBST+BSA)	Sigma	Maus (IgM)
SERCA 2A	1:1.000 (TBST+BSA)	Santa cruz	Ziege (IgG)
PLB	1:5000 (TBST+BSA)	Phosphoresearch	Maus (IgG)
Calsequestrin	1:2.500 (TBST+BSA)	Affinity bioreagents	Hase (IgG)

Tabelle 10: Primäre Antikörper

sekundärer AK vs.	Verdünnung	Hersteller
Ziege IgG	1:5.000 (Milch)	Sigma (A 5420)
Maus IgM	1:5.000 (Milch)	Sigma (A 8786)
Maus IgG	1:10.000 (Milch)	Sigma (A 8924)
Hase IgG	1:30.000 (Milch)	Sigma (A 1949)

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

Anschließend wurde die Membran dreimal je 5 min in TBST gewaschen und darauf mit einer frisch angesetzten Lösung des ECL Plus™ Western Blot Detektions-Kits 5 min bei Raumtemperatur benetzt. Im Anschluss daran wurde die Membran sofort auf einen Röntgenfilm gelegt und der Film entwickelt. Die belichteten Filme wurden mittels

Durchlichtscanner digitalisiert und Unterschiede im Schwärzungsniveau zwischen unterschiedlichen Blots rechnerisch ausgeglichen. Die Schwärzung der einzelnen Banden wurde densitometrisch bestimmt. Alle Werte wurden auf CSQ korrigiert.

- Trenngel (12%): 20 ml Acrylamid (30%, Mix 37,5 Teile Acrylamid :1 Teil Bisacrylamid), 16,5 ml Aqua bidest., 12,5 ml Tris HCl (1,5 M, pH 8,8), 0,5 ml SDS (10%), 0,5 ml Ammoniumpersulfat (10%), 20 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin)
- Sammelgel (5%): 8,5 ml Acrylamid (30%, Mix 37,5 Teile Acrylamid :1 Teil Bisacrylamid), 28 ml Aqua bidest., 12,5 ml Tris HCl (0,5 M, pH 6,8), 0,5 ml SDS (10%), 0,5 ml Ammoniumpersulfat (10%), 50 µl N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)
- Laufpuffer: 6,04 g Tris, 28,8 g Glycin, 2,0 g SDS, ad 2000 ml mit H₂O
- 6x Lämmli-Puffer: 1,2 g SDS, 6,0 g Glycerol, 0,93 g DTT, 6 mg Bromphenolblau, 1,2 ml Tris HCl (0,5 M, pH 6,8), ad 10 ml mit H₂O
- 1x Lämmli-Puffer: 1 ml 6x Lämmli-Puffer, 5 ml H₂O
- Transferpuffer: Tris 3,025 g, Glycin 14,4 g, Methanol 200 ml, ad 1000 ml mit H₂O (Lagerung bei 4 °C. Bis zu viermal verwendbar)
- Ponceaurot-S-Lösung: 0,5 g Ponceaurot-S, 1 ml Essigsäure, ad 100 ml mit H₂O, filtern durch Faltenfilter
- 10x TBS: Tris ultra pure 242,3 g, NaCl 175,3 g in 2000 ml H₂O, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
- 1x TBST: 100 ml 10x TBS, 1 ml Tween 20, ad 1000 ml mit H₂O
- Blocksg. (Milch 5%): 5 ml Magermilchtrockenpulver, ad 100 ml mit TBST, frisch ansetzen
- Antikörperlösung: 1 g Rinderserumalbumin (BSA) auf 100 ml TBST, bei Lagerung Zugabe von 0,05% Thimerosal

ECL Plus™-Lösung: 1 ml Lösung A und 25 µl Lösung B (1:40) ergibt Lösung A', frisch ansetzen und sofort verwenden

Statistik

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Test und *post hoc* Dunnet-Test (Vergleich mehrerer Gruppen bezogen auf eine Referenzgruppe) mit der Software Prism4 ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

Substanzen und Hilfsmittel

Substanzen

1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäurehydrid (MNA), Roth, Deutschland
10x EBSS, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
10x Reaktionspuffer für qRT-PCR, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
2-Dodecenylnorbornene-2,3-dicarbonsäureanhydrid (DBA), Roth, Deutschland
2,3-Butandione-Monoxime (BDM), Sigma, München, Deutschland
[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethanesulfonsäure]] (HEPES), Sigma, München, Deutschland
Aceton, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid 4K Lösung 30 %, Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS), Bio-Rad, München, Deutschland
AmpliTaq Gold, DNA Polymerase, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Aprotinin, Sigma, München, Deutschland
Ascorbinsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
Azetoxysilan 734 (Silikon), Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland
beta-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
Bleicitrat-III-hydrat, Serva, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma, München, Deutschland
Bromphenolblau, Sigma, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl_2), Merck, Darmstadt, Deutschland
Carbogengas (95% O_2 , 5% CO_2), Linde AG, Höllriegelskreuth, Deutschland
Chick embryo extract, Hühnerembryonenextrakt, CEE, Instituts für Pharmakologie, Universität Erlangen, Deutschland
Chloroform, Merck, Darmstadt, Deutschland
Collagen Typ I, eigene Produktion, Pharmakologie und Toxikologie, Erlangen, Deutschland
Collagenase Typ II (275 U/ml), Worthington, CellSystems, St. Katharinen, Deutschland
Coomassie-Blau, G 250, Serva, Heidelberg, Deutschland
Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate (dNTPs), Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma Chemie GmbH, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt, Deutschland
DL-Dithiothreitol (DTT), Sigma, München, Deutschland
DMEM-Pulver, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Polymerase I, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
DNase I, Sigma Chemie GmbH, München, Deutschland
DNase Typ V from bovine spleen, Sigma, München, Deutschland

Dulbeccos Minimal Essential Medium (DMEM), Biochrom, Berlin, Deutschland
Eisessig, Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin G, gelblich, Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol vergällt, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Ethyldiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na₂EDTA; Titriplex[®] III), Merck, Darmstadt, Deutschland
Eukitt[®], Merck, Darmstadt, Deutschland
Extrazelluläre Matrix, TEBU GmbH, Frankfurt a. M., Deutschland
fetales Kälberserum (FKS), 0,1 µm sterilfiltriert, Mycoplasma frei, Berlin, Deutschland
Formaldehyd, säurefrei mindestens 37%, Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd (25%), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycidether 100, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzin, fluoreszenzfrei, Sigma, München, Deutschland
H₂O, Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
Hämatoxylin, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Hydrogenchlorid (HCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropranol, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄), Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin, Biochrom, Berlin, Deutschland
Magermilchpulver, Töpfer, Dietmannsried, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl₂), Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO₄), Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol, Applichem, Darmstadt, Deutschland
MMLV-RT, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NaF, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl), Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin), Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland

Pferdeserum, Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
Roti-Histokitt II, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Precision Plus™ All Blue, Bio-Rad, München, Deutschland
Protein Assay DC Assay, Bio-Rad, München, Deutschland
Roti-Mark, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodium-dodecyl-sulfat (SDS), Sigma, München, Deutschland
Thimerosal, Sigma, München, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100, Fluka, Steinheim, Deutschland
TRIZOL[®], Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin, certified crude 1:250, Difco, Detroit, USA
Trypsin-EDTA, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Uranylacetat, Roth, Karlsruhe, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen hatten den höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

Hilfsmittel

Agfa Snapscan 600 Durchlichtscanner, Agfa-Gaevert AG, Köln, Deutschland
Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Hamburg, Deutschland
Brutschrank, Funktion Line, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektronenmikroskop: EM 906, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Elektrophoresekammern/blotkammern, Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-Spannungsgeräte (Power Pac 300), Bio-Rad, München, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland
Feinanalysewaage, Mettler H51, Gießen, Deutschland
Gewebekulturröhrchen 14 ml steril, Cellstar, Greiner Laborbedarf (#163160), Frickenhausen, Deutschland
Glasschalen, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heizblock, Eppendorf Thermomixer 5436, Hamburg, Deutschland
Hybond™-P PVDF-Membran, Amersham Pharmacia Bioscience, Freiburg, Deutschland
Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Hyperprocessor, Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Kippwippe, Desaga SM1, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kolbenhubpipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kulturschalen, Falcon Tissue Dish, steril, Becton Dickinson Labware, Plymouth, England
MicroAmp optical tubes und caps, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Mikroskop, Axioplan, Carl Zeiss, Heidenheim, Deutschland
Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Parafilm, American National, Greenwich, CT, USA
Pasteur Pipetten, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
pH-Meter, Knick GmbH, Biberach, Deutschland
Photometer (Smart Spec 3000), Bio-Rad, München, Deutschland
Pipetten, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettierhilfen (Easypet), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Phoretix™, Auswertungssoftware, Nonlinear Dynamics, Newcastle, England
Polytron-Homogenisator®, Kinematica AG, Littau, Luzern, Schweiz
Potter S®, Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Präparationsbesteck, Hammacher Instrumente, Solingen, Deutschland
Prism4, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
Reaktionsgefäße (50 ml), Greiner Laborbedarf, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Reaktionsgefäße (1,5 ml), Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rollmischer (Assistent RM 5), Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim/Rhön, Deutschland
Schlittenmikrotom, Leica SM 2000 R, Leica Mikrosysteme Vertriebs GmbH, Bensheim, Deutschland
Silikondocht, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
Smart Spec[®] 3000, Bio Rad, München, Deutschland
Specimen Grids[®], 200 Maschen/grid, Firma SCI, München, Deutschland
Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Hannover, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm), einmal Filterhalter, Schleicher & Schuell, Kassel, Deutschland
Sterilfilter (0,22 µm), Steritop, Vakuumfilter, Millipore, Bedford, MA, USA
Teflonscheiben, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Universität Erlangen, Deutschland
Teflonzylinder, Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Universität Erlangen, Deutschland
Ultracut mit UltraDIATOME Diamantmesser (2,1 mm), Leica Mikrosysteme Vertriebs GmbH, Bensheim, Deutschland
USF Reinstwassersystem, USF-Deutschland, Ransbach-Baumbach, Deutschland
Vortexer (Vortex-Genie 2), Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage, OHAUS GT410, Florham Peak, NJ, USA
Waage, PM 480 Delta Range, Mettler Instruments, Gießen, Deutschland
Wärmeblock, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad, GfL m.b.H., Hannover-Vienhorst, Deutschland
Zellkulturschalen, Corning, Acton, USA
Zellkulturschränke (IG 150), Jouan, Unterhaching, Deutschland
Zellsieb, 60 meshes (250 µm), CD-1 Sieb, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Zentrifugenröhrchen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit dargestellt. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung der Daten im Text auf ein für das Verständnis erforderliches Maß reduziert.

Morphologische Analyse

Morphologische Charakterisierung

EHTs zeigten an den Kulturtagen 3, 7 und 12 unterschiedliche, charakteristische Erscheinungsbilder (Abb. 7). Ausgehend von einer flüssigen Rekonstitutionsmischung zum Zeitpunkt der Zellpräparation (Abb. 7 A) wurden EHTs über einen Beobachtungszeitraum von 12 Tagen zunehmend fester. An Tag 3 (Abb. 7 B) ließ sich bereits die charakteristische, zirkuläre Form der EHTs erkennen. EHTs waren zu diesem Zeitpunkt noch sehr instabil und von aufgelockerter, schwammartiger Konsistenz. Im weiteren Kulturverlauf konnte eine Komprimierung der EHT-Matrix beobachtet werden. Zugleich zeigten EHTs bereits zwischen Kulturtag 3 und 7 erste spontane und kohärente Kontraktionen. EHTs wurden am 7. Kulturtag auf eine phasische Dehnungsapparatur transferiert (Abb. 7 C). Dass ein Dehnungsreiz zu einer Verbesserung struktureller und funktioneller Eigenschaften von EHTs führt, konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden (Fink et al. 2000). Unter der phasischen Dehnung bildeten sich EHTs mit längsovaler Form aus (Abb. 7 D). Dabei fiel auf, dass sich der Durchmesser von EHTs an den Längsseiten im Vergleich zu den der Dehnungsapparatur direkt anliegenden Anteilen deutlich stärker ausbildete. Insgesamt zeigte sich jedoch im Kulturverlauf eine Reduktion des Durchmessers von anfänglich 4 mm an Tag 0 (Abstand Teflonzylinder zu Rand der Füllform) auf ~1 mm an Tag 12.

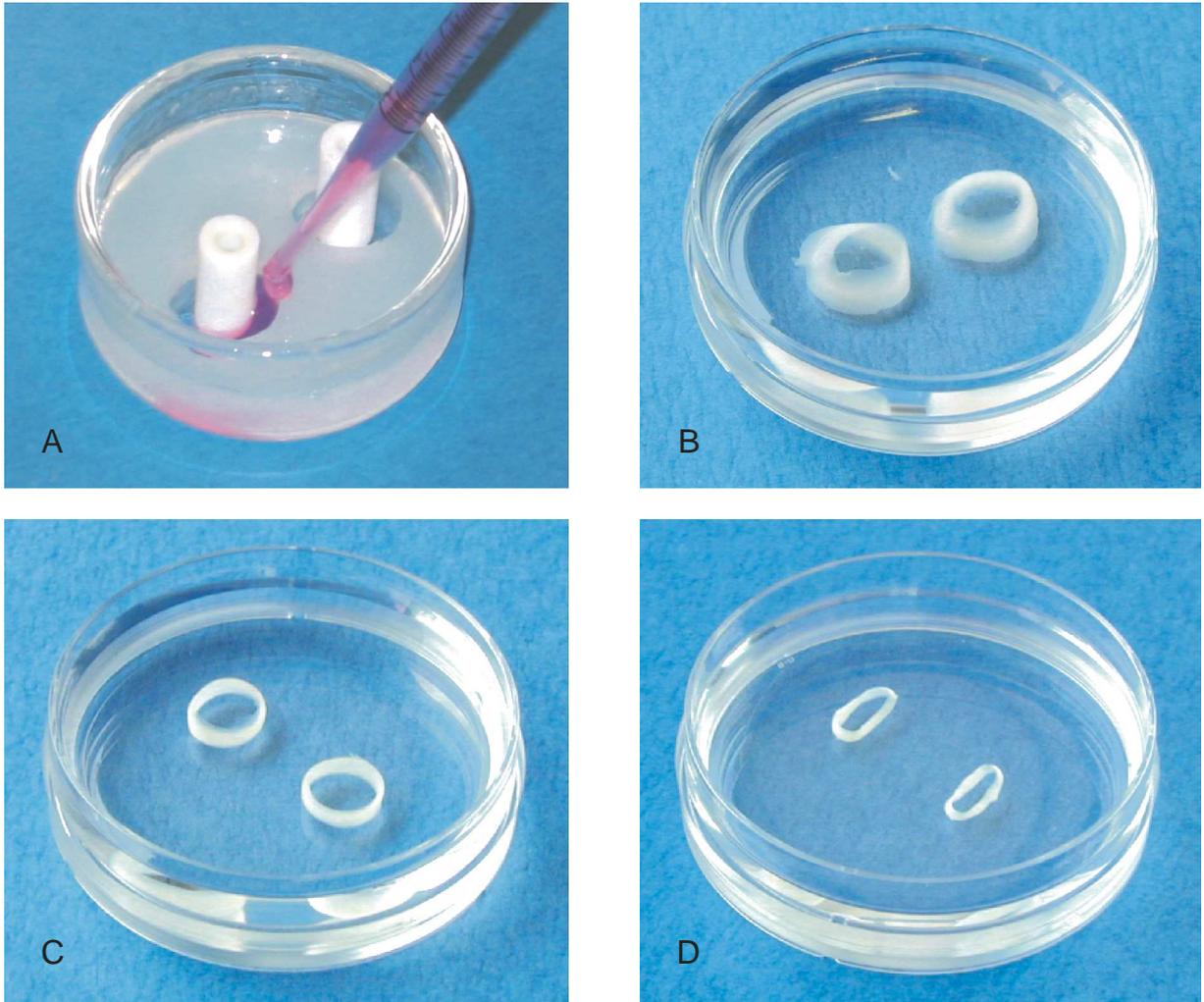


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung makroskopischer Aufsichten von EHTs zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur. (A) Das flüssige Zell-Matrix-Gemisch wird zur Herstellung von EHTs in eine Gussform pipettiert. Im Weiteren sind EHTs an den Kulturtagen 3 (B) und 7 (C) nach Entnahme aus der Gussform sowie an Tag 12 (D) nach Entnahme aus der Dehnapparatur abgebildet. Deutlich zu erkennen ist die charakteristische Komprimierung der EHTs im Kulturverlauf.

Histologische Charakterisierung

Nach 3 Kulturtagen wiesen EHTs eine Vielzahl von Zellen mit runden Zellkörpern auf (Abb. 8 A, Tag 3), welche von reichlich aufgelockerter Matrix umgeben waren. Im weiteren Kulturverlauf nahmen die Zellen zunehmend eine Längsorientierung innerhalb der sich komprimierenden Matrix an und formierten sich zunächst zu dünnen (Abb. 8 B, Tag 7) und später dickeren Zellsträngen (Abb., 8 C, Tag 12). Auffallend war das gehäufte Vorkommen kleiner, runder, 4-7 μm großer, randständiger Zellkerne in den Kardiomyozyten zu Beginn der Kultivierung (Abb. 8 A, Tag 3). Darüber hinaus enthielten alle Kardiomyozyten zu Beginn der Kultur nur einen Zellkern. Im weiteren Verlauf nahm der Längsdurchmesser der Zellkerne auf 7-9 μm an Tag 7 zu (Abb. 8 B) und erreichte eine maximale Größe von 10-25 μm an Tag 12 (Abb. 8 C). Mit fortwährender Kulturdauer wurden vermehrt binukleäre Kardiomyozyten beobachtet (~30% an Kulturtag 12). Parallel zur Zellkerngröße fand eine Größenzunahme der Kardiomyozyten über den gesamten Kulturzeitraum statt.

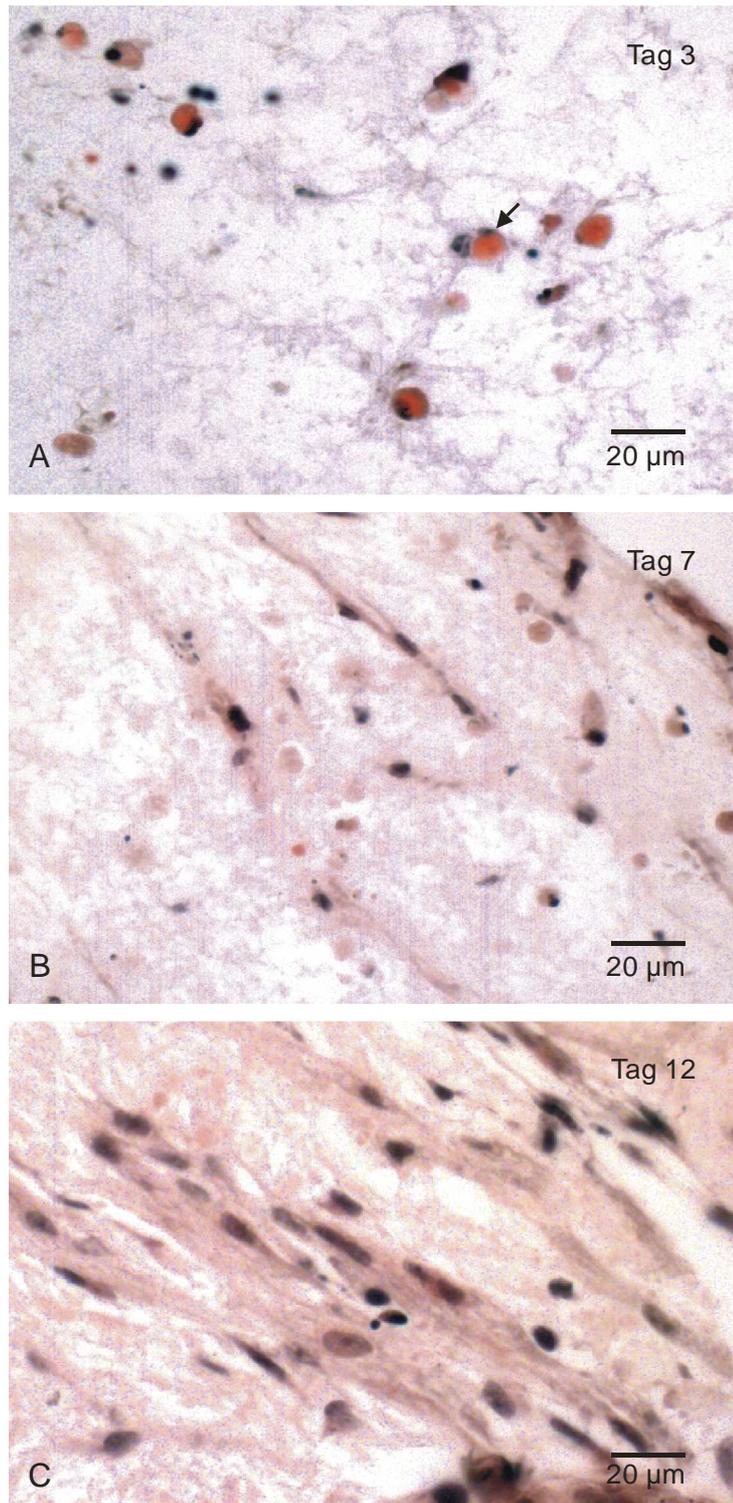
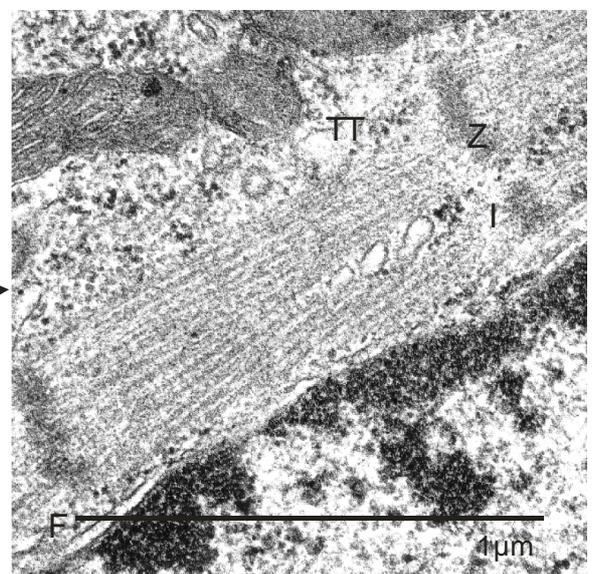
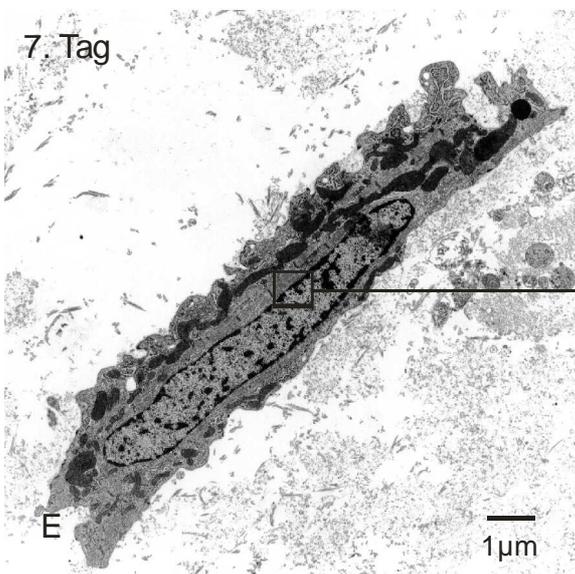
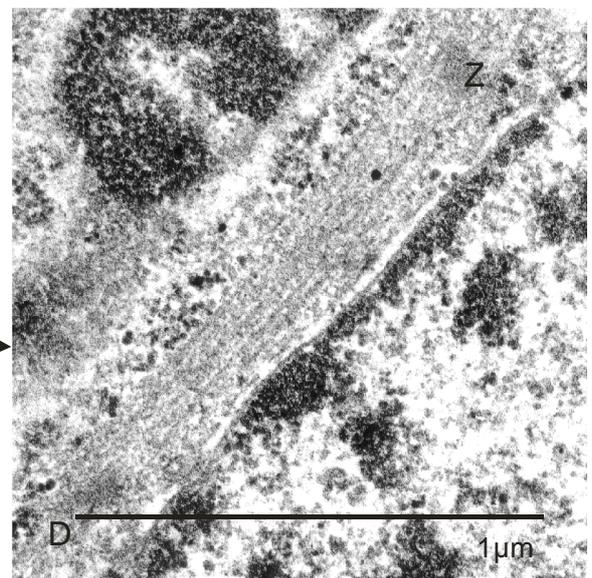
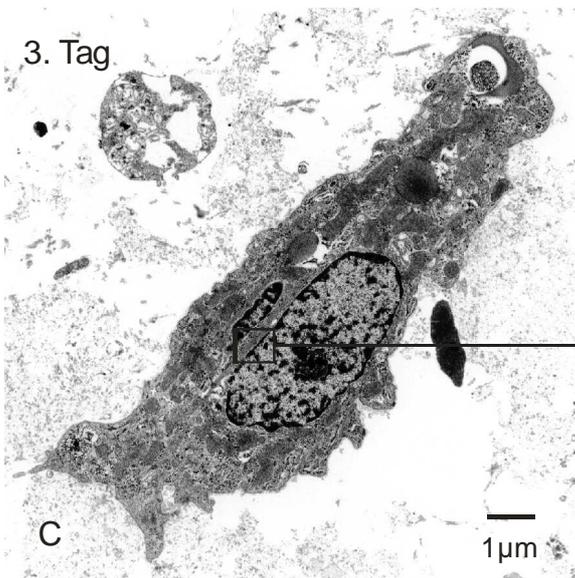
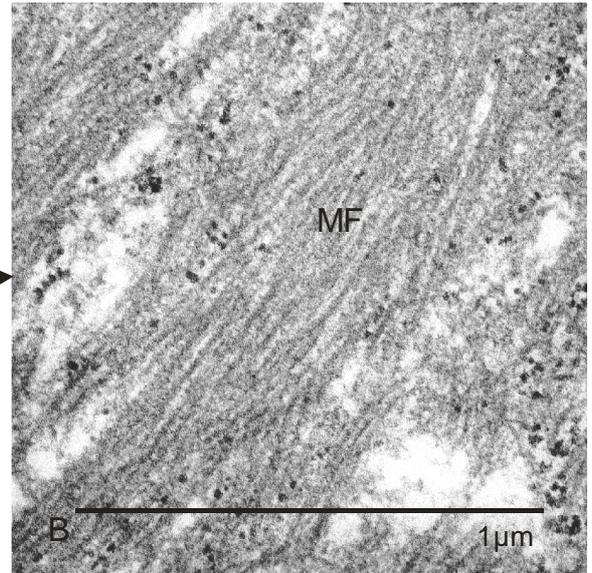
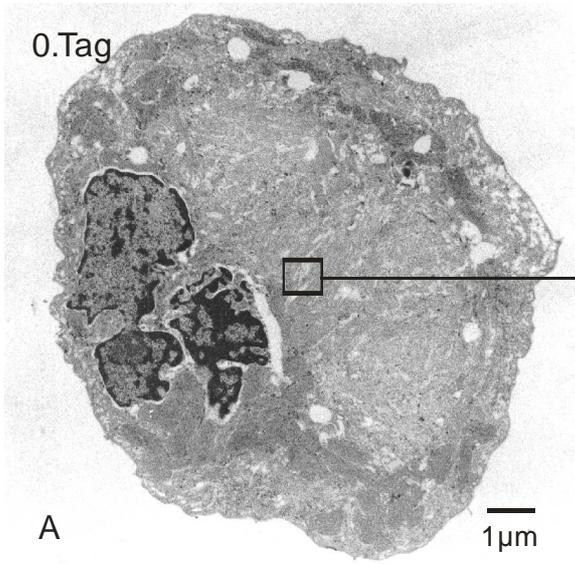


Abbildung 8: HE-Färbung von EHTs an den Kulturtagen 3, 7 und 12. (A) An Kulturtag 3 waren in EHTs vor allem isolierte, runde Zellkörper mit großem eosinophilen Zytoplasma und randständigen, kleinen Kernen zu beobachten (←). Die Matrix war zu diesem Zeitpunkt stark aufgelockert. (B) An Kulturtag 7 zeigten sich bereits vermehrt dünne, langgestreckte Herzzellen mit eosinophilem Zytoplasma. (C) An Kulturtag 12 war eine deutliche Zunahme der Zellkerngröße und Zeldicke zu beobachten. Zugleich fand ein deutlicher Matrixumbau statt.

Ultrastrukturelle Analyse

Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung bestätigten bereits zuvor beschriebene Beobachtungen aus der HE-Histologie (Abb. 9). Die Größe von Zellen und Zellkernen nahm über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich zu. Während Zellen in EHTs nach der Isolation zumeist rund geformt waren (Abb. 9 A, Tag 0), kam es im weiteren Verlauf zu einem ausgeprägten Längenwachstum bei geringerem Breitenwachstum, was schließlich zur Ausbildung der für Kardiomyozyten charakteristischen Zylinderform führte (Abb. 9 A, C, E, G). Auch auf ultrastruktureller Ebene zeigten sich im Kulturverlauf umfangreiche Umbauvorgänge in Kardiomyozyten. Direkt nach der Zellisolation waren keine zusammenhängenden Sarkomerstrukturen zu erkennen (Abb. 9 B, Tag 0). Stattdessen zeigte sich eine Ansammlung ungeordneter Myofilamente. Bereits an Kulturtag 3 kam es zur Ausbildung neuer, primitiver Sarkomerstrukturen mit Z-Banden (Abb. 9 D). Reichlich elektronendichte Granula aus Glykogen und Ribosomen gruppierten sich in der Nähe neu gebildeter Filamente (Sarkomere). In den folgenden Tagen schritt die Reifung der Sarkomerstrukturen weiter voran (Abb. 9 F, Tag 7). Zusätzlich zu Z-Banden ließen sich I-Banden deutlich erkennen. Zudem waren die primitiven Sarkomere bereits mit tubulären Strukturen assoziiert. Diese Strukturen wiesen auf die Ausbildung eines T-tubulären Systems bzw. des sarkoplasmatischen Retikulums in Kardiomyozyten hin. Mit fortgeschrittenem Wachstum der Kardiomyozyten bildeten sich klassische Sarkomerstrukturen, bestehend aus Z-, I-, A- und H-Banden (Abb. 9 H, Tag 12).

Neben Kardiomyozyten bestehen EHTs aus unterschiedlichen nicht-kardiomyozytären Zellspezies, die einen wesentlichen Anteil an der Funktion und dem Aufbau von EHTs haben dürften. In Abbildung 10 A ist exemplarisch ein Fibroblast abgebildet. Die Aufnahme dieser Zelle stammt aus einem EHT an Kulturtag 7. In der Detailvergrößerung ist zu erkennen, dass die abgebildete Zelle an der Bildung extrazellulärer Matrix, in diesem Fall vermutlich Kollagen, beteiligt ist (Abb. 10 B). Neben Fibroblasten konnten in EHTs Makrophagen (Abb. 10 C), Endothezellen (Abb. 10 D) und glatte Muskelzellen nachgewiesen werden.



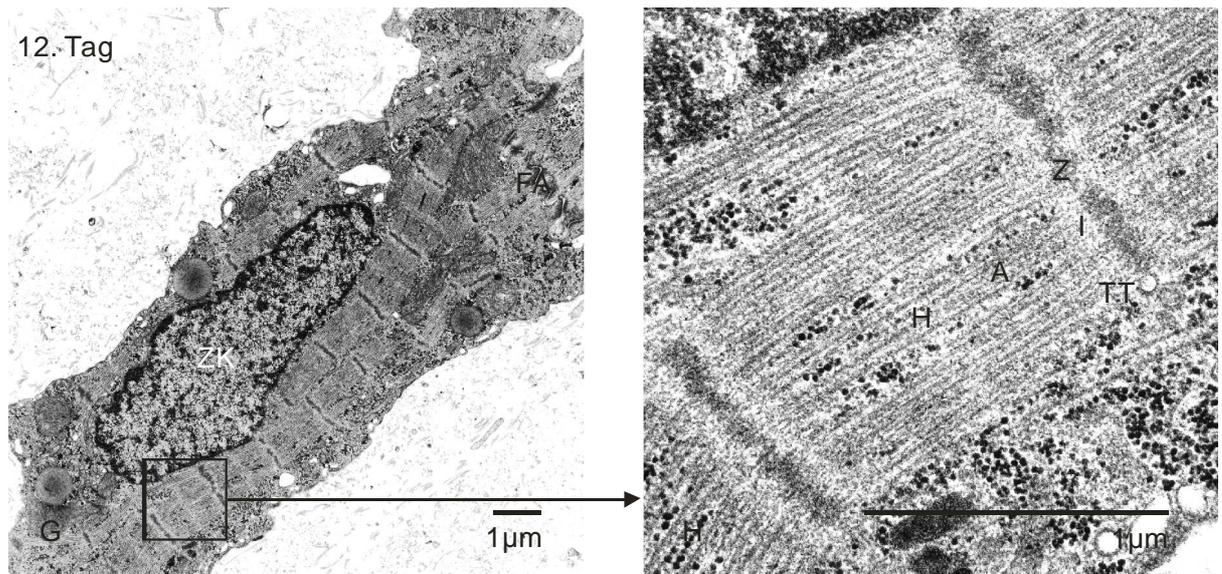


Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Darstellung einzelner Kardiomyozyten sowie deren Sarkomerstrukturen über den Beobachtungszeitraum von 12 Tagen. Die Abbildungen (A, C, E, G) zeigen einzelne Kardiomyozyten in EHTs, (B, D, F, H) zeigen jeweils eine Detailvergrößerung der Sarkomere dieser Zellen. (A, B) Tag 0: Frisch isolierte Kardiomyozyten zeigten keine geordneten Sarkomerstrukturen (MF = Myofilament). (C, D) Tag 3: Elongation des Zellkörpers und Ausbildung primitiver Sarkomere mit Z-Banden. (E, F) Tag 7: Größenzunahme und Sarkomerdifferenzierung mit Ausbildung von Z- und I-Banden sowie T-Tubuli (TT). (G, H) Tag 12: Kardiomyozyt im Zellverbund mit klassisch ausgebildeten Sarkomeren. End-zu-End-Verbindungen wurden über *Fascia adhaerens* (FA) hergestellt. Man erkennt deutlich das klassische Bandenmuster mit Z-, I-, A- und H-Bande sowie TT.

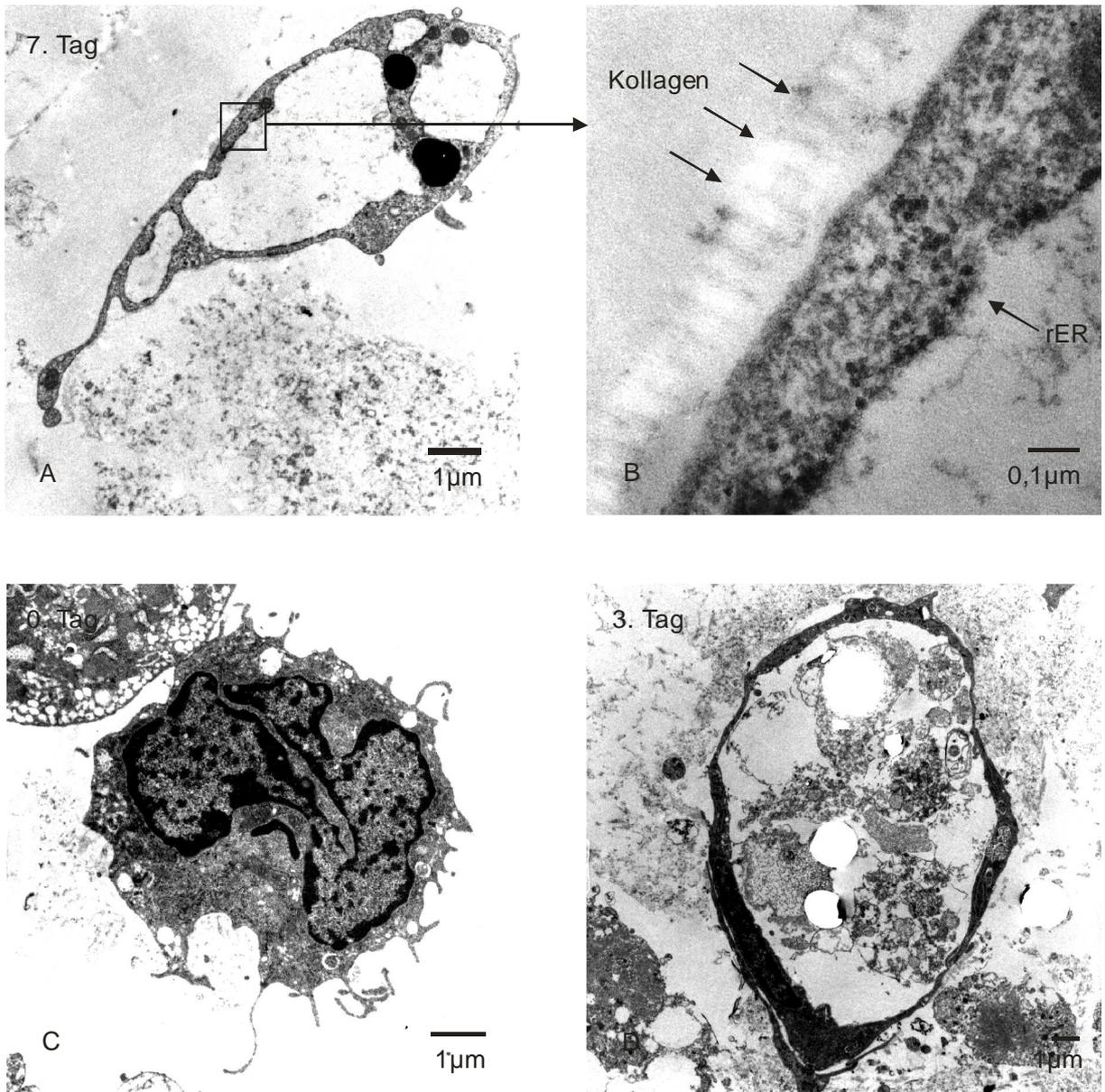


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Darstellung von Nichtkardiomyozyten in EHTs. (A) Elektronenmikroskopische Darstellung eines Fibroblasten in einem EHT an Kulturtag 7. (B) Die Detailvergrößerung zeigt frisch sezerniertes Kollagen an der Zellmembran des Fibroblasten. (C) Makrophage in einem EHT an Kulturtag 0. (D) Kapillare mit Endothelzellen in einem EHT an Kulturtag 3.

Genkonzentrationsanalyse

Zu ersten orientierenden Analysen des EHT-Modells wurden während des Beobachtungszeitraums zu ausgewählten Zeitpunkten, d.h. in EHTs der Kulturtage 3, 7 und 12, sowie in frisch isolierten Herzzellen die Zellzahl und DNA-, RNA- sowie Gesamtproteinmenge bestimmt. Darüber hinaus wurden die Transkriptkonzentrationen verschiedener Markerproteine untersucht, ausgewählte Proteine im Western-Blot-Verfahren nachgewiesen und anschließend densitometrisch quantifiziert. Die Transkriptkonzentrationen in EHTs wurden mit der Transkriptkonzentration in nativem Gewebe von fetalen (~18. Tag postconceptionem), neonatalen (1.-3. Tag nach Geburt) und adulten Wistar-Ratten (300-400 g) verglichen.

Bestimmung von Zellzahl, DNA, RNA und Protein in EHTs

Um die Zellzahl in EHTs im Kulturverlauf zu bestimmen, wurden Zellen enzymatisch aus den EHTs gelöst. Der DNA- und RNA-Gehalt sowie die Proteinmenge wurden direkt in EHTs untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zellzahl auf 25,3% gegenüber der Ausgangslage in EHTs im Kulturverlauf (Abb. 11 A). Gleichfalls wurde eine Abnahme der DNA-Menge in EHTs beobachtet (Abb. 11 B). Der Zell-/DNA-Verlust erwies sich in der ersten Woche als besonders ausgeprägt. Dabei fiel auf, dass die Zellzahl im Vergleich zur DNA-Menge überproportional abnahm (~75% vs. ~40%). Zugleich kam es zu einer initialen Abnahme der RNA-Menge pro EHT (Tag 3) und einem späteren Anstieg auf das Ausgangsniveau (Tag 12; Abb. 11 C). Bezogen auf die DNA-Menge in EHTs zeigte sich allerdings eine deutliche Zunahme der RNA im Kulturverlauf (Abb. 11 D). Die Beurteilung von zellulärem Protein in EHTs wird durch den großen Matrixanteil der EHTs erschwert. Lediglich an Kulturtag 0 (Tag der EHT-Herstellung) konnte der zelluläre Proteingehalt (~23% vom Gesamtproteingehalt) getrennt von der Matrixproteinmenge bestimmt werden (Abb. 11 E). Eine Trennung von exogenem Matrixanteil und endogen synthetisierten, extrazellulären sowie intrazellulären Proteinen war im weiteren Kulturverlauf nicht möglich. Der Gesamt-EHT-Proteingehalt nahm im Verlauf der Kultur deutlich auf ~25% des Ausgangswertes ab (Abb. 11 E). Dabei wurde die größte Reduktion der Proteinmenge in den ersten 7 Tagen beobachtet. Auffallend war, dass der DNA-korrigierte RNA-Gehalt und Protein-Gehalt pro EHT einen gegensätzlichen Verlauf zeigten.

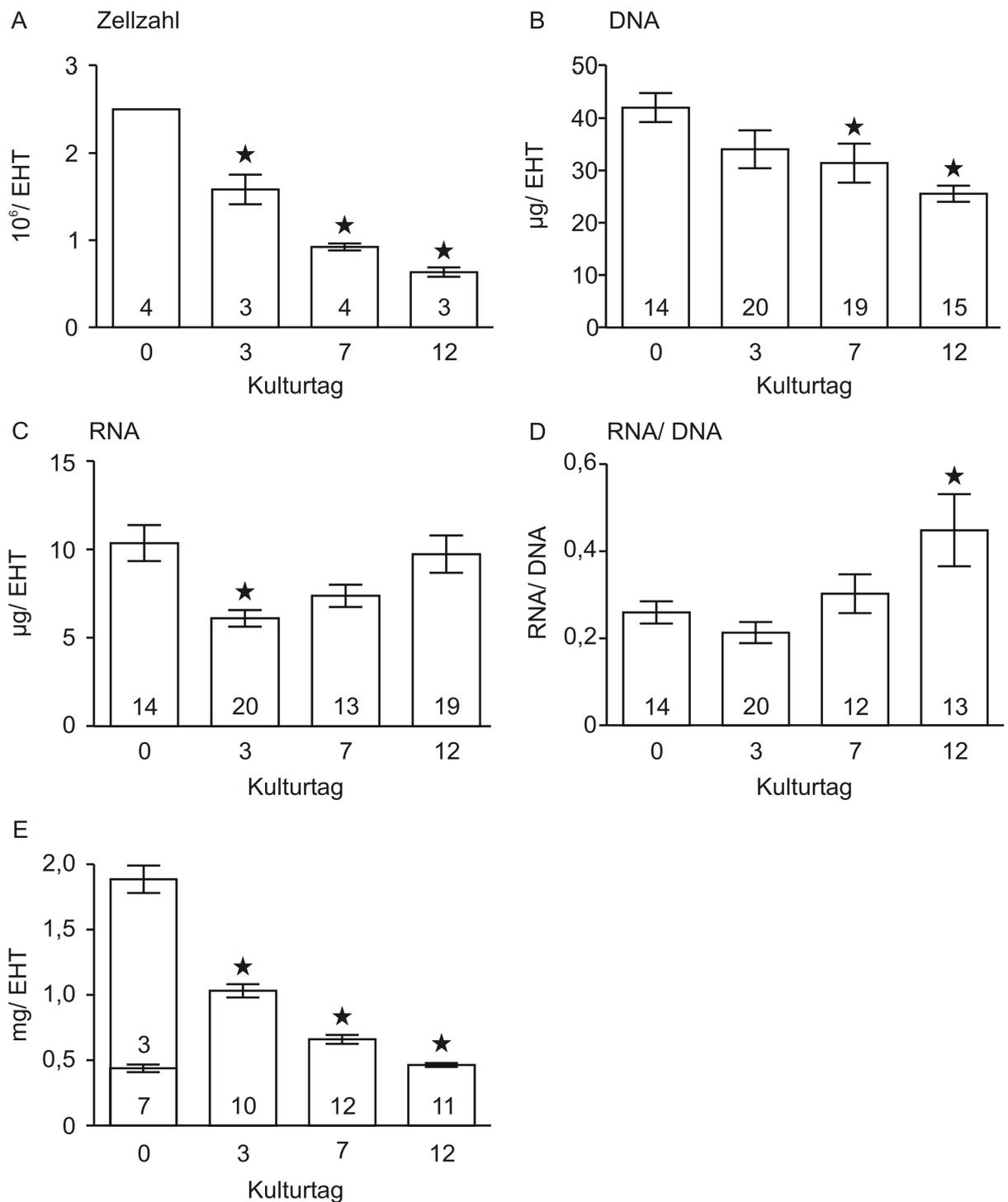


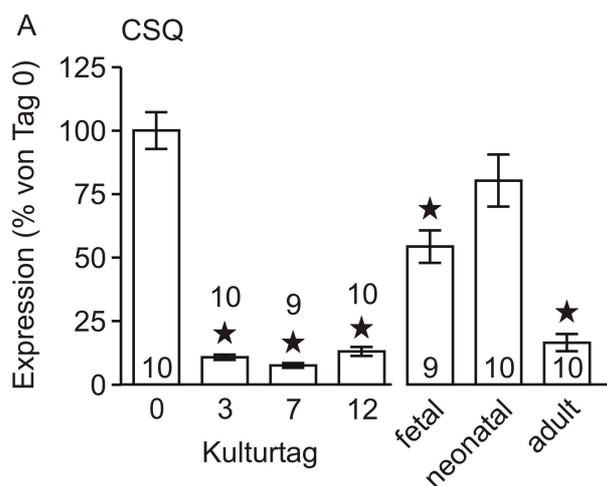
Abbildung 11: Zellzahl, DNA-, RNA- und Proteinmenge in frisch isolierten Herzzellen (Kulturtag 0) sowie EHTs an den Kulturtagen 3, 7 und 12. Die Ordinatens zeigen die absolute Zellzahl (A), DNA- (B) und RNA-Menge (C) in µg/EHT sowie die Ratio aus RNA/DNA (D). (E) Die Proteinmenge ist in mg/EHT dargestellt. An Tag 0 der EHT-Kultur, das heißt vor Vermengung von Matrix- und Zellanteil, konnte der Proteingehalt separat bestimmt werden (n=3-20). ★p<0,05 gegen Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

Genkonzentrationsanalyse per qRT-PCR

Transkriptkonzentrationsanalyse von Calsequestrin

Idealerweise werden „*housekeeping*“ Gene unabhängig von Umwelteinflüssen in Zellen gleich bleibend exprimiert. Unter dieser Annahme werden „*housekeeping*“ Gene als interner Standard zur Normalisierung von Expressionsdaten regulierter Gene verwendet. Häufig kodieren sie für Proteine, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion von zentraler Bedeutung sind und ein besonders hohes Konzentrationsniveau zeigen (GAPDH, β -Aktin, β -Mikroglobulin, 18S rRNA). Da im Rahmen dieser Arbeit die Konzentrationen kardialer Gene in Mischkulturen in Form von EHTs beurteilt werden sollten, war die Etablierung eines internen Herzmuskelzellstandards für die Analysen von besonderer Bedeutung (s. 2.4.4). Schließlich diente in dieser Arbeit die mRNA-Konzentration von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als generelle Beladungskontrolle (hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen). Das Niveau der Calsequestrin-Konzentration (CSQ) zeigte dagegen einen direkten Zusammenhang mit dem Kardiomyozytenanteil in kardialen Mischkulturen (s. Abb. 5), so dass durch die CSQ-Konzentrationsanalyse in EHTs deren Kardiomyozytenanteil abgeschätzt werden konnte. Darüber hinaus wurde die Konzentration aller kardiomyozytenspezifischen Gene über einen Bezug auf die CSQ-Konzentration korrigiert.

Im EHT-Kulturverlauf zeigte sich eine deutliche Abnahme der CSQ-mRNA-Konzentration. Bereits an Kulturtag 3 war die CSQ-Konzentration auf ~10% des Ausgangswertes reduziert, was auf eine massive Abnahme der Kardiomyozytenzahl pro EHT vor allem zu Beginn der EHT-Kultur hinweist (Abb. 12 A). Diese Reduktion fiel im Vergleich zur Abnahme der Zellzahl und DNA-Menge in EHTs überproportional aus. Im weiteren Kulturverlauf änderte sich die CSQ-Konzentration nicht wesentlich. Im direkten Vergleich zwischen frisch isolierten Herzzellen aus neonatalen Rattenherzen und neonatalem Herzgewebe zeigte sich ebenfalls eine geringere CSQ-Konzentration in den isolierten Zellen. An Tag 12 erreichte die CSQ-mRNA-Konzentration in etwa das Niveau der CSQ-mRNA von adultem Herzgewebe. Unter der Annahme, dass CSQ lediglich in Kardiomyozyten exprimiert wird und in diesen keiner Regulation unterliegt, ließ sich die Kardiomyozytenzahl in EHTs indirekt über die CSQ-Konzentration berechnen (Abb. 12 B). Während die Gesamtzellzahl von 2.500.000 um ~74,7% auf annähernd 632.500 abnahm (Abb. 11 A), zeigte sich nach Abschätzung über die CSQ-Konzentration eine verhältnismäßig große Abnahme der Kardiomyozytenzahl von 1.250.000 zu Beginn der Kultur (entspricht ca. 50% der Gesamtzellzahl in EHTs) auf 158.750 Kardiomyozyten an Kulturtag 12 (~12,7% von der Ausgangslage), wobei es zu diesem



B

Kulturtag	0	3	7	12
CSQ (Ct-Werte)	17,8	21,0	21,6	20,8
CSQ-Expression (% bez. auf Tag 0)	100	10,7	7,5	13
Gesamtzellzahl	2.500.000	1.581.667	921.000	632.500
Nichtkardiomyozytenanteil	1.250.000	1.447.917	827.250	470.000
Kardiomyozytenanteil	1.250.000	133.750	93.750	162.500
Kardiomyozytenanteil (%)	~50	8,5	10,2	25,7

Abbildung 12: Expressionsanalyse von CSQ. (A) Die Expression von CSQ in frisch isolierten Herzzellen und EHTs der Kulturtage 3, 7 sowie 12 wurde mit der CSQ-Expression in nativem Gewebe verglichen. Alle Werte wurden GAPDH korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen dargestellt. Die Probenzahl ist in der Säulengraphik jeweils angegeben. (B) Basierend auf der Überlegung, dass CSQ ein nicht reguliertes kardiales *housekeeping* Gen darstellt, wurde der Kardiomyozytenanteil in EHTs berechnet. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

Zeitpunkt anscheinend wieder zu einem leichten Anstieg der Gesamtkardiomyozytenzahl in EHTs kam (Abb. 12 B).

Transkriptkonzentrationsanalyse sarkomerischer Proteine

Bei der Konzentrationsanalyse von sarkomerischen Proteinen stellte sich die Frage, ob morphologische Beobachtungen einer Sarkomerdifferenzierung auch mit entsprechenden Veränderungen der Genkonzentration einhergehen. Dabei zeigte sich insbesondere in der ersten Woche der EHT-Kultur eine deutliche Zunahme der Konzentration von α -kardialem Aktin (α -cd Aktin; bezogen auf CSQ; Abb. 13 A). Ein ähnlicher Anstieg wurde auch in nativem Gewebe beobachtet, wobei das Niveau in EHTs der Kulturstage 7 und 12 mit Proben aus nativem Herzgewebe adulter Ratten vergleichbar war. Die mRNA von α -skelettalem Aktin (α -sk Aktin; bezogen auf CSQ; Abb. 13 B) nahm im selben Zeitraum auf nahezu ein Viertel ab (~28%). Gleichfalls konnte eine Reduktion der Konzentration in nativem Gewebe gezeigt werden. Darüber hinaus fiel auf, dass die Konzentrationen der mRNA von α -kardialem Aktin und α -skelettalem Aktin in neonatalem Gewebe gegenüber isolierten Zellen von Tag 0 höher waren. Die mRNA-Konzentrationsanalyse von α -glattmuskulärem Aktin (α -sm Aktin; bezogen auf GAPDH; Abb. 13 C) zeigte gegenüber nativem Gewebe gegensätzliche Tendenzen. Das unter anderem von Myofibroblasten und glatten Muskelzellen exprimierte α -glattmuskuläre Aktin war in EHTs an Kulturtag 12 im direkten Vergleich mit Kulturtag 7 sprunghaft um Faktor 3 angestiegen (Abb. 13 C). Dagegen zeigte sich in nativem Gewebe eine deutliche Reduktion der Konzentration von α -glattmuskulärem Aktin. Diese betrug in ausdifferenziertem Gewebe der adulten Ratte nahezu noch 10% des Referenzwertes.

Schwere Ketten des Myosins (MHC) sind ein wesentlicher Bestandteil eines Sarkomers. Im Rahmen der Entwicklung (physiologische Hypertrophie) sowie einer pathologischen Hypertrophie zeigt sich eine gegensätzliche Regulation von α - und β -Isoformen mit einer Hochregulation von β -MHC unter pathologischen Bedingungen. Bei der Analyse von α -MHC in EHTs konnte ein deutlicher Anstieg der mRNA innerhalb der ersten Woche beobachtet werden (bezogen auf CSQ; Abb. 13 D). Nach Aufbringen der EHTs auf die Dehnungsapparatur gingen die Werte auf ~63% des Maximalwertes zurück. Hingegen nahm, wie erwartet, die Konzentration von α -MHC in nativem Gewebe deutlich mit fortgeschrittener Entwicklung zu (~15-fach), während die β -MHC-Konzentration auf dem niedrigen Niveau des neonatalen Gewebes verblieb (fetal ~198% von Tag 0, adult ~99% von Tag 0; bezogen auf CSQ; Abb. 13 E). β -MHC zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie α -MHC mit einem Konzentrationsgipfel an Kulturtag 7 und einer Abnahme auf ~65% der Maximalkonzentration

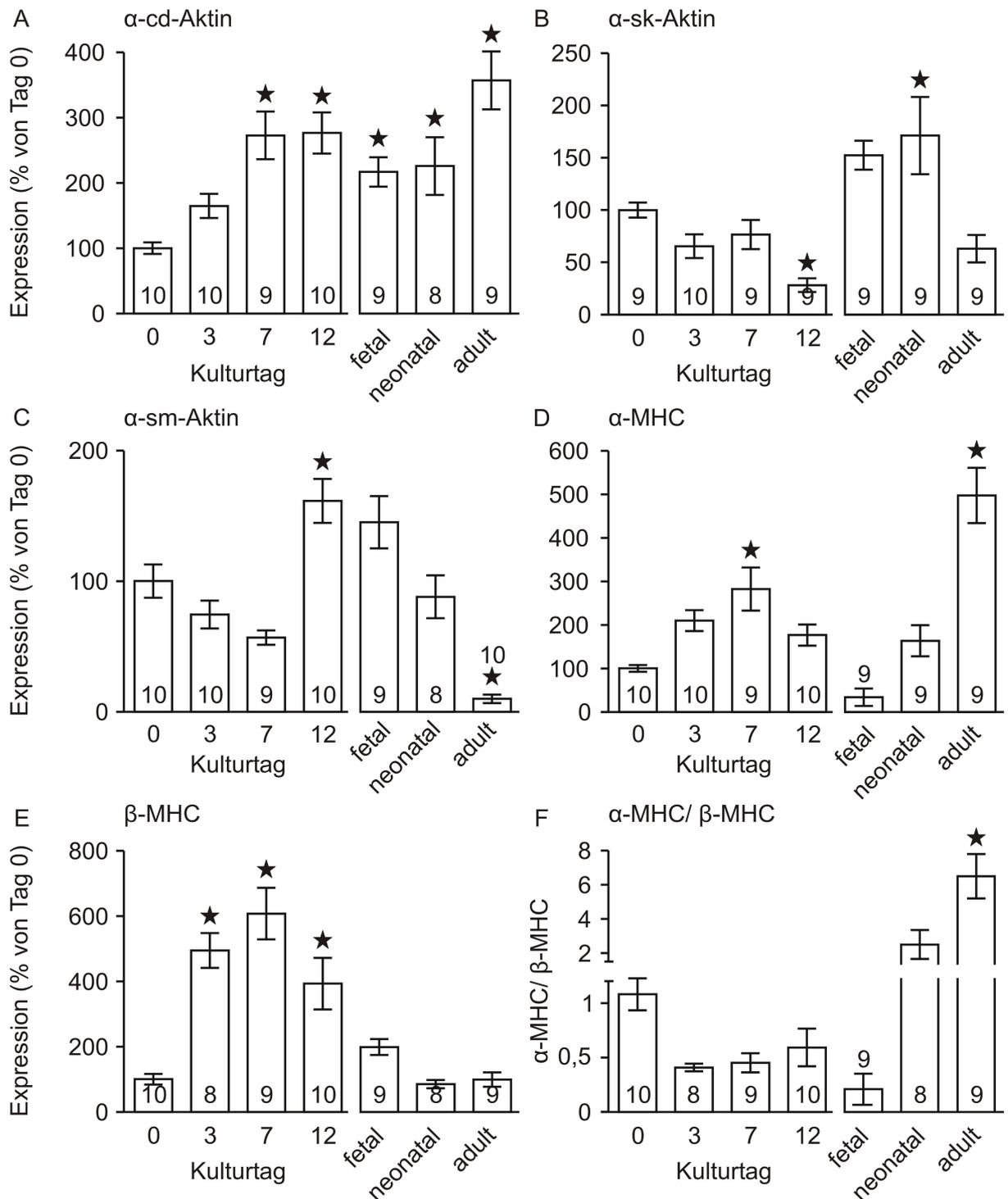


Abbildung 13: Expressionsanalyse sarkomerischer Proteine. Die Expression von (A) α-cd Aktin, (B) α-sk Aktin, (C) α-sm Aktin, (D) α-MHC und (E) β-MHC in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe wurde verglichen. Darüber hinaus wurde der Quotient aus α-MHC/β-MHC Expression berechnet (F). Alle Werte wurden, mit Ausnahme von α-sm Aktin (Korrektur mit GAPDH), CSQ korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen dargestellt. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ p < 0,05 vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

an Tag 12. Infolge der annähernd synchron verlaufenden Konzentrationsraten von α -MHC und β -MHC in EHTs kam es zu keiner signifikanten Änderung des α -MHC/ β -MHC-Quotienten im Kulturverlauf (Abb. 12 F). Dagegen stieg das Verhältnis im nativen Gewebe, wie vermutet, zugunsten von α -MHC deutlich an.

mRNA-Konzentrationsanalyse von Regulatoren des Kalziumstoffwechsels

Die Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration in der Systole löst eine Kontraktion von Kardiomyozyten aus. SERCA2a ist eine herzmuskelspezifische ATPase mit Sitz im sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Ihre Aufgabe ist die Wiederaufnahme von zytosolisch freigesetztem Kalzium in das SR. Damit hat die SERCA eine zentrale Rolle in der Regulation der zytosolischen Kalziumkonzentration in Kardiomyozyten. Nicht-phosphoryliertes Phospholamban (PLB) hemmt die SERCA-Funktion (Barry und Bridge 1993).

Nach einer anfänglichen Steigerung der SERCA2a-Konzentration auf 429% der Ausgangslage (frisch isolierte Herzzellen aus neonatalen Rattenkardiomyozyten; Tag 0) an Kulturtag 3 und 7 (bezogen auf CSQ; Abb. 14 A) zeigte sich an Tag 12 eine Reduktion auf ~53% der maximalen Werte bei dennoch weiterhin erhöhter Konzentration (~228% der Ausgangslage). In nativem Gewebe fanden wir dagegen einen kontinuierlichen Anstieg der mRNA-Konzentration der SERCA2a auf ~493% in der adulten Ratte. Die PLB-Konzentration wurde in EHTs nicht reguliert (bezogen auf CSQ; Abb. 14 B). In physiologisch entwickeltem Gewebe stieg die PLB-Konzentration dagegen analog zur SERCA2a-Konzentration kontinuierlich an. Das Übergewicht der SERCA2a-Konzentration in EHTs wird bei Darstellung des SERCA/PLB-Quotienten deutlich (Abb. 14 C). Während dieser Quotient in EHTs im gesamten Kulturverlauf signifikant erhöht war, zeigte sich in fetalem und adultem Myokard lediglich ein tendenzieller Anstieg, wobei der SERCA/PLB-Quotient in EHTs von Tag 12 annähernd dem Quotienten in nativem adultem Myokard entsprach.

Alternativ zur Speicherung von Kalzium im SR transportiert der Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) vornehmlich ein Molekül Kalzium gegen drei Moleküle Natrium während der Diastole aus der Zelle heraus. Im Gegensatz zur SERCA2a transportiert der NCX bidirektional in Abhängigkeit vom Membranpotential, wobei der Kalzium-Export unter physiologischen Bedingungen überwiegt (Bers et al. 1993). Dagegen hat der Kalziumionen-Import in undifferenziertem Gewebe aufgrund der Unreife des SR eine größere Bedeutung (Vornanen et al. 1992).

In EHTs zeigte sich eine deutlich gesteigerte NCX-Konzentration an Kulturtag 3 (~2,7-fache der Ausgangslage) mit einer anschließenden Reduktion auf das ~1,7-fache der Ausgangslage an den Kulturtagen 7 und 12 (bezogen auf CSQ; Abb. 14 D). Wie erwartet, kam es in nativem Gewebe mit zunehmender Differenzierung zu einer kontinuierlichen Abnahme. So ging die NCX-Konzentration in adultem Gewebe auf ~16% gegenüber fetalem Gewebe zurück.

Die Systole beginnt mit einem Kalziumeinwärtsstrom in die Kardiomyozyten über den L-Typ-Kalziumkanal. Dieser führt über eine kalziumgetriggerte Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodinrezeptor (RYR) zu einer quantitativ bedeutsamen Erhöhung des systolischen Kalziums. Es kommt zur Kontraktion. Darüber hinaus sorgen L-Typ-Kalziumkanäle für einen langsamen Kalziumeinwärtsstrom in der Systole und erhalten somit das Plateau in Phase 2 des Aktionspotentials (Fleischer und Inui 1989).

Im Verlauf der EHT-Kultur zeigte sich ein leichter Anstieg der DHPR-1 α -Konzentration mit Maximalwerten an Kulturtag 7 (bezogen auf CSQ; Abb. 15 A). In nativem Gewebe zeigte sich keine wesentliche Änderung der mRNA-Konzentration von DHPR-1 α . Dagegen kam es zu einem starken Anstieg der Konzentration des Ryanodinrezeptors in EHTs und in nativem Gewebe (bezogen auf CSQ; Abb. 15 B). Der Quotient von RYR-2/DHPR-1 α stieg sowohl in EHT-Proben, insbesondere nach Kulturtag 7, als auch in intaktem Myokard deutlich an und erreichte ein vergleichbares Niveau (Abb. 15 C).

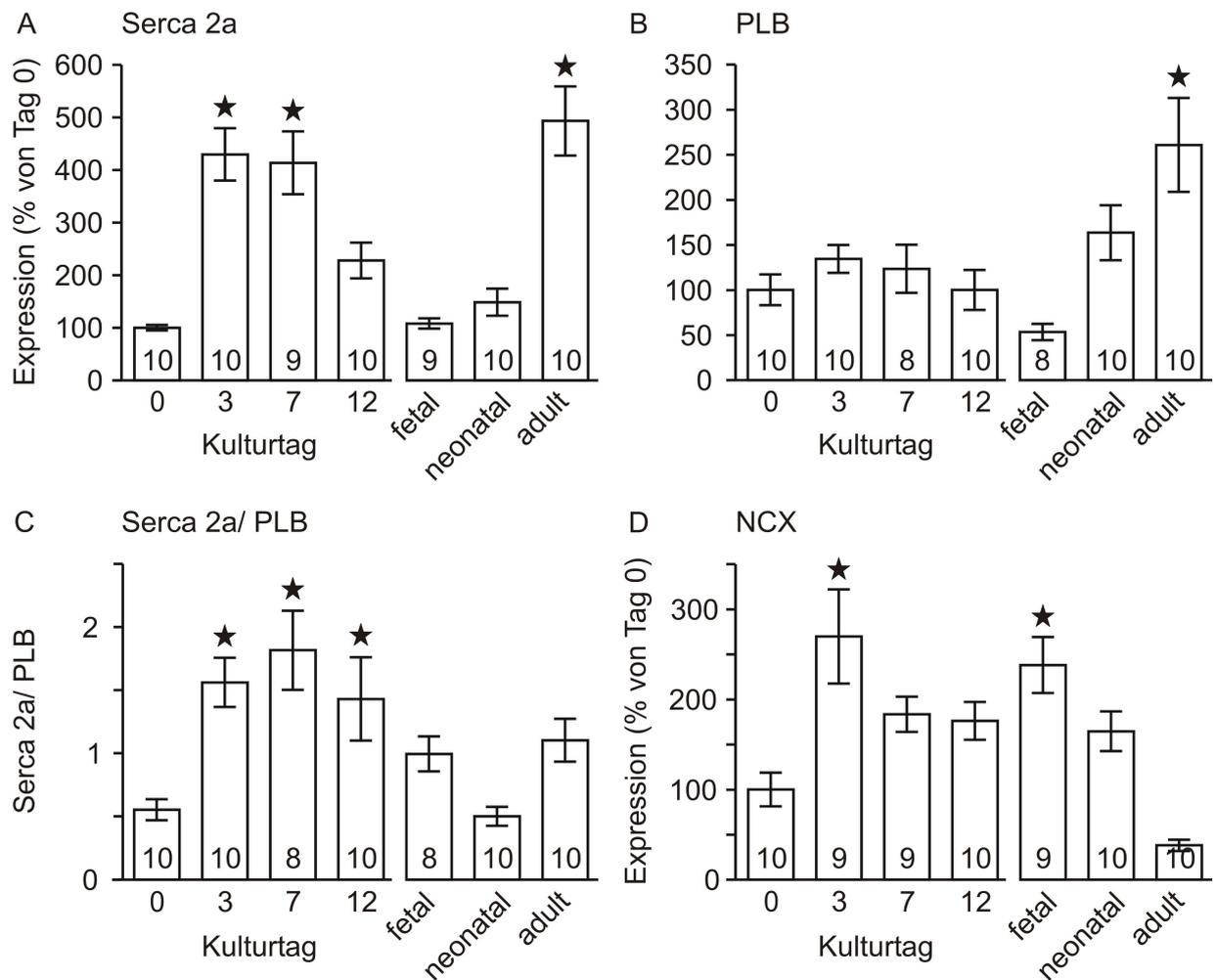


Abbildung 14: Expressionsanalyse von Regulatoren des Kalziumstoffwechsels. Die Expression von (A) SERCA2a, (B) PLB und (D) NCX in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe wurde verglichen. Darüber hinaus wurde der Quotient aus SERCA2a/PLB Expression berechnet (C). Alle Werte wurden GAPDH und CSQ korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

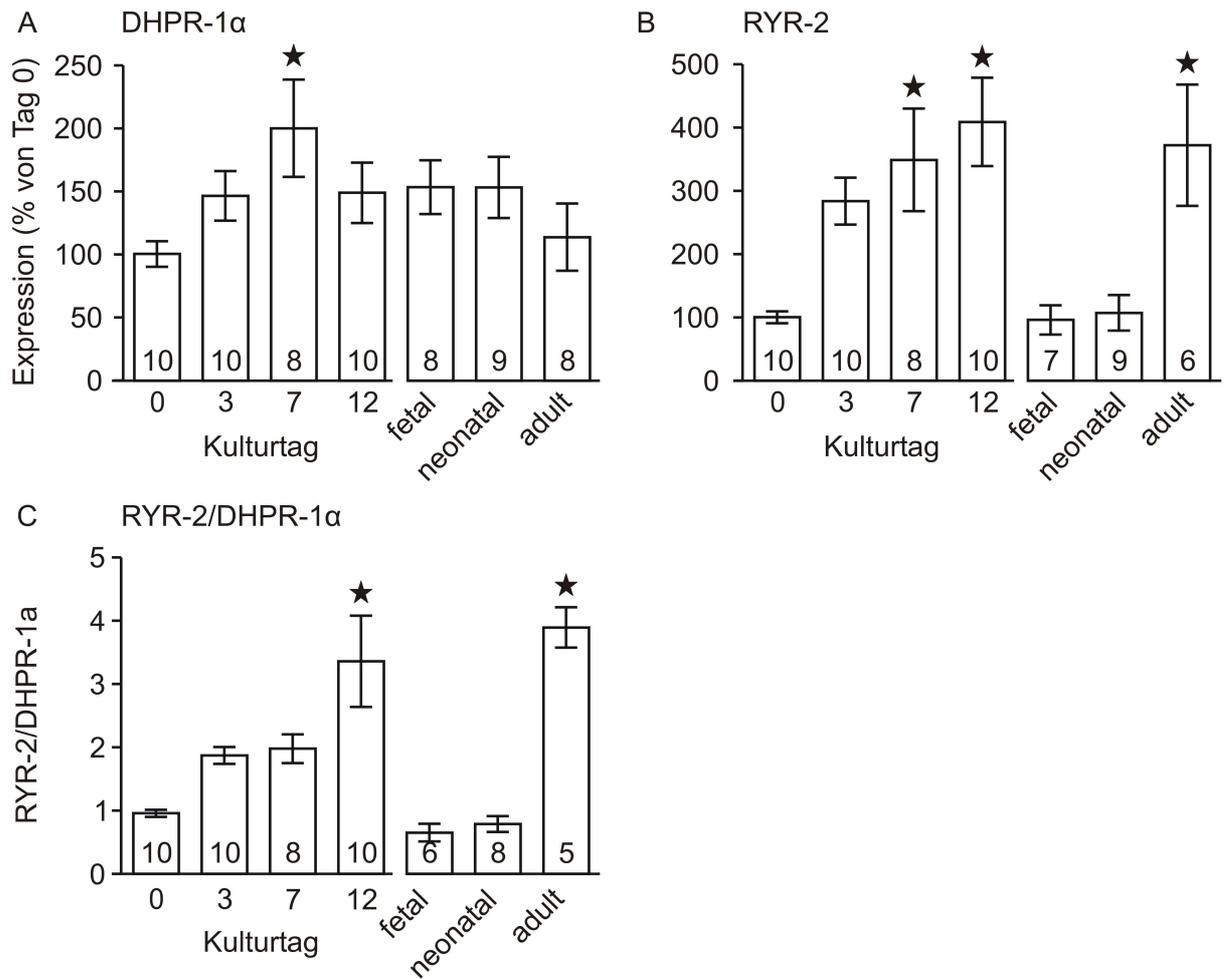


Abbildung 15: Expressionsanalyse von Regulatoren des Kalziumstoffwechsels. Die Expression von (A) DHPR-1 α und (B) RYR-2 in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe wurde verglichen. Darüber hinaus wurde der Quotient aus RYR-2/DHPR-1 α Expression berechnet (C). Alle Werte wurden GAPDH und CSQ korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

mRNA-Konzentrationsanalyse von Apoptose-assoziierten bax und Bcl-2

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine deutliche Reduktion der Zellzahl in EHTs über den Kulturzeitraum von 12 Tagen beobachtet. Dabei fiel auf, dass es insbesondere in der ersten Woche zu einer starken Zellreduktion kam. Grund hierfür könnte ein Zellsterben in EHTs durch Apoptose sein. Konzentrationsanalysen von Apoptosesurrogatmarkern unterstützten diese Hypothese (Abb.16). Während eine erhöhte Konzentration von bax als ein Zeichen für apoptotischen Zelltod gilt, wird Bcl-2 eine gegensätzliche, antiapoptotische Wirkung zugeschrieben (Crompton 2000).

Die bax-Konzentration in EHTs war an den Kulturtagen 3 und 12 mit ~327% gegenüber der Ausgangslage deutlich höher (bezogen auf GAPDH; Abb. 16 A). Bei Bcl-2 hingegen zeigte sich eine um nahezu ein Drittel reduzierte Konzentration an den Kulturtagen 3 und 7 (bezogen auf GAPDH; Abb. 16 B). In nativem Gewebe wurde eine parallel verlaufende Abnahme der Konzentration von bax und Bcl-2 beobachtet. Die Auswertung des Verhältnisses von bax/Bcl-2 zeigte ein deutliches Überwiegen der bax-Konzentration an Tag 3 der EHT-Kultur. Auch im weiteren Verlauf der Kultur blieb ein zu Gunsten von bax verschobener Quotient erhalten, wenn auch auf deutlich niedrigerem Niveau. In nativem Gewebe blieb das Verhältnis von bax/Bcl-2 über den Beobachtungszeitraum konstant und zeigte keine Unterschiede zum Referenzwert aus frisch isolierten Zellen neonataler Ratten.

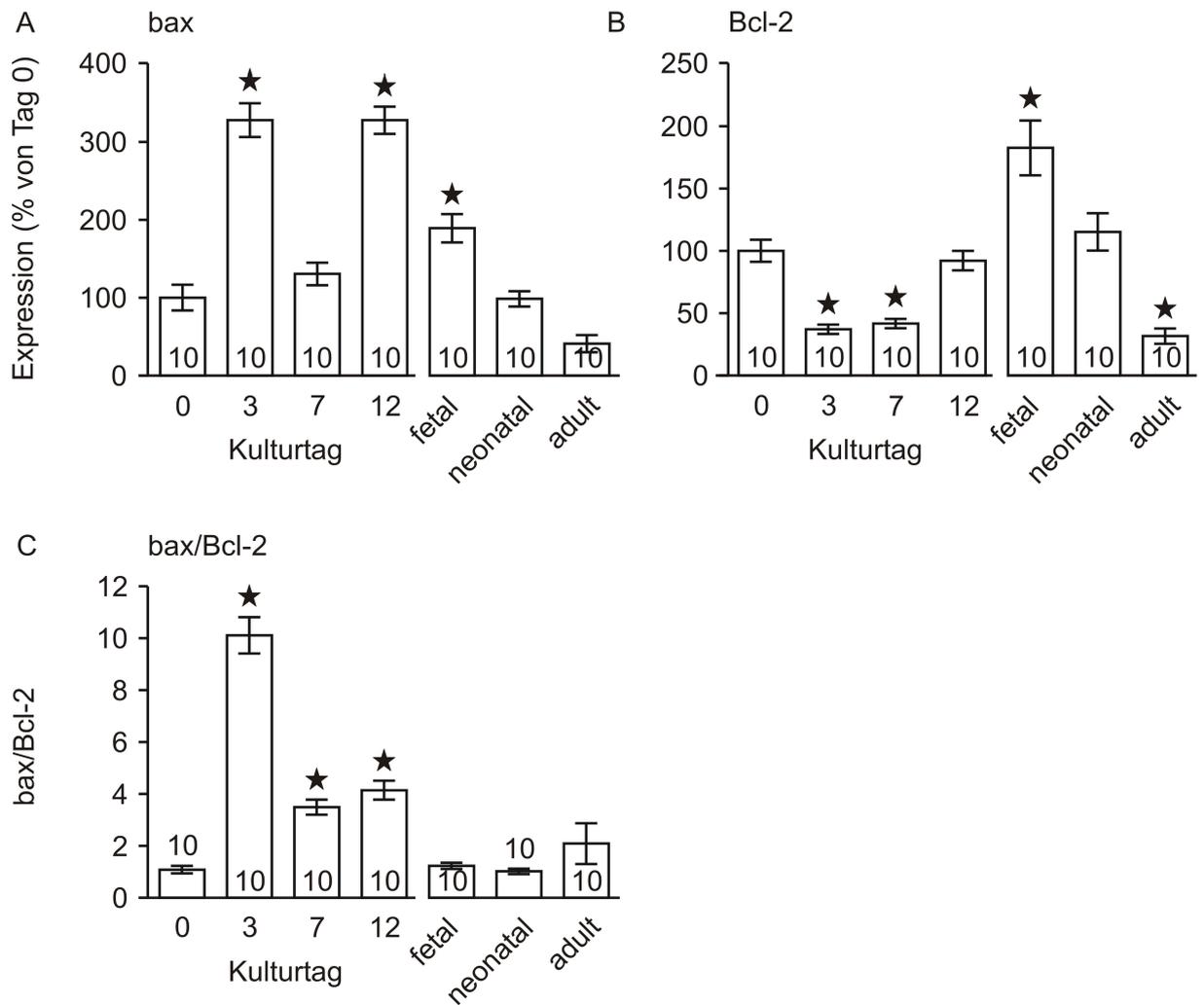


Abbildung 16: Expressionsanalyse von Surrogatmarkern der Apoptose. Die Expression von (A) bax und (B) Bcl-2 in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe wurde verglichen. Darüber hinaus wurde der Quotient aus bax/Bcl-2 Expression berechnet (C). Alle Werte wurden GAPDH korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

mRNA-Konzentrationsanalyse von Matrixumbau-assoziierten Proteinen

Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihre Inhibitoren (TIMP) sind maßgeblich an Umbauprozessen in Geweben beteiligt. In erster Linie verfügen MMPs über Fähigkeiten des enzymatischen Gewebeaufschlusses. Kollagene stellen das Substrat einiger Matrixmetalloproteinasen dar und sind wichtiger Bestandteil des EHT-Grundgerüsts. Einer der wichtigsten Mechanismen zur Kontrolle von Matrixumbauvorgängen und Apoptose ist die Aktivierung von Fibroblasten durch TGF- β 1. Um Hinweise auf die Beteiligung dieser Faktoren an den bereits morphologisch erkennbaren Umbauvorgängen in EHTs zu erhalten, haben wir die mRNA-Konzentrationen von MMP-2, MMP-3, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, Kollagen Typ I und III sowie TGF- β 1 in EHTs und nativem Herzgewebe analysiert.

Die Konzentration von MMP-2 (Gelatinase A) war in EHTs im Vergleich zur Ausgangslage (frisch isolierte Zellen aus Herzen neonataler Ratten) und nativem Gewebe deutlich gesteigert (bezogen auf GAPDH; Abb. 17 A). Das Konzentrationsmaximum konnte an Kulturtag 3 identifiziert werden. Hier zeigten sich Werte, welche im Mittel bis zu 7,8-fach gegenüber der Ausgangslage erhöht waren. In nativem Herzgewebe wurde keine Regulation der MMP-2 Konzentration beobachtet. MMP-3 (Stromelysin) zeigte ein ähnliches Expressionsmuster mit Maximalwerten an Kulturtag 3 (bezogen auf GAPDH; Abb. 17 B): Allerdings war MMP-3 in frisch isolierten Zellen und nativem Herzgewebe kaum nachweisbar (C_t -Werte >40). Somit war es auch nicht möglich, mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Standard-cDNA aus isolierten Kardiomyozyten neonataler Ratten eine Standardgerade zu generieren. Die Validierung des TaqMan-Systems war allerdings bereits im Vorfeld von Dr. Bauer/Prof. Schuppan (Medizinische Klinik I der Friedrich-Alexander-Universität) mit anderen Zellspezies vorgenommen worden. Die Konzentration von MMP-13 (Kollagenase) war in EHTs ebenfalls deutlich erhöht und zeigte Maximalwerte an Kulturtag 3 (bezogen auf GAPDH; Abb. 17 C). Im weiteren Kulturverlauf kam es zu einer Reduktion der MMP-13 Konzentration in EHTs. Ebenso wie MMP-3 war MMP-13 in isolierten Zellen und Herzgewebe (C_t -Mittelwert in adultem Herzgewebe: >40) kaum nachweisbar, so dass auch hier keine Standardgerade erstellt werden konnte. Die Einschränkungen zur Beurteilbarkeit der MMP-13-Transkript-Menge in den unterschiedlichen Versuchsgruppen gelten demnach analog zu MMP-3. MMP-14 (MT1-MMP), sie war ebenfalls deutlich gesteigert und zeigte im gesamten EHT-Kulturverlauf ein konstant hohes Niveau (~ 325 - 424% der Ausgangslage; bezogen auf GAPDH; Abb. 17 D). In nativem Gewebe, und hier besonders in adultem Myokard, wurde MMP-14 gegenüber der Ausgangslage niedriger exprimiert. Die MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 zeigten in EHTs gegenüber isolierten Zellen und nativem Gewebe ein gesteigertes Konzentrationsniveau. Während TIMP-1 eine konstant hohe

Konzentration von 14,7-18,5-fachen Werten gegenüber der Ausgangslage zeigte (bezogen auf GAPDH; Abb. 17 E), konnten für TIMP-2 zunehmend höhere Konzentrationen mit einem Maximum an Kulturtag 12 beobachtet werden (~362% der Ausgangslage; bezogen auf GAPDH; Abb. 17 F).

MMP-2 bzw. MMP-14 bilden in vivo einen Aktivierungskomplex mit TIMP-2 (Hideaki et Woessner 1999, Spinale 2002). Da es sich hierbei um eine definierte stöchiometrische Komplexbildung handelt, wurde das Verhältnis der Konzentration beider MMPs zu TIMP-2 bestimmt (Bernstein et Tyagi 1999, Spinale 2002). Dabei zeigte sich für MMP-2/TIMP-2 ein Maximum an Kulturtag 3 und im weiteren Kulturverlauf eine sukzessive Abnahme des MMP-2-Überschusses bezüglich der Ausgangslage (Abb. 18 A). Verglichen mit dem Konzentrationsniveau von TIMP-2 war die Konzentration von MMP-14 an den EHT-Kulturtagen 3 und 7 ebenfalls erhöht. Letztendlich reduzierte sich das Konzentrationsniveau von MMP-14 jedoch an Kulturtag 12 wieder und so zeigte das Verhältnis MMP-14/TIMP-2, wie bereits zuvor MMP-2/TIMP-2, keinen Unterschied zur Ausgangslage (Abb. 18 B). In nativem Gewebe wurde im Verlauf der Kardiogenese eine Abnahme von MMP-2 und MMP-14 bei einem Überwiegen von TIMP-2 im adulten Gewebe beobachtet.

Die mRNA-Konzentrationen von Kollagen Typ I und Typ III stiegen im Beobachtungszeitraum deutlich an (bezogen auf GAPDH; Abb. 18 C und D) und erreichten Maximalwerte an Kulturtag 12 (Kollagen Typ I: ~3,9-fache; Kollagen Typ III: ~1,9-fache Werte gegenüber der Ausgangslage). Während hierbei ein stetiger Anstieg der Kollagen Typ I-Konzentration in EHTs beobachtet wurde, zeigte sich für Kollagen Typ III eine zwischenzeitliche Abnahme der Konzentration an Kulturtag 3 mit einer Reduktion auf ~32% der Ausgangslage. In nativem Gewebe kam es im Zeitverlauf zu einer deutlichen Abnahme der Kollagen Typ I-Konzentration, während Kollagen Typ III in neonatalem Herzgewebe vermehrt exprimiert wurde.

Die TGF- β 1-Konzentration war während der gesamten EHT-Kultur erhöht. Dabei zeigten sich im Gegensatz zu den anderen Matrixumbau-assoziierten Molekülen zwei Konzentrationsmaxima: Kulturtag 3 (~4,7-fache Werte der Ausgangslage); Kulturtag 12 (~5,6-fache Werte der Ausgangslage; bezogen auf GAPDH; Abb. 18 E). Die TGF- β 1-Konzentration wies dabei deutliche Parallelen zu der mRNA-Konzentration von pro-apoptotischem bax auf (Abb. 16 A). In nativem Herzgewebe zeigten sich keine Unterschiede in der Konzentration von TGF- β 1.

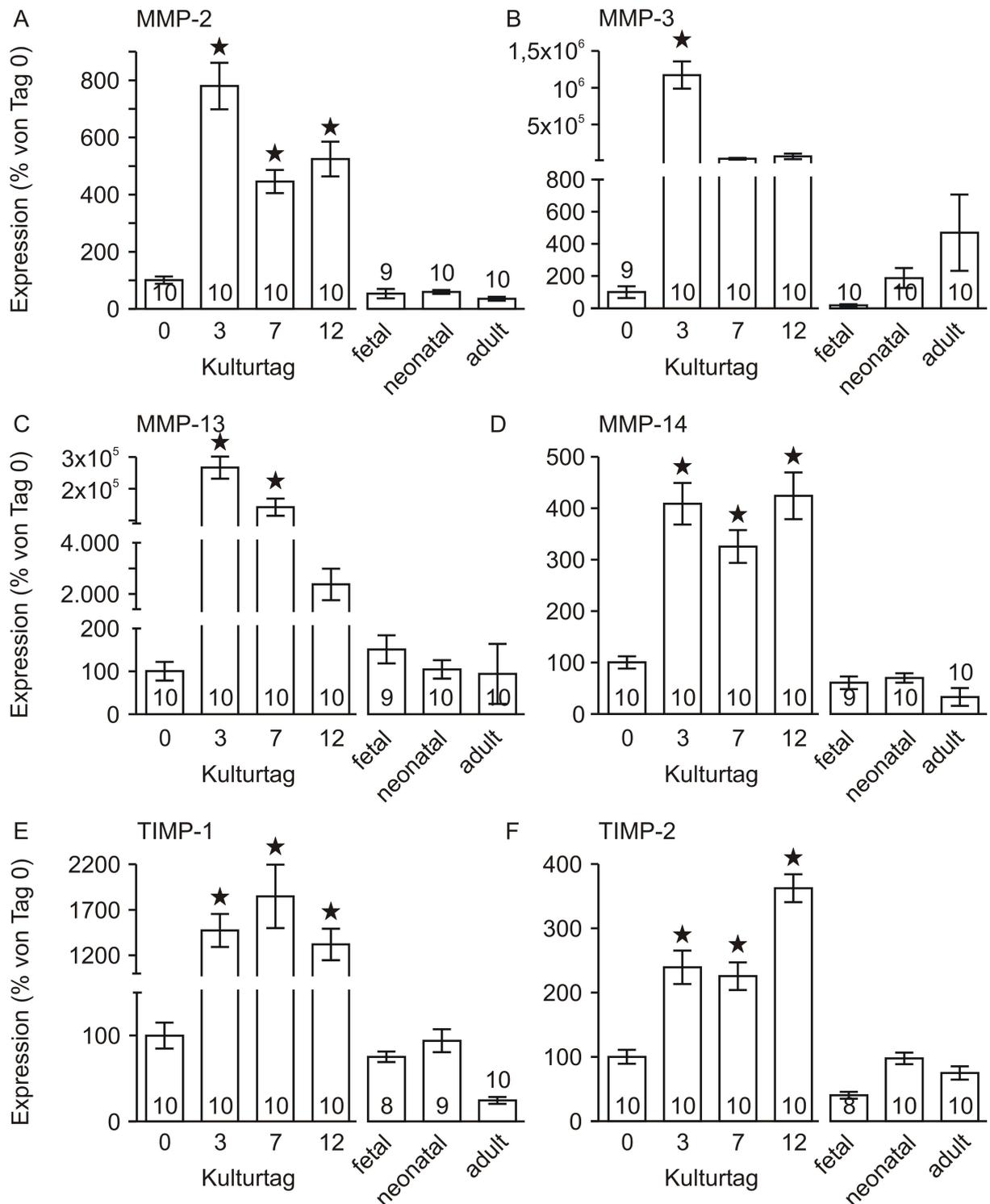


Abbildung 17: Expressionsanalyse von Matrixumbau-assoziierten Proteinen. Die Expression von (A) MMP-2, (B) MMP-3, (C) MMP-13, (D) MMP-14, (E) TIMP-1 und (F) TIMP-2 in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe wurde verglichen. Alle Werte wurden GAPDH korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

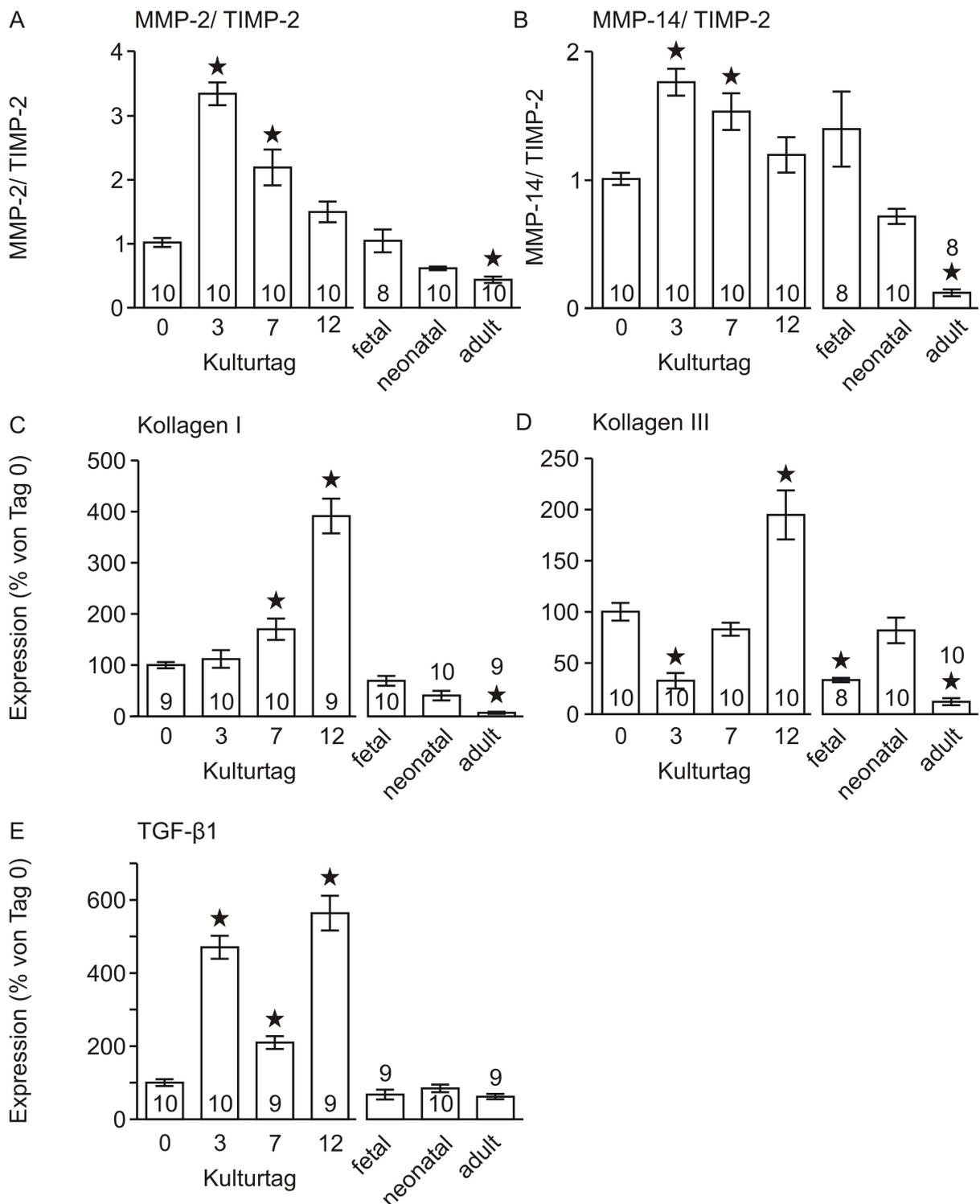


Abbildung 18: Expressionsanalyse von Matrixumbau-assoziierten Proteinen. Der Quotient aus (A) MMP-2/TIMP-2 und (B) MMP-14/TIMP-2 Expression wurde berechnet. Darüber hinaus wurde die Expression von (C) Kollagen Typ I, (D) Kollagen Typ III und (E) TGF-β1 in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe verglichen. Alle Werte wurden GAPDH korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

Transkriptionskonzentrationsanalyse von VEGF-A und VEGF-B

Der Nährstofftransport und die Versorgung mit Sauerstoff sind wichtige Grundvoraussetzungen für die Entwicklung und Funktion von Geweben. Abhängig von dem Bedarf an Nährstoffen und Sauerstoff werden einige Organe stärker (z. B. Herz) und andere weniger (z.B. Knochen) durchblutet. Das Wachstum von Blutgefäßen wird unter anderem durch VEGF-A induziert, welches unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird. Die Funktion von VEGF-B ist dagegen weitestgehend unklar. Die angiogene Potenz von VEGF-B scheint jedoch geringer ausgeprägt als bei VEGF-A. Darüber hinaus wird VEGF-B unter hypoxischen Bedingungen nicht vermehrt exprimiert (Yonekura et al. 1999, Bhardwaj et al. 2003).

In EHTs zeigte sich eine deutlich gesteigerte mRNA-Konzentration von VEGF-A an den Kulturtagen 7 und 12, während in nativem Gewebe keine Veränderungen beobachtet werden konnten (bezogen auf GAPDH; Abb. 19 A). Im Gegensatz dazu war die VEGF-B-Konzentration in EHTs konstant auf ~31-39% der Ausgangslage reduziert (bezogen auf GAPDH; Abb. 19 B). Interessanter Weise zeigte die VEGF-B-Konzentration Parallelen zur CSQ-Konzentration in EHTs (Abb. 12). In nativem Gewebe war die VEGF-B-Konzentration in Proben von fetalem und adultem Gewebe reduziert.

Transkriptionskonzentrationsanalyse von ANF

Pränatal wird ANF sowohl in den Vorhöfen als auch in den Ventrikeln des Herzens exprimiert. Dagegen wird ANF im adulten Herzen vor allem in den Vorhofzellen gebildet (de Bold 1985, Bloch et al. 1986, Mebazaa et Payen 1990). In pathologisch hypertrophiertem Myokard ist die ANF-Konzentration dagegen auch im Ventrikel erhöht (Shubeita et al. 1992).

In EHTs zeigte sich eine deutliche Erhöhung der ANF-Konzentration bis Kulturtag 7. An Kulturtag 12 war die ANF-mRNA-Konzentration verringert und lag nur noch wenig über dem Ausgangsniveau (bezogen auf CSQ; Abb. 20). Natives Gewebe zeigte im adulten Myokard verglichen mit fetalem und neonatalem Gewebe eine stark reduzierte ANF-Konzentration.

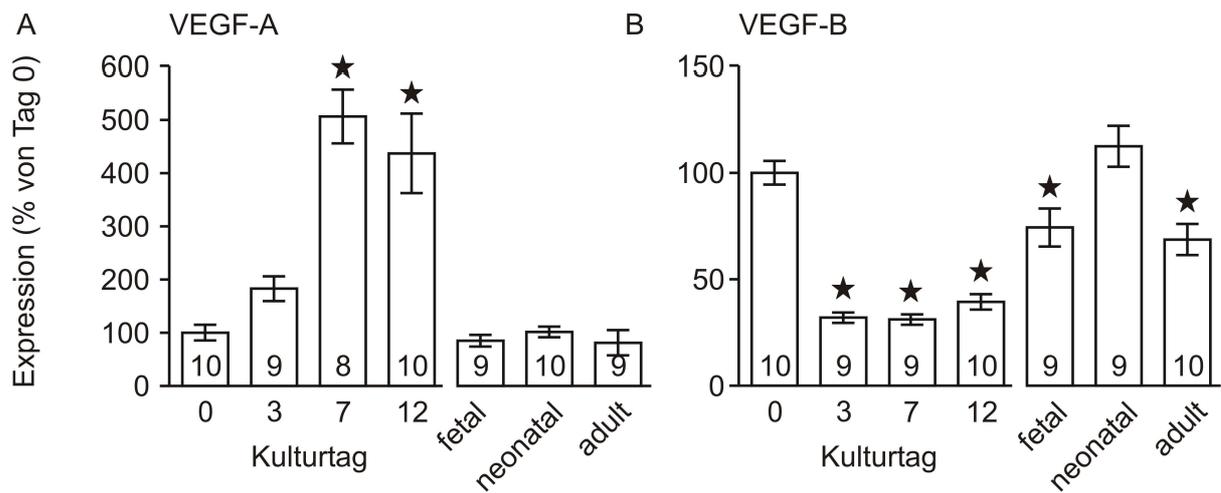


Abbildung 19: Expressionsanalyse von Surrogatmarkern der Vaskulogenese. Die Expression von (A) VEGF-A und (B) VEGF-B in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe verglichen. Alle Werte wurden GAPDH korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test. Dunnett-Test.

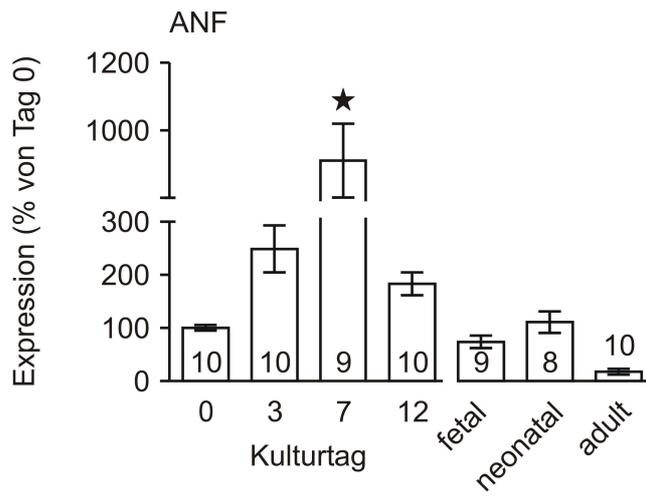


Abbildung 20: Expressionsanalyse von ANF. Die Expression von ANF in frisch isolierten Herzzellen, in EHTs sowie in nativem Gewebe wurden verglichen. Alle Werte wurden GAPDH und CSQ korrigiert und in % auf Tag 0 bezogen. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ vs. Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

Konzentrationsanalyse ausgewählter Proteine per Western Blot-Verfahren

Die mRNA-Konzentrationsanalyse mittels qRT-PCR deutete auf komplexe Differenzierungsprozesse in EHTs hin. Die für die Herzmuskelzellentwicklung besonders wichtigen Proteine (CSQ, Aktin, SERCA2a, Phospholamban) wurden abschließend anhand einer Western-Blot-Analyse gesondert untersucht. Die CSQ-Konzentration diente hierbei als interner Standard. Bereits im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel (30 µg Protein pro Spur bzw. 10, 30 und 50 µg als Standard) lassen sich quantitative Unterschiede im Proteinmuster in EHTs und isolierten Zellen (Tag 0) erkennen. Deutlich sind Banden zu erkennen, die wahrscheinlich Proteine aufzeigen, welche in der EHT-Matrix enthalten sind: Laminin (α , β und γ Untereinheit) und Kollagen Typ I α 3-Kette (~200 kD); Kollagen Typ I α 1-Kette und α 2-Kette (~140 kD). Die Matrix-assoziierte Bande bei 60 kD könnte sich als Elastin-bindendes Protein (EBP) oder/und Albumin (aus Pferdeserum der Konstitutionsmischung) erweisen. Darüber hinaus sind Zell-assoziierte Proteine wie Myosin (~200 kD), Aktin (~42 kD) und Troponin (~21-24 kD) gut zu identifizieren (Abb. 21). Im niedermolekularen Bereich (<20 kD) lassen sich ebenfalls herzmuskelzellspezifische Banden erkennen, die vermutlich Myosin-Leichtketten-Protein und Phospholamban entsprechen.

Die densitometrische Auswertung der Western-Blots (Abb. 22) zeigte eine stetige Abnahme von CSQ auf ~50% der Ausgangslage am EHT-Kulturtag 12 (Abb. 23 A). Der CSQ-korrigierte Aktinegehalt in EHTs war an den Kulturtagen 3 und 7 reduziert, erreichte an Kulturtag 12 jedoch erneut das Ausgangsniveau (Abb. 23 B). Im Gegensatz zur gesteigerten Transkriptkonzentration der SERCA2a zeigte sich auf Proteinebene eine Abnahme des SERCA2a-Proteins auf etwa 10% der Ausgangslage (Abb. 23 C). Wider Erwarten war Phospholamban in frisch isolierten Herzzellen neonataler Ratten nicht zu detektieren. An den Kulturtagen 3 bis 12 zeigte sich hingegen ein deutliches PLB-Signal auf konstantem Niveau (Abb. 23 D).

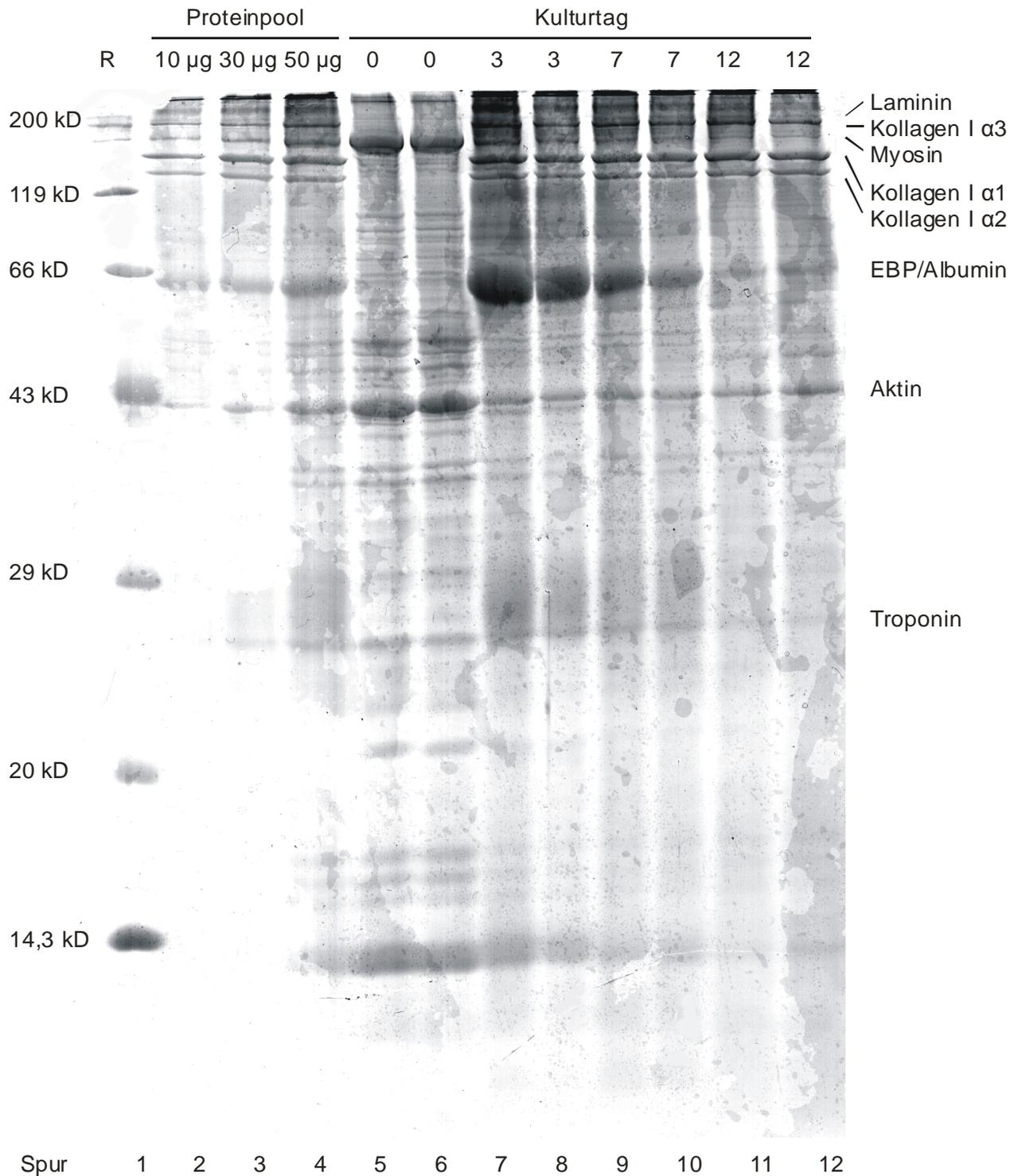


Abbildung 21: Coomassie gefärbtes Polyacrylamidgel nach elektrophoretischer Auftrennung von Zell- und EHT-Proteinen. In Spur 1 wurde ein Proteinstandard aufgetragen (R), die Spuren 2 - 4 enthalten eine Proteinstandardeihe mit 10, 30, 50 µg (Proteinpool aus einem Querschnitt aller verwendeten Proben). Alle weiteren Spuren enthalten Proben (30 µg) frisch isolierter Zellen und EHTs der Kulturstage 3, 7 und 12 (n=2).

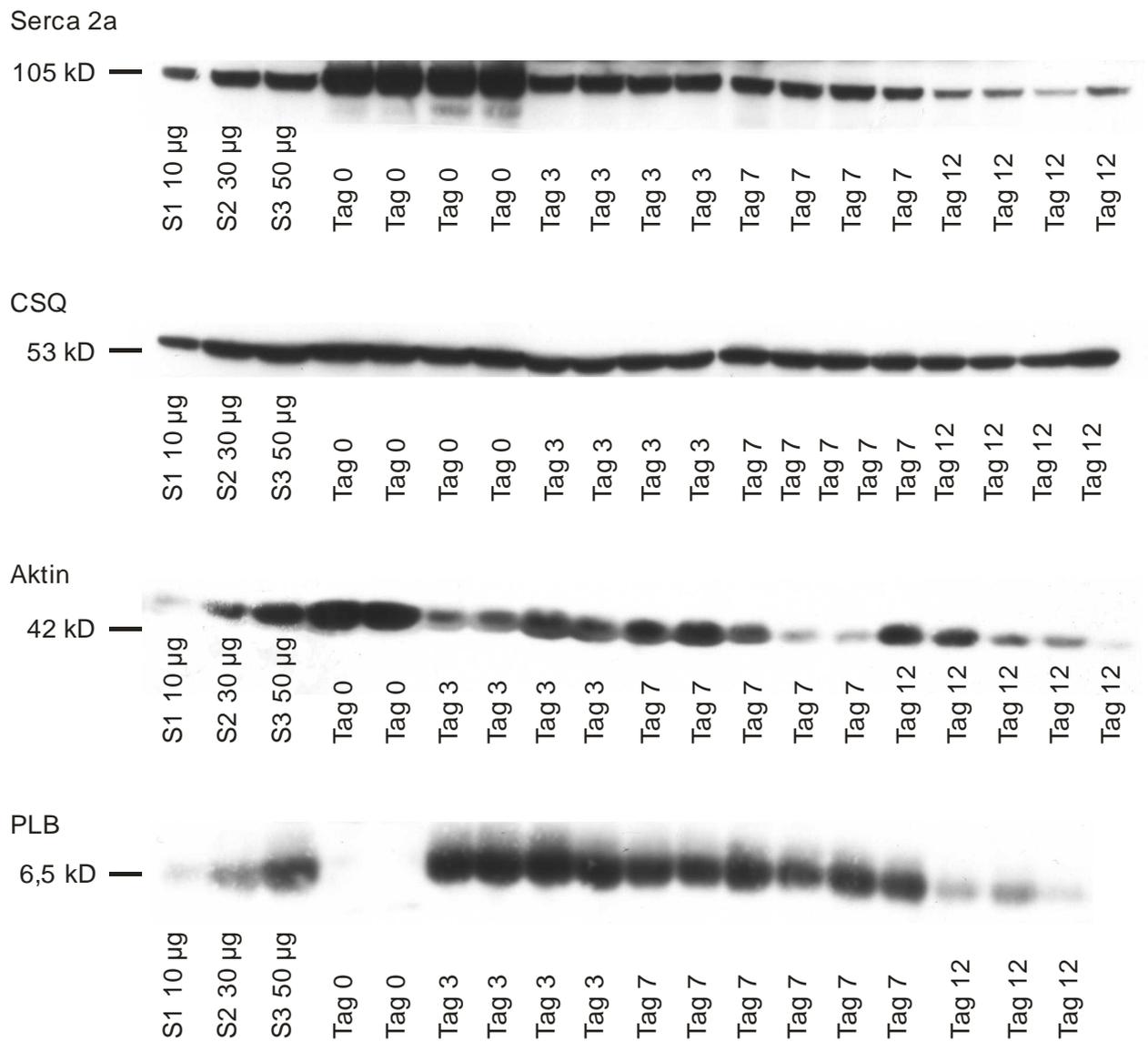


Abbildung 22: Repräsentativer Immunoblot zur Darstellung von SERCA2a, CSQ, Aktin und PLB Expression in EHTs. Verglichen wurde die Expression in frisch isolierten Zellen und EHTs der Kulturstage 3, 7 und 12. Jede Spur des 12% PAGE-Gels enthielt 30 µg Protein der Probe. Das Protein der Standardreihe (S1-S3) setzte sich aus gleichen Anteilen aller Proben zusammen (Proteinpool) und wurde in den Konzentrationen 10, 30, 50 µg aufgetragen.

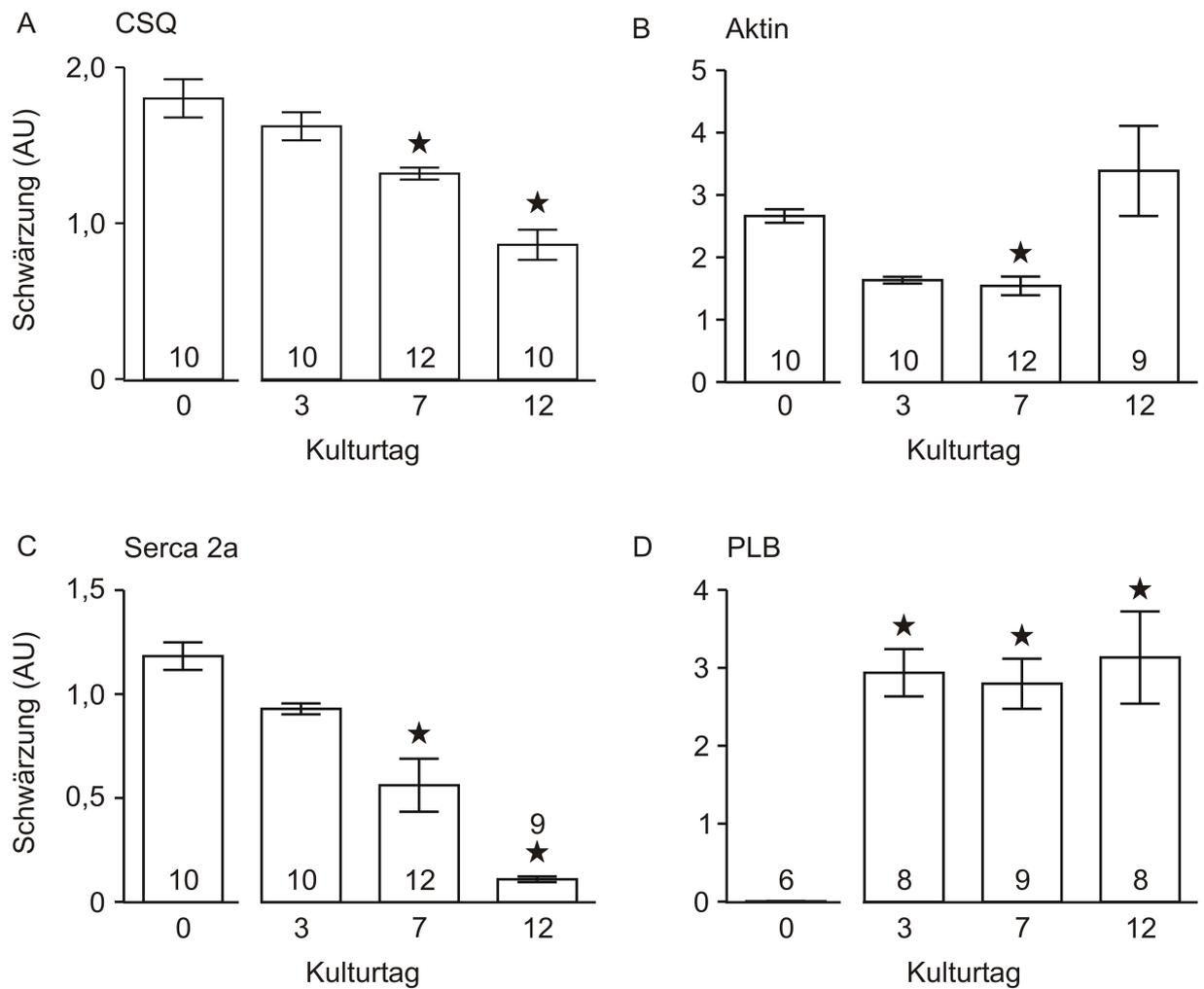


Abbildung 23: Westernblotanalyse ausgewählter Proteine in EHTs. Vergleich der Expression von (A) CSQ, (B) Aktin, (C) SERCA2a und (D) PLB in frisch isolierten Zellen (Tag 0) sowie EHTs der Kulturstage 3, 7 und 12. Die Schwärzungsgrade (*arbitrary units*; AU) wurden densitometrisch ausgewertet. Bis auf CSQ wurden alle Expressionsdaten CSQ-korrigiert. Die Probenzahl ist in den Säulengraphiken jeweils angegeben. ★ $p < 0,05$ gegen Tag 0 per ANOVA mit *post hoc* Dunnett-Test.

Diskussion

Das klassische Konzept der Herstellung künstlicher Organe (*Tissue Engineering*) wurde Anfang der 90er Jahre von Langer und Vacanti formuliert (Langer und Vacanti 1993). Ein zentraler Punkt dieser Technologie ist die Konstruktion einer Gewebematrix und deren anschließende Besiedlung mit Zellen. Dieses klassische *Tissue Engineering*-Konzept hat sich jedoch bisher zur Herstellung künstlicher Herzgewebe nicht durchsetzen können. Wesentliche Probleme bei dieser Technologie sind die Entwicklung nur geringer Kontraktionskräfte, die nur rudimentäre Ausbildung von Gewebestrukturen und die geringe Größe „klassisch“ generierter Gewebekonstrukte (Zimmermann und Eschenhagen 2003). Eine Alternative zu dem klassischen *Tissue Engineering*-Konzept ist der Verzicht auf vorgeformte Matrizes. Dieses gelang durch die Anwendung flüssiger Zell-Matrix-Mischungen und Gussformen zur Herstellung von *Engineered Heart Tissue* (EHT; Eschenhagen et al. 1997, Zimmermann et al. 2000) sowie durch einen gänzlichen Verzicht auf exogenes Matrixmaterial (Shimizu et al. 2002).

EHTs werden bereits als pharmakologisches *in vitro*-Modell und als potenzieller Gewebeersatz *in vivo* verwendet (Zimmermann et al. 2002a, 2002b) und zeigen dabei strukturelle und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard. Über die Entwicklung morphologischer Strukturen in EHTs und die dabei ablaufenden molekularen Mechanismen war bisher jedoch wenig bekannt. Somit war es das Ziel dieser Arbeit, eine detaillierte Analyse der EHT-Entwicklung mittels Licht- und Elektronenmikroskopie, quantitativer RT-PCR und Western-Blot-Verfahren durchzuführen. Darüber hinaus wurde die Transkriptkonzentration in EHTs mit der Transkriptkonzentration im Herzgewebe fetaler, neonataler und adulter Ratten verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die EHT-Entwicklung in einigen Aspekten der Entwicklung von nativem Myokard entsprach. Folgende zentrale Beobachtungen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit gemacht:

Es kam in EHTs zu

- 1) der Ausbildung eines Gewebegeflechts aus anfangs isolierten Kardiomyozyten,
- 2) einer Sarkomerdifferenzierung mit klassischem Bandenmuster,
- 3) einem deutlichen Zellverlust über die Zeit, insbesondere von Kardiomyozyten,
- 4) einer gesteigerten RNA-Konzentration,
- 5) einem Verlust an Gesamtprotein,
- 6) einer gesteigerten Konzentration von Transkripten kardialen Aktins und zu einer Reduktion von Transkripten skelettalen Aktins,
- 7) einer gesteigerten Transkriptkonzentration von Myosin,

- 8) einer verminderten Konzentration von Transkripten der SERCA2a bei unveränderter PLB-Konzentration,
- 9) einer gesteigerten Transkriptkonzentration des kardialen Ryanodinrezeptors,
- 10) einer Konzentrationssteigerung von Transkripten des proapoptotischen Bax bei zugleich verminderter Konzentration des antiapoptotischen Bcl-2 zu Beginn der EHT-Kultur,
- 11) einer deutlichen Steigerung der Konzentration von Transkripten Matrix-modulierender Gene,
- 12) einer im Kulturverlauf gesteigerten Konzentration von VEGF-A-Transkripten,
- 13) einer deutlichen Reduktion der Konzentration der ANF-mRNA unter chronischer Dehnung.

Histomorphologische Veränderungen im EHT-Kulturverlauf

In EHTs kommt es zu einer Ausbildung von hoch spezialisiertem Gewebe, bestehend aus einem Herzmuskelgeflecht, primitiven Kapillaren und einer epi-/endokardialen Auskleidung der EHT-Oberfläche (Zimmermann et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein besonderes Augenmerk auf die strukturelle Entwicklung von Kardiomyozyten in EHTs gelegt. Dabei bestätigte sich die Hypothese, dass die EHT-Kultur eine Differenzierung von Kardiomyozyten unterstützt (Zimmermann et al. 2002). Wie in postnatalem Herzgewebe kommt es auch in EHTs zu hypertrophem Wachstum von Kardiomyozyten (Zunahme der Zellmasse und Zellkerngröße). Trotz einer leichten Steigerung der CSQ-mRNA-Konzentration an Kulturtag 12 im Vergleich zu Kulturtag 7 zeigten sich keine direkten Hinweise auf eine Proliferation von Kardiomyozyten in EHTs.

Während Hinweise auf eine echte mitotische Zellteilung (Karyokinese und Zytokinese) in EHTs fehlten, konnten an EHT-Kulturtag 12 vermehrt binukleäre Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Karyokinese ohne Zytokinese). Auch die im Vergleich zur Zellzahl geringere Abnahme der DNA-Menge pro EHT spricht für eine Zunahme von Zellkernen pro Zelle. Die Häufigkeit von Binukleationen im Herzgewebe wird auch als Index für eine physiologische Hypertrophie (Reifung) herangezogen und erreicht in nativem adultem Myokard der Ratte 85-90% aller Herzmuskelzellen (Clubb und Bishop 1984, Kellermann et al. 1992, Li et al 1996). Weiterhin wird der histomorphologische Eindruck einer Hypertrophie durch die in EHTs an Kulturtag 12 gesteigerte RNA-Konzentration gestärkt. Die Abnahme des Gesamtproteins spricht auf den ersten Blick gegen eine Hypertrophie. Hier ist allerdings anzumerken, dass der exogen zugeführte Proteinanteil (Kollagen Typ I und Matrigel) ein Großteil des gemessenen Gesamtproteins ausmacht. Die Abnahme des Proteingehalts pro

EHT spiegelt dabei vermutlich den Verlust an exogener Matrix wider. Eine Zunahme der endogenen Proteinsynthese in EHTs lässt sich demnach nicht ausschließen und ist vor dem Hintergrund der bereits erwähnten Beobachtungen (Zunahme der Zellgröße und RNA/DNA ratio) wahrscheinlich. Eine Analyse der endogenen Proteinsynthese durch einen ³H-Phenylalanin Einbauversuch könnte zur Klärung dieser Frage in Zukunft beitragen.

Elektronenmikroskopische Befunde bestätigten ebenfalls die Hypothese der Kardiomyozytendifferenzierung und des hypertrophen Wachstums in EHTs. So konnte die Entwicklung von Herzmuskelzellen mit einer differenzierten Sarkomerstruktur ausgehend von zunächst völlig dedifferenzierten Kardiomyozyten beobachtet werden. (Abb. 9). Diese umfangreiche Restrukturierung schritt innerhalb der EHT-Kultur so weit voran, dass an Kulturtag 12 bereits Z-, I-, A- und H-Banden zu erkennen waren. Vereinzelt konnten auch M-Banden als Zeichen einer terminalen Differenzierung in EHTs beobachtet werden (Anversa et al. 1981, Carlsson et al. 1982, Zimmermann et al. 2002).

Etablierung von Calsequestrin als *housekeeping* Gen

Verschiedene *housekeeping*-Gene werden bei der Analyse von RNA- und Proteinkonzentrationen in Zellen zur Standardisierung des Konzentrationsniveaus verwendet. Dabei geht man davon aus, dass die Konzentration entsprechender *housekeeping*-Gene in den untersuchten Zellspezies unabhängig von der Stimulationsbedingung oder Entwicklungsstufe nicht reguliert wird. In der kardiovaskulären Grundlagenforschung ist die Anwendung von GAPDH weit verbreitet.

Auch im Rahmen unserer Untersuchungen war die Transkriptkonzentration von GAPDH bezogen auf die eingestellte Menge RNA in nativem Herzgewebe und in EHTs unterschiedlicher Entwicklung gleich. Auch in einem Zellpool aus definierten Anteilen von Kardiomyozyten und kardialen Nicht-Kardiomyozyten zeigte sich eine konstante GAPDH-Expression (Abb. 5). Da jedoch im Rahmen dieser Arbeit die mRNA-Konzentrationen einer Reihe kardiomyozyten-spezifischer Gene überprüft werden sollten (Tab. 7), und es sich bei EHTs um Mischkulturen aus unterschiedlichen kardialen Zellspezies handelt, überprüften wir die Eignung von Calsequestrin (CSQ) als kardiomyozyten-spezifisches *housekeeping*-Gen mittels quantitativer RT-PCR-Untersuchungen. Zu diesem Zweck wurde parallel zu der Konzentration von GAPDH-Transkripten auch die CSQ-Transkriptkonzentration in definierten Zellmischungen bestimmt. Dabei zeigte sich eine über drei Log-Stufen (~17.500 – 1.750.000 Kardiomyozyten in einem Zellpool aus 2.500.000 Herzzellen) lineare Abhängigkeit der CSQ-Transkriptkonzentration von dem Kardiomyozytenanteil (Abb. 5). Die eingesetzte cDNA-

Menge war in dieser Versuchsserie deutlich niedriger als in Konzentrationsanalysen von EHTs und nativem Gewebe (mittleres C_t -Wert Niveau: 25 vs. 17), was auf eine hohe Sensitivität und Spezifität der CSQ-Detektion hinweist. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob beim Einsatz von mehr cDNA in die Echtzeit-PCR tatsächlich weniger als 17.500 Kardiomyozyten verlässlich detektiert werden können. Zusammengenommen belegen diese Untersuchungen die Eignung von CSQ als kardiomyozyten-spezifisches *housekeeping*-Gen.

Abnahme des Kardiomyozytenanteils in EHTs im Kulturverlauf

Im Gegensatz zu Nicht-Kardiomyozyten stellen Kardiomyozyten eine Population hoch spezialisierter, metabolisch anspruchsvoller und zugleich auch sehr Hypoxie-empfindlicher Zellen dar. Entsprechend ist die Kultur von Nicht-Kardiomyozyten nach enzymatischer Zellisolation aus Herzgewebe unproblematisch. In EHTs kommt es im Kulturverlauf zu einer deutlichen Abnahme der Zellzahl, des DNA-Gehalts und zu einer anscheinend überproportionalen Abnahme der CSQ-Transkript-Konzentration (Abb. 12). Unter der Annahme, dass die CSQ-Konzentration mit der Kardiomyozytenzahl in EHTs korreliert, deutete die überproportionale Abnahme der CSQ-Konzentration auf eine ebenso überproportionale Abnahme von Herzmuskelzellen in EHTs hin. Der „Übersterblichkeit“ von Kardiomyozyten in EHTs liegt vermutlich die bereits oben erwähnte höhere Empfindlichkeit von Kardiomyozyten im Vergleich zu Nicht-Kardiomyozyten zugrunde.

Während Gombosová et al. (1998) eine Zunahme der CSQ-Transkriptkonzentration in adultem Rattenmyokard gegenüber neonatalem Herzgewebe beschrieben (Messung per Northern Blot und Western Blot), zeigte sich im Rahmen dieser Promotionsarbeit eine deutlich niedrigere CSQ-Transkriptkonzentration im Myokard von adulten Wistarratten verglichen mit fetalen oder neonatalen Tieren (Messung per Echtzeit-PCR). Im Gegensatz zu diesen beiden Befunden haben andere Gruppen gezeigt, dass die CSQ-Konzentration im Herzen während der physiologischen Entwicklung wie auch unter Stimulation keiner Regulation unterliegt (Takahashi et al. 1992, Arai et al. 1996, Imanaka-Yoshida et al. 1996). Vor diesem Hintergrund ließe sich die im Rahmen dieser Promotionsarbeit beschriebene niedrigere CSQ-Konzentration in Herzgewebe von adulten verglichen mit neonatalen Ratten wie folgt erklären: (1) Herzmuskelzellen sind im Myokard adulter Ratten größer als im Myokard fetaler bzw. neonataler Ratten (Wachstum durch physiologische Hypertrophie); das heißt: in Gewebeproben mit gleichem Gewicht befinden sich absolut weniger Kardiomyozyten; (2) die CSQ-Transkriptkonzentration pro Herzmuskelzelle ist nicht von der Zellgröße abhängig, d.h. die gleiche Anzahl von Herzmuskelzellen weisen unabhängig von der Zellgröße die gleiche CSQ-Transkriptkonzentration auf (siehe auch die Befunde zur

Etablierung von CSQ als Kardiomyozyten-spezifisches *housekeeping*-Gen); (3) im Gegensatz dazu nimmt der Anteil jener Transkripten, welche für strukturelle (Aktin, Myosin-Schwerketten-Protein u.a.) oder anderweitig spezialisierte (SERCA-2a, PLB, Ryanodin Rezeptor u.a.) Proteine kodieren, parallel mit der Zellgröße zu (Hypertrophie; siehe auch Abbildungen 15-17).

Um kardiomyozyten-spezifische Transkriptkonzentrationen (Tab. 7) in Geweben mit unterschiedlichen Kardiomyozytenanteilen absolut vergleichen zu können, war es nicht ausreichend, eine alleinige Anwendung von GAPDH als *housekeeping*-Gen zur „Beladungskontrolle“ zu verwenden. Vielmehr wurden die Konzentrationen von kardiomyozyten-spezifischen Transkripten zusätzlich auf CSQ als kardiomyozyten-spezifisches *housekeeping*-Gen bezogen. Dadurch wurde der unterschiedliche Kardiomyozytenanteil in dem untersuchten Material berücksichtigt und ein Transkript-„Verdünnungseffekt“ vermieden (v.a. an EHT-Kulturtagen 3, 7 und 12).

Alteration der Konzentration von für sarkomerische Proteine kodierenden Transkripten im EHT Kulturverlauf

Während der Reifung kardialen Gewebes kommt es zu einer Änderung der Anteile unterschiedlicher sarkomerischer Isogene. So zeigt sich zum Beispiel eine Reduktion von α -skelettalem Aktin bei gleichzeitiger Zunahme von α -kardialem Aktin bzw. eine Zunahme von α -Myosin-Schwerketten-Protein bei einer Abnahme von β -Myosin-Schwerketten-Protein im Rahmen der Herzentwicklung (Boheler et al. 1991, O'Neill et al. 1991, Carrier et al. 1992). Dabei werden die größten Veränderungen innerhalb der ersten zwei Lebensmonate beobachtet (Schwartz et al. 1992).

Untersuchungen von Carrier et al. zeigen, dass α -skelettales Aktin innerhalb der ersten Woche postnatal in Nagetieren auf 40% des sarkomerischen Gesamt-Aktins ansteigt. Nach 2 Monaten kommt es zu einer dauerhaften Reduktion unter 5% (Carrier et al. 1992). Dieses Expressionsmuster konnte in dieser Studie auch mittels Echtzeit-PCR-Analysen von kardialem und skelettalem Aktin in nativem Gewebe nachvollzogen werden (Abb. 13). Interessanter Weise zeigten sich in der zwölf-tägigen EHT-Kultur vergleichbare Expressionsmuster, so dass wir von einer *in vitro*-Reifung der Herzmuskelzellen in EHTs analog zur *in vivo*-Situation ausgehen. Die tendenziell höhere Transkriptkonzentration sarkomerischer Aktin-Isoformen aus neonatalem Gewebe war im Vergleich zu isolierten Zellen (Tag 0) im Rahmen dieser Studie besonders auffällig. Ob es im Rahmen der Zellisolation zu einer Degradation von RNA und hier speziell sarkomerischer RNA kam, ist unklar. Parallel zu der

gesteigerten Konzentration von kardialem Aktin zeigte sich ebenfalls eine Zunahme von sarkomerischem Aktin auf Proteinebene zwischen Tag 3 und Tag 12 der EHT-Kultur (Abb. 23). Hier war jedoch eine Differenzierung zwischen kardialer und skelettaler Isoform nicht möglich. Analog zu den qRT-PCR-Untersuchungen wurden auch bei Analysen der Proteinkonzentration in EHTs Proteine aus Zellen neonataler Ratten (Tag 0) zur Kontrolle mitgeführt. Während die Isolation von RNA aus isolierten Zellen, Gewebe und EHTs nicht wesentlich von der umliegenden Matrix beeinflusst wird, ist die Vergleichbarkeit von Proteinhomogenaten aus isolierten Zellen und EHTs schwierig, da ein beträchtlicher Teil der EHT-Proteine aus der extrazellulären Matrix und nicht aus den Herzzellen stammt. Eine Vergleichbarkeit von Proteinhomogenaten aus Zellen und EHTs im Western-Blot Verfahren ist daher nicht gegeben. Zusätzlich zeigten frisch isolierte Zellen eine starke Degeneration der Zellarchitektur, was sich ebenfalls auf die Detektierbarkeit von Einzelproteinen auswirken könnte. Ist das Ziel eine Bewertung des Einflusses der EHT-Kultur auf die kardiomyozytäre Proteinausstattung, sollten daher lediglich Gewebe mit einer ähnlichen zellulären und extrazellulären Zusammensetzung verglichen werden (EHTs an Kulturtagen 3-12).

Nicht-sarkomerisches Aktin, z.B. α -glattmuskuläres Aktin, wird vor allem in glatten Muskelzellen aber auch in Myofibroblasten exprimiert. *In vivo* zeigt sich eine vermehrte Konzentration in fetalem Myokard, die sich innerhalb der ersten Lebenswoche deutlich reduziert (Woodcock-Mitchell et al. 1988, Eppenberger-Eberhardt et al. 1990). Eine entsprechende Reduktion der Transkripte von α -glattmuskulärem Aktin wurde ebenfalls in den Echtzeit-PCR-Analysen deutlich. Im Gegensatz dazu kam es in EHTs nach einer initialen Abnahme bis Kulturtag 7 zu einer deutlichen Konzentrationssteigerung von mRNA des α -glattmuskulären Aktins an Kulturtag 12. Ab Kulturtag 7 wurden EHTs dauerhaft gedehnt, so dass ein Zusammenhang von Dehnung und höherer Transkriptkonzentration von α -glattmuskulärem Aktin wahrscheinlich ist. Ob dieser Anstieg mit einer vermehrten Bildung von Kollagen produzierenden Myofibroblasten einherging, bleibt zu klären. Interessanter Weise zeigte sich parallel zu der gesteigerten Transkriptkonzentration von α -glattmuskulärem Aktin auch eine gesteigerte Konzentration von Kollagen Typ I-Transkripten. Ebenso veranschaulichen die elektronenmikroskopischen Analysen eine vermehrte Ansammlung von endogen gebildetem Kollagen in EHTs.

Myosin ist ein weiterer zentraler Bestandteil von Sarkomeren. Es besteht aus zwei schweren (MHC) und vier leichten Ketten (MLC; Sugiura et al. 1993). An den Enden der schweren Ketten befinden sich die Myosinköpfchen. Das Myosinköpfchen interagiert mit Aktin und verfügt über eine ATPase-Aktivität. Während der Entwicklung kommt es in Nagerherzen zu einer Verschiebung der Expression der Myosin-Isoformen. Während in fetalem Gewebe β -

MHC vermehrt exprimiert wird, ist in adultem Gewebe α -MHC die vorherrschende Form. Dieser Wandel im Expressionsmuster der MHC-Isoformen wurde in einer Vielzahl von Spezies (z. B. Huhn, Ratte, Maus) untersucht (Schwartz et al 1983, De Jong et al. 1990, Wessels et al. 1992, Schwartz et al. 1992, Lyons 1994). Im Rahmen dieser Studie konnte ebenfalls eine deutliche Zunahme der α -MHC-Isoform und eine Abnahme der β -MHC-Isoform im Rahmen der Entwicklung von nativem Rattenherzgewebe beobachtet werden. Verdeutlicht wird die Verschiebung der Isoformen während der Entwicklung in nativem Gewebe durch einen stetig ansteigenden Quotienten aus α -MHC/ β -MHC. Im Gegensatz zu den Befunden aus nativem Gewebe zeigte sich in EHTs eine gleichzeitige Zunahme von α -MHC und β -MHC. Ob die erhöhte Konzentration von Myosin-Transkripten Ausdruck einer generell vermehrten Synthese von sarkomerischen Proteinen ist, oder ob sich die vermehrte β -MHC-Transkriptkonzentration als fetales Entwicklungsmuster interpretieren lässt, ist zu klären. Festzuhalten bleibt jedoch, dass das β -MHC-Niveau in EHTs wie auch in nativem Gewebe klar unter dem Niveau von α -MHC lag. Die relativ vermehrte Konzentration von β -MHC-Transkripten könnte in EHTs zu einer Ökonomisierung der Kontraktionskinetik beitragen (Schwartz et al. 1981). Im Gegensatz zu nativen Rattenherzen zeigen EHTs eine niedrigere Kontraktionsfrequenz (2 Hz vs. 6 Hz). Tatsächlich verfügen große Säuger mit niedriger Herzfrequenz über eine relativ hohe β -MHC-Transkriptkonzentration, was mit einem verminderten Sauerstoffverbrauch einhergeht. Aufgrund der vermutlich hypoxischen Bedingungen in der EHT-Kultur (s. auch die erhöhte VEGF-A-Transkriptkonzentration unter 3.2.7) wäre eine Ökonomisierung der Kontraktionskinetik in EHTs tatsächlich sinnvoll. Diese Hypothese muss in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Alteration von Transkriptkonzentrationen der Regulatoren der kardiomyozytären Kalziumhomöostase

Die Kalziumhomöostase wird in Herzmuskelzellen wesentlich über sarkolemmale und sarkoplasmatische Kalziumtransporter sowie deren Modulatoren reguliert (Abb. 24). EHTs zeigen eine sehr hohe Kalziumempfindlichkeit mit einer EC_{50} von $\sim 0,5$ mmol/l und einem maximalen Effekt (C_{max}) bei 1,6 mmol/l (Zimmermann et al. 2002). Durch Konzentrationsanalyse von Proteinen, die an der Kalziumregulation in Herzmuskelzellen beteiligt sind, sollte einerseits der Differenzierungsgrad der Herzmuskelzellen in EHTs im direkten Vergleich mit nativem Gewebe überprüft werden. Andererseits sollten mögliche Ursachen für die hohe Kalziumempfindlichkeit von EHTs identifiziert werden.

Die Systole beginnt mit einem Kalziumeinwärtstransport über den L-Typ Kalziumkanal, der wiederum die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den

Ryanodinrezeptor (RyR) fördert. Zu Beginn der Diastole wird zytosolisches Kalzium über einen ATP-abhängigen Kalziumtransporter (SERCA) in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert. Die Funktion der SERCA wird über eine Interaktion mit Phospholamban (PLB) reguliert, wobei eine Assoziation von PLB mit der SERCA den Kalziumtransport hemmt. Im phosphorylierten Zustand, z.B. nach Stimulation β -adrenerger Rezeptoren, kommt es zu einer Dissoziation von PLB und der SERCA und damit zu einer gesteigerten Transporterfunktion (Chen et al. 2003). Zusätzlich zur intrazellulären Kalziumspeicherung im sarkoplasmatischen Retikulum kann Kalzium über den sarkolemmalen Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) aus dem Zytosol eliminiert werden. Während die intrazelluläre Kalziumspeicherung in der Diastole und Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in der Systole den zentralen Mechanismus der kardialen Kalziumhomöostase darstellt, ist der sarkolemmale Kalziumtransport im unreifen Myokard von großer Bedeutung (Vornanen 1992, Vetter et al. 1995, Mahony 1996). Negretti et al. konnten zeigen, dass erwachsene Ratten zytosolisches Kalzium zu 80% über die SERCA in das sarkoplasmatische Retikulum transportieren, wohingegen nur 20% über den Natrium-Kalzium-Austauscher nach extrazellulär gelangt (Negretti et al. 1993). Neonatale Ratten sind dagegen vor allem auf einen Influx extrazellulären Kalziums angewiesen, da sie nur über ein rudimentär ausgebildetes, sarkoplasmatisches Retikulum mit geringer Speicherkapazität verfügen (Vornanen 1992).

Wie erwartet, zeigte sich auch in dieser Arbeit in nativem Herzgewebe ein kontinuierlicher Anstieg der Transkriptkonzentration von SERCA, PLB und RyR bei gleichzeitiger Abnahme von NCX im Verlauf der Entwicklung. In EHTs war die Konzentration der SERCA-mRNA an den Kulturtagen 3 und 7 auf das Niveau von adultem Myokard gestiegen. An Kulturtag 12 zeigte sich jedoch eine Reduktion von SERCA-Transkripten im Vergleich zum Maximalwert an Kulturtag 7. Dabei war das Niveau an Kulturtag 12 im Vergleich zu adultem Myokard vermindert und zu frisch isolierten Zellen (Tag 0) erhöht. Inwiefern diese Änderung der Konzentration in einem Zusammenhang mit der Kultur von EHTs unter chronisch mechanischer Dehnung nach Kulturtag 7 steht, bleibt zu klären. Im Gegensatz zur SERCA war die Konzentration von PLB-Transkripten in EHTs über den Beobachtungszeitraum unverändert und lag dabei deutlich unter dem Niveau des adulten Herzgewebes. Auf Proteinebene zeigten sich eine klare Abnahme der SERCA-Konzentration sowie eine konstante PLB-Proteinmenge an den Tagen 3-12 der EHT-Kultur (Abb. 23 C und D). Dem entgegen war PLB in frisch isolierten Zellen (Tag 0) nicht nachweisbar, was sich eventuell durch Zell-/Proteindegeneration nach enzymatischer Isolation erklären ließe (s. obige Diskussion zur Bewertung von Proteinkonzentrationen in frisch isolierten Zellen und EHTs). Ebenso ist die Interpretation der SERCA-Proteinmenge in frisch isolierten Zellen schwierig.

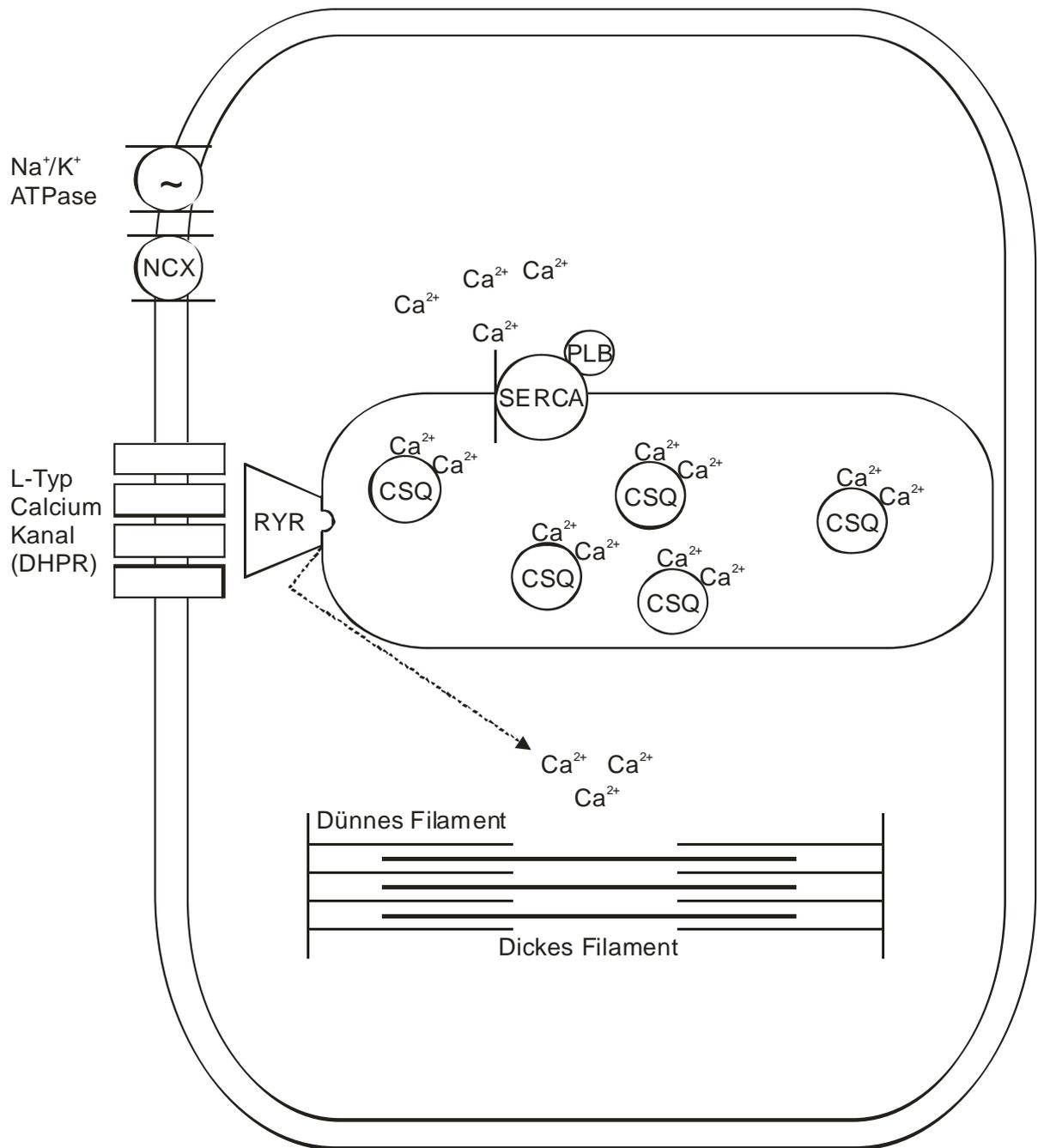


Abbildung 24: Schematische Darstellung molekularer Mechanismen der Kalziumhomöostase in Herzmuskelzellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von CSQ, SERCA2a, PLB, NCX, RYR und DHPR in frisch isolierten Herzzellen neonataler Ratten (Kulturtag 0), in EHTs an den Kulturtagen 3, 7 und 12 sowie in nativem Herzgewebe fetaler, neonataler und adulter Ratten untersucht und verglichen. Abbildung modifiziert nach Eschenhagen und Weil (1998).

Auch eine Polyacryamidgelelektrophorese-Analyse von Gesamtproteinhomogenaten aus Zellen und EHTs verdeutlichte, dass ein Großteil des EHT-Gesamtproteins durch exogen zugefügte Matrix gebildet wurde (Abb. 21). So lässt sich aus diesen Befunden ableiten, dass die Menge der herzmuskelspezifischen Proteine bei gleichem Niveau zwischen Tag 0 (isolierte Zellen; ca. 1.250.000 Kardiomyozyten pro 2.500.000 Zellen, keine Matrixproteine) und Tag 3 (EHT; ca. 130.000 Kardiomyozyten pro 1.600.000 Zellen plus Matrixproteine) deutlich erhöht ist. Unter Berücksichtigung dieser Überlegung spiegelt die Abnahme der SERCA-mRNA in EHTs von Tag 3-12 tatsächlich die PCR-Daten wider. Ergebnisse aus Studien, welche den zeitlichen Zusammenhang der Konzentration von Transkripten und ihrer korrespondierenden Translationsprodukte untersuchten, lassen darauf schließen, dass vor allem die SERCA2a einer translationalen Regulation unterliegt. So konnte gezeigt werden, dass bei Phospholamban ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen Transkriptkonzentration und Induktion der Proteinsynthese besteht. Bei SERCA2a-Proteinen zeigte sich eine Steigerung erst Tage nach dem Konzentrationsanstieg von Transkripten (Hu et al. 1995). Die Tatsache, dass mehrere Arbeitsgruppen Phospholamban in neonatalem Rattenmyokard nachweisen konnten (McTiernan et al. 1997, Gambosová et al. 1998, Yokoyama et al. 1999), spricht für das Vorliegen eines Isolierungsartefakts in dieser Studie. Die Hypothese einer ausgeprägten proteolytischen Degradation im Rahmen der Zellisolation wird zusätzlich durch elektronenmikroskopische Beobachtungen gestützt. Hier zeigte sich eine massive Degeneration intrazellulärer Strukturen, wobei nur schwer abschätzbar ist, ob und wenn ja, welche Proteine davon betroffen sind. Neben EHT-Langzeitstudien, welche einen zeitlichen Zusammenhang von Transkription und Translation untersuchen sollten, muss eine Analyse der Proteinkonzentration aus EHTs und physiologisch entwickeltem Rattenmyokard unterschiedlicher Entwicklungsstufen analog zu den bereits im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsstudien erfolgen.

Die Konzentration von NCX-Transkripten war entgegen den Ergebnissen aus nativem Gewebe auch in 12 Tage alten EHTs deutlich erhöht. Dagegen war die Konzentration von Transkripten der α -Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors (L-Typ Kalziumkanal) und RyRs in EHTs vergleichbar mit der Konzentration in adultem Rattenmyokard. Zusammengenommen deuteten die Expressionsdaten auf einen gemischt adulten (DHPR, RyR) und unreifen (SERCA, PLB, NCX) Phänotyp hin. Ob dieser für die hohe Kalziumsensitivität von EHTs verantwortlich ist, bleibt zu klären.

Induktion von Apoptose im Rahmen der EHT-Kultur

Der programmierte Zelltod (Apoptose) geht mit einer Aktivierung unterschiedlicher proteolytischer und DNA-degenerierender Moleküle einher. Das Endergebnis ist die Fragmentierung nukleärer DNA bei funktioneller Integrität der Zellmembran. Von zentraler Bedeutung ist die Aktivierung proteolytischer Enzyme: Caspasen, „*Interleukin-1beta-Converting Enzyme*“ (Bromme und Holtz 1996, Yue et al. 1998). Als Surrogatmarker für einen apoptotischen Zelltod dient unter anderem die Konzentration von Transkripten des pro-apoptotischen bax und anti-apoptotischen Bcl-2 (Crompton 2000, Dong et al. 2003, Willis et al. 2003). Der Mechanismus der Apoptoseinduktion durch bax ist sehr komplex und bis heute nur in Teilen verstanden. Bcl-2 ist ein Bestandteil der Mitochondrienmembran und kann bax binden. Die Interaktion von bax und Bcl-2 führt zu einer Störung der Barrierefunktion der äußeren Mitochondrienmembran. Durch die von bax/Bcl-2-Komplexen gebildeten Poren in der Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung verschiedener Moleküle, z. B. Cytochrom-c (Saikumar et al. 1998, Kuwana et al. 2002, Roucou et al. 2002). Dieses aktiviert in Verbindung mit Apaf-1 und Caspase 9 die Pro-Caspase 3. Die Caspase 3 gilt als Effektorcaspase der Apoptose und spaltet in aktiviertem Zustand eine große Anzahl essentieller Zellbestandteile. Als mögliche Induktoren einer durch bax vermittelten Apoptose werden Hypoxie (Dong et al. 2003) und Dehnungsreiz diskutiert (Liao et al. 2004). Dabei gilt ein Ungleichgewicht von bax im Verhältnis zu Bcl-2 als Anzeichen einer Apoptoseinduktion (Xie et al. 2001, Childs et al. 2002, Suzuki et al. 2003).

Im Rahmen dieser Studie zeigte sich in nativem Gewebe eine parallele Reduktion der Transkripte von bax und Bcl-2 mit einem gleich bleibenden Verhältnis von bax zu Bcl-2. Diese Ergebnisse sprechen für ein ausgewogenes Verhältnis von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Einflüssen, die somit unabhängig von der Reife des Gewebes wären. Dagegen war die bax-Transkriptkonzentration an den EHT-Kulturtagen 3 und 12 deutlich erhöht, während die Bcl-2-Transkriptkonzentration an Kulturtag 3 und 7 erniedrigt war. Daraus leitet sich eine deutliche Verschiebung der bax/Bcl-2-Ratio zu Gunsten von bax vor allem zu Beginn der EHT-Kultur ab (Abb. 16). Das Überwiegen von bax in EHTs an Kulturtag 3 kann als Zeichen einer Apoptoseinduktion gewertet werden. Die anschließende Reduktion der bax/Bcl-2-Ratio weist darauf hin, dass sich die pro-apoptotische Induktion zwar reduzierte, jedoch auch im weiteren Verlauf der EHT-Kultur offensichtlich über dem Niveau von nativem Myokard blieb. Während zu Beginn der Kultur vermutlich der Zellschaden nach der enzymatischen Isolation ein wesentlicher Faktor für den apoptotischen Zelltod in EHTs sein kann, kommt im weiteren Verlauf vor allem Hypoxie als Apoptoseauslöser in EHTs infrage. Tatsächlich deutet die erhöhte VEGF-A-Transkriptkonzentration in EHTs, v. a.

während Kulturtag 7 und 12 (Abb. 19), auf eine Minderversorgung mit Sauerstoff in EHTs hin. Zur Klärung dieser Hypothese wäre eine vergleichende Analyse unter hyper- und hypobaren Sauerstoffbedingungen denkbar. Darüber hinaus muss die Analyse weiterer Marker einer Apoptose (z.B. Caspase 3-Aktivierung oder Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase [PARP]-Spaltung) herangezogen werden, um tatsächlich den Befund einer Apoptoseinduktion in EHTs zu erhärten.

Matrixumbau während der EHT-Kultur

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) umfassen eine Gruppe von proteolytischen Enzymen, die wesentlich an Matrixumbauvorgängen im Rahmen von diversen biologischen Prozessen beteiligt sind (Embryonalentwicklung, Organmorphogenese, Wachstum von Nerven, Ovulation, Wundheilung, Angiogenese, Apoptose). Sie gehören zu einer heterogenen Gruppe zinkabhängiger Endoproteasen mit zum Teil überlappender Substratspezifität (s. Tab. 9) und werden mit Ausnahme der membranständigen Matrixmetalloproteinasen (MT-MMPs) als Proenzyme sezerniert (Matrisian 1992, Birkedal-Hansen et al. 1993, Stetler-Stevenson et al. 1993, Kähäri et Saarialho-Kere 1999).

Name	Bezeichnung	Substrat/Funktion
Gelatinase A	MMP-2	Gelatin, Kollagen I, IV, V, VII
Stromelysin 1	MMP-3	Fibronectin, Laminin, Kollagen III, IV, IX und allgemeine Aktivierung von MMPs
Kollagenase 3	MMP-13	Kollagen I, II und III
MT1-MMP	MMP-14	Kollagen I, II, III, Fibronectin, Laminin-1, Aktivierung von proMMP-2 und proMMP-13

Tabelle 9: Matrixmetalloproteinasen (nach Spinale 2002)

Bis auf das membranständige MT1-MMP, welches bereits intrazellulär aktiviert wird, werden diese Proenzyme durch Spaltung eines N-terminalen Fragments extrazellulär aktiviert (Matrisian 1992). Die Funktion von MMPs wird durch spezifische Inhibitoren (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) gehemmt. Eine Balance von MMPs und TIMPs ist für physiologische Matrixumbauprozesse essenziell, während eine Dysbalance wesentlicher Bestandteil pathologischer Gewebeumbauprozesse sein kann. Ein kritisches Gleichgewicht von MMPs und TIMPs ist für die physiologische Beschaffenheit von Gewebe notwendig. Vier

verschiedene TIMP-Spezies konnten bisher identifiziert werden. Diese binden aktivierte MMPs im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 (Spinale 2002). Im gesunden Gewebe beträgt der MMP/TIMP-Quotient $< 0,15-0,6$. Im Endstadium der Herzinsuffizienz steigt dieser auf bis zu 5-6, während eines Myokardinfarkts sogar auf 6-7 an (Bernstein und Tyagi 1999). Häufig ist die Ausbildung von MMP-TIMP-Proteinkomplexen für eine Aktivierung und Deaktivierung von MMPs notwendig. So bildet pro-MMP-2 einen trivalenten Komplex mit MMP-14 (Synonym: MT1-MMP) und TIMP-2. In diesem Komplex kommt es durch die enzymatische Spaltung eines N-terminalen Fragments von pro-MMP-2 zu dessen Aktivierung. Nicht-komplexiertes, freies TIMP-2 führt dagegen durch eine kovalente Bindung an freies MMP-2 und MMP-13 zu dessen Inaktivierung (Spinale 2002, Bernardo und Fridman 2003).

Während der Herzentwicklung unterliegt die extrazelluläre Matrix Prozessen der Erneuerung und Umgestaltung. Darüber hinaus findet im adulten Herzen bei Herzinsuffizienz und nach Herzinfarkt „*remodelling*“ statt. Mehrere Studien belegen ein Ansteigen von Transkripten der Metalloproteinasen nach Herzinfarkt. Hypoxie und ein vermehrtes Auftreten von Sauerstoffradikalen scheinen Induktoren dafür zu sein (Cleutjens et al. 1995, Shimizu et al. 1998, Romanic et al. 2001, Siwick et al. 2001). So konnten Cleutjens et al. zeigen, dass es zwei Tage nach einem Herzinfarkt zu einem Ansteigen der Kollagenaseaktivität im linken Ventrikel der Ratte kam (Cleutjens et al. 1995). Spitzenwerte wurden hier 7 Tage nach Infarkt erreicht. Anschließend kam es zu einer kontinuierlichen Reduktion der Kollagenaseaktivität. Über eine Blockade β -adrenerger Rezeptoren und eine dadurch geminderte MMP-2 Expression kann nach Herzinfarkt die Herzfunktion verbessert werden (Bernstein und Tyagi 1999). Des Weiteren führt eine Blockade der Matrixmetalloproteinasen durch die Breitspektrum-Inhibitoren CP-471 und CP-474 (Pfizer) zu weniger „*Postinfarkt-Remodelling*“ und zu einer abgeschwächten Dillatation des linken Ventrikels (Rhode et al. 1999). Neben einer vermehrten Expression bei Herzinfarkt konnte ein Anstieg von MMPs beim Übergang der kompensierten Herzinsuffizienz in das dekomensierte Stadium gezeigt werden (Dolgilevich et al. 2001, Iwanaga et al. 2002, Nishikawa et al. 2003). Peterson et al. (2001) demonstrierten, dass pathologischer Gewebeumbau sowie eine linksventrikuläre Dillatation in Herzen „Spontan-Hypertensiver-Herzinsuffizienzratten“ (SHHF) durch Inhibition von Matrixmetalloproteinasen aufgehalten werden können.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit zeigte sich eine deutliche Zunahme vor allem von MMP-3 (1.000-fach erhöht im Vergleich zur Ausgangslage) und MMP-13 (10.000-fach erhöht). Diese Transkripte waren in Herzzellen neonataler Ratten allerdings kaum nachweisbar, so dass von einer *de novo*-Induktion eher als von einer Erhöhung relevanter basaler Transkriptmengen auszugehen ist. Dagegen zeigten die für MMP-2, MMP-14, TIMP-1 und

TIMP-2 kodierende Transkripte eine Zunahme der auch basal detektierbaren Transkriptmenge und eine im Vergleich zu nativem Gewebe deutlich höhere Konzentration in EHTs (Abb. 17). Bei Berechnung des MMP-2/TIMP-2-Quotienten (Abb. 18) fiel auf, dass dieser in EHTs eindeutig über dem durchschnittlichen MMP-2/TIMP-2-Quotienten in nativem gesunden Gewebe lag ($3,3 \pm 0,5$ in EHTs von Tag 3 vs. $0,5 \pm 0,2$ in adultem nativem Gewebe). Diese gegenüber TIMP-2 gesteigerte Konzentration von Transkripten des MMP-2 vor allem zu Beginn der EHT-Kultur (Tag 3) könnte ein Hinweis auf einen vermehrten Matrixabbau in diesem Zeitraum sein. Nach Tag 3 der EHT-Kultur nahm der Quotient MMP-2/TIMP-2 auf 1,5 ab und erreichte damit fast das Ausgangsniveau. Unter Berücksichtigung der Regulationsmechanismen (s. o.) könnte auch das überproportional exprimierte MMP-14 als indirektes Indiz für eine vermehrte MMP-2 Aktivierung gewertet werden. Hierfür spricht der gesteigerte Quotient MMP-14/TIMP-2 in den Tagen 3 und 7 der EHT-Kultur (Abb. 18). Andererseits muss berücksichtigt werden, dass sich die Bedeutung von MMP-14 nicht allein auf die Aktivierung von MMP-2 beschränken lässt. So wurde auch eine Aktivierung von MMP-13 sowie die Fähigkeit der proteolytischen Spaltung von Kollagen I, II, III, Fibronectin und Laminin-1 beschrieben (Tab. 9; Spinale 2002).

In der Entwicklung von nativem Herzgewebe konnte in Studien gezeigt werden, dass es zu einer vermehrten Expression von MMP-13 kommt (Ratajska et Cleutjens 2002). Bekanntes Substrat von MMP-13 ist fibrilläres Kollagen (Etoh et al. 2000). Mögliche Ursache für die gesteigerte Expression könnte demnach ein vermehrtes Vorkommen von fibrillärem Kollagen zu einem späteren Zeitpunkt der Herzentwicklung sein (Jackson et al. 1993). Das Expressionsmuster von MMP-13 in EHTs könnte demnach Ausdruck eines gesteigerten Kollagenabbaus sein. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Proteinanalyse legt tatsächlich den Verdacht einer starken Abnahme der zur Herstellung verwendeten Kollagenmatrix nahe (s. o.).

MMP-3 wird in physiologischem Gewebe nicht bzw. kaum exprimiert (Romanic et al. 2001). Tatsächlich waren basale C_t -Werte für MMP-3 kaum nachweisbar (C_t -Wert Tag 0: 40 ± 4 , neonatal: 41 ± 1). In EHTs war mRNA von MMP-3 jedoch deutlich nachweisbar (C_t -Wert Tag 3: 28 ± 1), was formal eine Zunahme der MMP-3 Transkriptkonzentration um den Faktor von 10.000 bedeutet. Als mögliche Ursache für die MMP-3 Induktion kommt eine Hypoxie in EHTs in Frage (Romanic et al. 2001). Für die Hypothese einer Hypoxie in EHTs sprechen auch Ergebnisse der Apoptosesurrogatmarker und der VEGF-A-Analyse (s. dazu Ergebnisse unter 3.2.5 und 3.2.7).

Neben den MMPs und TIMPs ist TGF- β 1 ein Schlüsselregulator des Matrixumbaus und der Kollagensynthese (Lijnen et al. 2000, Kuwahara et al. 2002, Chen et al. 2003, Zhang et al. 2004). Eine Expressionssteigerung von TGF- β 1 wird nach Herzinfarkt und unter physiologischer Hypertrophie durch Dehnung beobachtet (Shimizu et al. 1998, Van Wamel et al. 2002). Als Auslöser werden humorale Faktoren wie Isoprenalin, Noradrenalin und Angiotensin II diskutiert (Masson et al. 1998). Unter gesteigerter TGF- β 1-Expression kommt es zu einer Reaktivierung eines fetalen Expressionsmusters. So konnte gezeigt werden, dass es unter TGF- β 1 zu einer gesteigerten Expression von α -skelettalem und α -glattmuskulärem Aktin in Herzmuskelzellkulturen neonataler Ratten kommt (Parker et al. 1991). Darüber hinaus kommt es zu einer Mehrexpression von β -MHC bei konsekutiv geminderter Expression von α -MHC (Parker et al. 1991, Zhang et al. 1999).

Im Rahmen unserer Untersuchungen sahen wir keine Unterschiede in der Konzentration von TGF- β 1-Transkripten in Herzgewebe unterschiedlicher Entwicklungsstufen. Damit deckt sich dieser Befund mit Beobachtungen von Annoni et al. (1998). In EHTs vollzog sich dagegen ein erheblicher Konzentrationsanstieg von Transkripten an den Kulturtagen 3 und 12. Dieser Anstieg könnte im Gegensatz zur Induktion von MMPs auf einen Matrixaufbau hinweisen. Tatsächlich zeigte sich bereits elektronenmikroskopisch, dass es im Kulturverlauf zu einer deutlichen Bildung von Kollagen in EHTs kommt. Parallel dazu belegte auch die qRT-PCR-Analyse eine vermehrte Expression von Kollagen Typ I und III im Verlauf der EHT-Kultur. Interessant war auch die gleichförmige Regulation der *bax* und TGF- β 1-Transkriptkonzentrationen, die einen Zusammenhang nahe legen. Tatsächlich wird auch TGF- β 1-Stimulation als Apoptoseinduktion in einigen Zellspezies, insbesondere während des Prozesses der Kanzerogenese, diskutiert (Bassler et al. 1997, Gressner et al. 1997, Eckert und Bauer 1998, Zhang et al. 1999).

Kollagen Typ I und Typ III sind die charakteristischen Kollagen-Isoformen des Herzens. Thomas et al. konnten zeigen, dass in Abhängigkeit vom Alter beide Isoformen vermindert exprimiert werden (Thomas et al. 2000). Annoni et al. untersuchten die mRNA-Konzentration der kollagenen Isoformen im rechten und linken Ventrikel getrennt (Annoni et al. 1998). Dabei zeigte sich, dass die Konzentration der Transkripte beider Isoformen im linken Ventrikel abnahm, im rechten Ventrikel sich jedoch nicht änderte. Im Rahmen unserer Untersuchungen an ventrikulärem Gesamtmyokard zeigte sich eine Abnahme beider Isoformen im adulten Myokard (Abb. 18). In EHTs kam es dagegen während des Kulturverlaufs zu einer deutlichen Zunahme der Transkriptkonzentration von Kollagen Typ I, während die Kollagen Typ III-Transkriptkonzentration initial abnahm (Tag 3) und erst an Tag 12 deutlich höhere Werte erreicht wurden. Als mögliche Ursache für eine Mehrexpression

von Kollagen in EHTs von Kulturtag 12 kommt die parallel erhöhte TGF- β 1-Transkriptkonzentration oder die Kultivierung unter chronischer mechanischer Dehnung ab Kulturtag 7 in Frage (s. o.). Die initiale Abnahme der Kollagen Typ III-Transkriptkonzentration zu Beginn der EHT-Kultur bleibt dagegen unklar und muss in Folgestudien untersucht werden.

Gesteigerte Transkriptkonzentration von Hypoxie-assoziiertem VEGF-A

Im Herzen werden VEGF-A und VEGF-B vor allem von Perizyten und Endothelzellen gebildet (Yonekura et al. 1999). Hypoxie, Ras-Onkogen und p53 sind wichtige Induktoren von VEGF-A, nicht jedoch von VEGF-B (Enholm et al. 1997, Yonekura et al. 1999). Im Rahmen dieser Studie zeigte sich in EHTs an den Kulturtagen 7 und 12 eine deutlich gesteigerte Transkriptkonzentration von VEGF-A. Als wahrscheinlichster Induktor wird Hypoxie angenommen (s. o.). Die VEGF-B-Transkriptkonzentration nahm zunächst bis Kulturtag 3 signifikant ab und verblieb anschließend auf einem niedrigen Niveau. Dabei entsprach das VEGF-B-Expressionsmuster im Wesentlichen dem von CSQ. Ob es tatsächlich einen kausalen Zusammenhang zwischen der VEGF-B-Expression und der CSQ-Expression bzw. der Kardiomyozytenanzahl in EHTs gibt, muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

Konzentration von ANF-Transkripten in Abhängigkeit von der mechanischen Belastung

Der atriale natriuretische Faktor (ANF) wird während der Entwicklung im gesamten Herzen exprimiert. Später wird ANF lediglich in den Vorhöfen und im Septummyokard gebildet (de Bold et al. 1985, Eppenberger-Eberhardt 1993). Promotorstudien zeigen eine nahezu exklusive Aktivierung von ANF in Herzmuskelzellen (Decock et al. 1994, Mayer et al. 2002). Im Rahmen einer pathologischen Hypertrophie kommt es zu einer Reaktivierung der ANF-Expression im Ventrikel. Dieses wird pathophysiologisch als Teil eines fetalen Expressionsprogramms gewertet. Hierbei scheint der ursächliche Mechanismus, welcher der Hypertrophie zugrunde liegt, keine Rolle zu spielen. So zeigen diverse Studien ein Ansteigen von ANF unter Volumen- wie auch Druckbelastung (Izumo et al. 1988, Mebazaa und Payen 1990, Chien et al. 1991, Kinnunen et al. 1992, Takahashi et al. 1992, de Bold et al. 1996, Iso et al. 1997, Ocampo et al. 2003). ANF senkt den Blutdruck, indem es die Diurese steigert, das Lumen großer Arterien weitet und die RAAS-Aktivierung blockiert (de Bold et al. 1985, Mebazaa und Payen 1990). Dadurch wird das Herz vor schädlichen Belastungen geschützt. Eppenberger-Eberhardt et al. beschrieben eine Mehrexpression von ANF in

Kardiomyozyten-Langzeitkulturen (Eppenberger-Eberhardt et al. 1990). Diese Beobachtungen stützt die von Eppenberger et al. aufgestellte Hypothese der Reaktivierung fetaler Expressionsprogramme und eine damit verbundene Dedifferenzierung von Kardiomyozyten in Langzeitkultur (Eppenberger et al. 1988).

Eine verhältnismäßig starke Reduktion der ANF-Transkripten konnten wir auch in Ventrikeln nativer Rattenherzen nachweisen. Somit stimmen diese Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Studien und dem derzeitigen Wissensstand überein (s. o.). In EHTs kam es zu einer deutlichen Aktivierung der ANF-Expression in den ersten 7 Kulturtagen. Daraufhin reduzierte sich allerdings die Konzentration von ANF-Transkripten wieder. Diese Befunde können einerseits als Induktion eines fetalen Expressionsprogramms in Langzeitkultur bis Tag 7 gedeutet werden. Andererseits könnte die Reduktion der ANF-Transkripte zwischen Tag 7 und 12 Anhaltspunkt einer voranschreitenden Differenzierung sein. Aus der Entwicklung des Herzens ist bekannt, dass mit der physiologischen Mehrbelastung des Ventrikels nach der Geburt die ANF-Expression im Ventrikel vermindert wird. An Kulturtag 7 werden EHTs auf eine Dehnapparatur aufgebracht und für den restlichen Kulturverlauf unter chronisch-mechanischer Dehnung gehalten, so dass die Reduktion von ANF-Transkripten als Folge einer physiologienahen Belastung angesehen werden kann. Im Vergleich zu adultem Gewebe ist die Konzentration von ANF-mRNA auch in EHTs an Kulturtag 12 noch erhöht, so dass hier nicht von einer kompletten Adaptation an ein adultes Genexpressionsprogramm ausgegangen werden kann. Zusammen mit den Daten der sarkomerischen Proteine und teilweise mit Ergebnissen der Konzentrationsanalyse von Regulatoren der Kalziumhomöostase deutet auch die ANF-Konzentrationsanalyse auf eine Differenzierung bzw. ein physiologisches Wachstum (Hypertrophie) von Herzmuskelzellen in EHTs hin.

Zusammenfassung

Engineered Heart Tissue (EHT) aus Herzzellen neugeborener Ratten zeigt morphologische und funktionelle Charakteristika von differenziertem Herzgewebe. Es wird zurzeit als *in vitro* Herzmodell sowie als potenzieller Gewebeersatz *in vivo* eingesetzt. In dieser Studie haben wir die Morphologie sowie die mRNA- und Proteinkonzentrationen ausgewählter Markergene in EHTs und nativem Myokard (fetal, neonatal, adult) per Licht- und Elektronenmikroskopie sowie per Echtzeit-PCR und Western-Blotting untersucht. Die erhobenen Befunde lassen vermuten, dass Herzmuskelzellen in EHTs einen Entwicklungsprozess durchlaufen, der zumindest teilweise einer physiologischen Differenzierung entspricht (physiologische Hypertrophie).

Hierfür sprechen insbesondere (1) eine Zunahme von Zellgröße und Zellkerngröße, (2) eine Ausbildung von Sarkomeren mit klassischem Bandenmuster und (3) eine gesteigerte Transkriptkonzentration von kardialem Aktin, Ryanodinrezeptor-2 und der Sarkoplasmatischen-Retikulum-ATPase. Darüber hinaus zeigte sich (4) eine Reduktion von skelettalem Aktin und natriuretischem Faktor. Andererseits weisen andere Befunde, wie die im Vergleich zu adultem Myokard erhöhte Transkriptkonzentration des Natrium-Calcium-Austauschers, auch auf Unterschiede zwischen EHT und nativem Herzmuskel hin. Die vor allem zu Beginn der EHT-Kultur erhöhten Transkriptkonzentrationen Matrix-modulierender Faktoren weisen auf einen umfangreichen Umbau der EHT-Matrix *in vitro* hin. Hierbei dürfte neben Matrixmetalloproteinasen mit bis zu 1.000 bzw. 10.000-fach gesteigerten Transkriptkonzentrationen und „*Tissue inhibitors of metalloproteinases*“ (TIMPs) dem „*transforming growth factor-β1*“ (TGF-β1) eine zentrale Rolle zukommen. Das Überwiegen des proapoptotischen bax gegenüber antiapoptotischen Bcl-2 zu Beginn der EHT-Kultur weist auf eine Apoptoseinduktion vor allem zu diesem Zeitpunkt hin. Entsprechend dieser Hypothese zeigte sich zugleich ein deutlicher Zellverlust in EHTs.

Zusammenfassend verbessert diese Studie unser Verständnis der Entwicklungsprozesse in EHTs und soll als Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung der EHT-Technologie dienen. Dabei wird die Induktion einer Physiologie-nahen Differenzierung sowohl für die Anwendung von EHTs als pharmakologisches *in vitro*-Modell wie auch als Gewebeersatz *in vivo* angestrebt.

Literaturverzeichnis

Annoni G, Luvara G, Arosio B, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Jeremic G, Microli L, Latini R, Vergani C and Masson S (1998) Age-dependent expression of fibrosis-related genes and collagen deposition in the rat myocardium. *Mech Ageing Dev.* 16:57-72.

Anversa P, Olivetti G, Bracchi PG and Loud AV (1981). Postnatal development of the M-band in rat cardiac myofibrils. *Circ Res* 48:561-568.

Arai M, Suzuki T, Nagai R (1996). Sarcoplasmic reticulum genes are upregulated in mild cardiac hypertrophy but downregulated in severe cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *J Mol Cell Cardiol.* 28:1583-1590.

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmler S and Zeiher AM (2002). Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106:3009-3017.

Atkins BZ, Hueman MT, Meuchel JM, Cottman MJ, Hutcheson KA and Taylor DA (1999). Myogenic cell transplantation improves in vivo regional performance in infarcted rabbit myocardium. *Heart Lung Transplant.* 18:1173-1180.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL and Robbins RC (2004). Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428:668-673.

Barry WH and Bridge JHB (1993). Intracellular calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation* 87:1807-1815.

Bassler D, Brauns HD and Bauer G (1997). Role of proliferation for intercellular induction of apoptosis. *Exp Cell Res.* 232:349-352.

Beltrami AP, Urbanek K, Kjustura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA and Anversa P (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Eng J Med.* 344:1750-1757.

Bernardo MM and Fridman R (2003). TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J.* 374:739-745.

- Bernstein M and Tyagi SC (1999). β -blocker improves cardiac function by reducing oxidative stress and metalloproteinase activity after myocardial infarction. *J of Appl.Res.* 1:1-11.
- Bers DM, Bassani RA, Bassani JW, Baudet S and Hryshko LV (1993). Paradoxical twitch potentiation after rest in cardiac muscle: increased fractional release of SR calcium. *J Mol Cell Cardiol.* 25:1047-1057.
- Bhardwaj S, Roy H, Gruchala M, Viita H, Kholova I, Kokina I, Achen MG, Stacker SA, Hedman M, Alitalo K and Yla-Herttuala S (2003). Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. *Hum Gene Ther.* 14:1451-1462.
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, vDeCalo A and Engler JA (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rew Oral Biol Med.* 4:197-250.
- Bloch KD, Seidman JG, Naftilan JD, Fallon JT and Seidman CE (1986). Neonatal atria and ventricles secrete atrial natriuretic factor via tissue-specific secretory pathways. *Cell.* 47:695-702.
- Boheler KR, Carrier L, Chassagne C, de la Bastie D, Mercadier JJ, Schwartz K (1991). Boheler Regulation of myosin heavy chain and actin isogenes expression during cardiac growth. *Mol Cell Biochem.* 104:101-107.
- Bohm M, Maack C, Wehrlen-Grandjean M and Erdmann E (2003). Effect of bisoprolol on perioperative complications in chronic heart failure after surgery (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS II)). *Z Kardiol.* 92:668-676.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Bromme HJ and Holtz J (1996). Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem.* 163-164:261-275.
- Carlsson E, Kjorell U, Thornell LE, Lambertsson A and Strehler E (1982). Differentiation of the myofibrils and the intermediate filament system during postnatal development of the rat heart. *Eur J Cell Biol.* 27:62-73.
- Carrier L, Boheler KR, Chassagne C, de la Bastie D, Wisnewsky C, Lakatta EG and Schwartz K (1992). Expression of the sarcomeric actin isogenes in the rat heart with development and senescence. *Circ Res* 70:999-1005.

- Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE and Vunjak-Novakovic G (1999). Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64:580-589.
- Chachques JC, Shafy A, Duarte F, Cattadori B, Goussef N, Shen L and Carpentier A (2002). From dynamic to cellular cardiomyoplasty. *J Card Surg* 17:194-200.
- Chen H, Li D, Saldeen T and Mehta JL (2003). TGF- β 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of MMP-1. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*. 284:1612-1617.
- Chen Z, Stokes DL, Rice WJ and Jones LR (2003). Spatial and dynamic interactions between phospholamban and the canine cardiac Ca²⁺ pump revealed with use of heterobifunctional cross-linking agents. *J Biol Chem*. 278:48348-48356.
- Chien KR, Knowlton Ku, Zhu H and Chien S (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*. 5:3037-3046.
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T and Leeuwenburgh C (2002). Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res*. 62:4592-4598.
- Chiu RC, Zibaitis A and Kao RL (1995). Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*. 60:12-18.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162:156-159.
- Cleutjens JPM, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV and Weber KT (1995). Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 27:1281-1292.
- Clubb JR, Clubb FJ and Bishop SP (1984). Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat: an index for growth hypertrophy. *Lab Invest* 50:571-577.
- Colombo T, Vitali E, Lanfranconi M, Russo C, Bruschi G, Marchetti C, Colucci V, Frigerio M, Oliva F, Grassi M, Gronda E, Merli M and Pellegrini A (1998). Heart transplantation 1985-1998: 13-years experience at Angelo De Gasperis Cardio-Thoracic Department-Milan. *Clin Transpl.*:315-325.

- Crompton M (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *Journal of Physiology* 529:11-21.
- Dawber TR, Meadors GF and Moore FE Jr (1951). Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *AM J Public Health* 41:279-286.
- De Bold AJ (1985). Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 230:767-770.
- De Bold AJ, Bruneau BG and Kuroski de Bold ML (1996). Mechanical and neuroendocrine regulation of endocrine heart. *Cardiovasc Res.* 31:7-18.
- De Jong F, Geerts WJC, Lamers WH, Los JA and Moorman AFM (1990). Isomyosin expression pattern during formation of the tubular chicken heart: A three-dimensional immunohistochemical analysis. *Anat Rec.* 226:213-227.
- Decock JB, Gillespie-Brown J, Parker PJ, Sugden PH and Fuller SJ (1994). Classical, novel and atypical isoforms of PKC stimulate ANF- and TRE/AP-1-regulated-promoter activity in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 356:275-278.
- Didié M (2005) Über die Anwendung von *Engineered Heart Tissue* (EHT) als kardialer Gewebeersatz in einem syngenem Rattenmodell. Med. Dissertation. Universität Hamburg.
- Doetschman T, Shull M, Kier A and Coffin JD (1993). Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* 22:618-29.
- Dolgilevich SM, Siri FM, Atlas A and Eng C (2001). Changes in collagenase and collagen gene expression after induction of aortocaval fistula in rats. *AM J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H214.
- Dong JW, Zhu HF, Zhu WZ, Ding HL, Ma TM and Zhou ZN (2003). Intermittent hypoxia attenuates ischemia/reperfusion induced apoptosis in cardiac myocytes via regulating Bcl-2/Bax expression. *Cell Res.* 13:385-391.
- Eckert S and Bauer G (1998). TGF-beta isoforms and fibroblast growth factor exhibit analogous indirect antioncogenic activity through triggering of intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.* 18:45-52.
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J and Eschenhagen T (2003). Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J.* 17 (3):437-439.

Enholm B, Paavonen K, Ristimäki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kinvinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U and Alitalo K (1997). Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factor, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 14:2475-2483.

Eppenberger ME, Hauser I, Baechi T, Schaub MC, Brunner UT, Dechesne CA and Eppenberger HM (1988). Immunocytochemical analysis of the regeneration of myofibrils in long-term cultures of adult cardiomyocytes of the rat. *Dev Biol.* 130:1-15.

Eppenberger-Eberhardt M, Messerli M, Eppenberger HM and Reinecke M (1993). New occurrence of atrial natriuretic factor and storage in secretorily active granules in adult rat ventricular cardiomyocytes in long-term culture. *J Mol Cell Cardiol.* 25:753-757.

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

Etoh T, Inoue H, Yoshikawa Y, Barnad GF, Kitano S and Mori M (2000). Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness. *Gut* 47:50-56.

Etzion S, Battler A, Arabash IM, Agnani E, Zarin P, Granot Y, Kedes LH, Klöner RA and Leor J (2001). Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in a rat model of extensive myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 33:1321-1330.

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

Fleischer S and Inui M (1989). Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 18:333-364.

Gao LR, Wang ZG, Zhang NK, He S, Yao L, Ning HY, Kang XL, Fei YX, Zhu ZM and Yang Y (2003). (Transplantation of fetal cardiomyocyte regenerates infarcted myocardium in rats). *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 83:1818-1820.

Goshev I and Nedkov P (1979). Extending the range of application of the biuret reaction: quantitative determination of insoluble proteins. *Anal Biochem.* 95:340-343.

Gombosová I, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Luss H, Muller FU, Muller T, Vahlensieck U, Schmitz W, bodor GS, Neumann J (1998). Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. *Am J Physiol.* 274: H2123-H2132.

Gressner AM, Lahme B, Mannherz HG and Polzar B (1997). TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol.* 26:1079-1092.

Gullestad L, Wikstrand J, Deedwania P, Hjalmarsen A, Egstrup K, Elkayam U, Gottlieb S, Rashkow A, Wedel H, Bermann G, Kjekshus J and MERIT-HF Study Group (2005). What resting heart rate should one aim for when treating patients with heart failure with a beta-blocker? Experiences from the Metoprolol Controlled Release/Extended Release Randomized Intervention Trial in Chronic Heart Failure (MERIT-HF). *J Am Coll Cardiol.* 45:252-259.

Handling LR and Vacek JL (1994). Angioplasty versus thrombolysis for acute myocardial infarction. *Postgrad Med.* 95:87-91.

Henderson RA, Pocock SJ, Sharp SJ, Nanchahal K, Sculpher MJ, Buxton MJ and Hampton JR (1998). Long-term results of RITA-1 trial: clinical and cost comparisons of coronary angioplasty and coronary-artery bypass grafting. Randomised Intervention Treatment of Angina. *Lancet* 353:321.

Hideaki N et Woessner JF (1999). Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274:21491-21494.

Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ and Mayer JE Jr (2000). Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 102:44-49.

Hu P, Yin C, Zhang KM, Wright LD, Nixon TE, Wechsler AS, Spratt JA, Briggs FN (1995). Transcriptional regulation of phospholamban gene and translational regulation of SERCA2 gene produces coordinate expression of these two sarcoplasmic reticulum proteins during skeletal muscle phenotype switching. *J Biol Chem.* 270:11619-11622.

Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD and Taylor DA (2000). Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant.* 9:359-368.

- Imanaka-Yoshida K, Amitani A, Ioshii SO, Koyabu S, Yamakado T, Yoshida T (1996). Alterations of expression and distribution of the Ca(2+)-storing proteins in endo/sarcoplasmic reticulum during differentiation of rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 28:553-562.
- Iso T, Arai M, Wada A, Kogure K, Suzuki T and Nagai R (1997). Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol.* 273:113-118.
- Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yonededa T and Sasyama S (2002). Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *Am J Coll Cardiol.* 39:1384-1391.
- Izumo S, Nadal-Ginard B and Mahdavi V (1988). Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Biochemistry* 85:339-343.
- Jackson M, Connel MG and Smith A (1993). Development of the collagen network of the human fetal myocardium: an immunohistochemical study. *Int J Cardiol.* 41:77-86.
- Janosi A, Ghali JK, Herlitz J, Czuriga I, Klibaner M, Wikstrand J, Hjalmarson A, MERIT-HF and Study Group (2003). Metoprolol CR/XL in postmyocardial infarction patients with chronic heart failure: experiences from MERIT-HF. *Am Heart J.* 146:721-728.
- Kandzari DE, Hasselblad V, Tchong JE, Stone GW, Califf RM, Kastrati A, Neimann FJ, Brener SJ, Montalescot G, Kong DF and Harrington RA (2004). Improved clinical outcomes with abciximab therapy in acute myocardial infarction: a systematic overview of randomized clinical trials. *Am Heart J.* 147:457-462.
- Kang HJ, Kim HS, Zhang Sy, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM and Park YB (2004). Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363:751-756.
- Kannel WB, Castelli WP, Mc Namara PM, McKee PA and Feinleib M (1972). Role of blood pressure in the development of congestive heart failure: the Framingham study. *N Eng J Med.* 287:781.

Kannel WB, Feinleib M, Mc Namara PM, Garrison RJ and Castelli WP (1979). An investigation of coronary heart disease in families: the Framingham Off-spring Study. *Am J Epidemiol.* 110:279-286.

Kähäri MM and Saarialho-Kere U (1999). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor growth and invasion. *Ann Med.* 31:34-45.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segew H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J and Gepstein L (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J of Clin Invest.* 108:407-414.

Kellerman S, Moore JA, Zierhut W, Zimmer HG, Campbell J and Gerdes AM (1992). Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 24:497-505.

Kessler PD and Byrne BJ (1999). Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications. *Annu Rev Physiol.* 61:219-242.

Kinnunen P, Vuolteenaho O, Uusimaa P and Ruskoaho H (1992). Passive mechanical stretch releases atrial natriuretic peptide from rat ventricular myocardium. *Circ Res.* 70:1244-1253.

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY and Field LJ (1996). Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest.* 98:216-224.

Kofidis T, Akhyari P, Boublik J, Theodorou P, Martin U, Ruhparwar A, Fischer S, Eschenhagen T, Kubis HP, Kraft T, Leyh R and Haverich A (2002). In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 124:63-69.

Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH and Field LJ (1993). Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest.* 92:1548-1554.

Koh GY, Soonpaa MH, Klug MG and Field LJ (1993). Long-term survival of AT-1 cardiomyocyte grafts in syngeneic myocardium. *AM J Physiol.* 264:H1727-H1733.

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

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Eillisman MH, Latterich M, Schneiter R, Green DR and Newmeyer DD (2002). Bax and lipids cooperate to form supraolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 111:331-342.

Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering (1993). *Science* 260:920-926.

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

Levy D, Kenchaiah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK, Murabito JM and Vasan RS (2002). Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med.* 347:1397-1402.

Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM (1996). Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol.* 28:1737-1746.

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

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

Liao XD, Wang XH, Jin HJ, Chen LY and Chen Q (2004). Mechanical stretch induces mitochondria-dependent apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes and G2/M accumulation in cardiac fibroblasts. *Cell Res.* 14:16-26.

Lijnen PJ, Petrov VV and Fagard RH (2000). Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab.* 71:418-435.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR on the 2^{-ddCt} method. *Applied Biosystems* 25:402-408.

Lowry OH, Rosebrough H NJ, Farr AL and Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.

Lyons GE (1994). In situ analysis of the cardiac muscle gene program during embryogenesis. *Trends Cardiovasc Med.* 4:70-77.

Mahony L. Regulation of intracellular calcium concentration in the developing heart (1996). *Cardiovasc Res.* 31:E61-E67.

- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J and Wobus AM (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* 44:41-50.
- Marelli D, Desrosiers C, El-Alfy M, Kao RL and Chiu RC (1992). Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant.* 1:383-390.
- Masson S, Arosio B, Luvara G, Gagliano N, Fiordaliso F, Santambrogio D, Vergani C, Latini R and Annoni G (1998). Remodelling of cardiac extracellular matrix during beta-adrenergic stimulation: upregulation of SPARC in the myocardium of adult rats. *J Mol Cell Cardiol.* 30:1505-1514.
- Matrisian LM (1992). The matrix degrading metalloproteinases. *Bioassays* 14:455-463.
- Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, Masuda S, Takahaschi A, Emoto T, Shiraischi I, Wada Y, Oka T and Takamatsu T (1999). Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 100:II262-II268.
- Mayer B, Kaiser T, Kempt P, Cornelius T, Holmer SR and Schunkert H (2002). Molecular cloning and functional characterization of the upstream rat atrial natriuretic peptide promoter. *J Hypertens.* 20:219-228.
- McKee PA, Castelli WP, Mc Marmy PM and Kannel WB (1971). The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med.* 285:1441.
- McTiernan CF, Lemster BH, Frye C, Brooks S, Combes A, Feldman AM (1997). Interleukin-1 beta inhibits phospholamban gene expression in cultured cardiomyocytes. *Circ Res.* 81:493-503.
- Mebazaa A and Payen D (1990). Atrial natriuretic factor. *Ann Fr Anesth Reanim.* 9:153-168.
- Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT and Marolleau JP (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-280.
- Menasche P (2002). Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. *Ann Med.* 34:314-315.
- Menasche P (2003). Skeletal muscle satellite cell transplantation. *Cardiovasc Res.* 28:351-357.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA and Field LJ (2004).

Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664-668.

Negretti N, O'Neill SC and Eisner DA (1993). The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 27:1826-1830.

Nishikawa N, Yamamoto K, Sakata Y, Mano T, Yoshida J, Miwa T, Takeda H, Hori M and Masuyama T (2003). Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res.* 57:766-774.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK and Jacobsen SE (2004). Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 10:494-501.

Oberpriller JO and Oberpriller JC (1974). Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool.* 187:249-253.

Ocampo C, Ingram P, Ilbawi M, Arcilla R and Gupta M (2003). Revisiting the surgical reaction of volume load by aorto-caval shunt in rats. *Mol Cell Biochem.* 251:139-143.

O'Neill L, Hobbrook NJ, Fargnoli J, Lakatta EG (1991). Progressive changes from young adult age to senescence in mRNA for rat cardiac myosin heavy chain genes. *Cardioscience* 2:1-5.

Orlic C, .ajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I anderson SM, Li B, Pickel J, Mc Kay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.

Parker TG, Chow KL, Schwartz RJ and Schneider MD (1991). TGF-beta 1 and fibroblast growth factors selectively up-regulate tissue-specific fetal genes in cardiac muscle cells. *Ciba Found Symp.* 157:152-164.

Pasumarthi KBS and Field LJ (2002). Cardiomyocyte Cell Cycle Regulation. *Circ Res.* 90:1044.

Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TM, Coker ML, Etoh T and Spinale FG (2001). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation* 103:2303-2309.

- Pitt D (1995). ACE inhibitor co-therapy in patients with heart failure: rationale for the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES). *Eur Heart J.* 16:110.
- Pocock SJ, Henderson RA, Seed P, Treasure T and Hampton JR (1996). Quality of Life, Employment Status and Anginal Symptoms After Coronary Angioplasty or Bypass Surgery. *Circulation* 94:142.
- Poss KD, Wilson LG and Keatin MT (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298:2188-2190.
- Radisic M, Park H, Shing H, Consi T, Schoen FJ, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (2004). Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:18129-18134.
- Rajnoch C, Chachques JC, Berrebi A, Bruneval P, Benoit MO and Carpentier A (2001). Cellular therapy reverses myocardial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 121:871-878.
- Ratajska A, Cleutjens JP (2002). Embryogenesis of the rat heart: the expression of collagenases. *Basic Res Cardiol.* 97:189-197.
- Reinecke H, Zhang M, Bartosek T and Murry CE (1999). Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts. *Circulation* 100:193-202.
- Reinecke H, Poppa V and Murry CE (2002). Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol.* 121:871-878.
- Reinlib L and Field L (2000). Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease?: A workshop of the National Heart, Lung and Blood Institute. *Circulation* 101:E182-E 187.
- Remppis A, Pleger ST, Most P, Lindenkamp J, Ehlermann P, Schweda C, Loffler E, Weichenhan D, Zimmermann W, Eschenhagen T, Koch WJ, Katus HA (2004). S100A1 gene transfer: a strategy to strengthen engineered cardiac grafts. *J Gene Med.* 6:387-394.
- Rhode LE, Ducharme A, Aroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, Mitchell PG, Libby P and Lee RT (1999). Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation.* 99:3063-3070.
- Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I and Ohlstein EH (2001). Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in rabbit. *Life Sci.* 68:799-814.

Roucoux X, Montessuit S, Antonsson B and Martinou JC (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J.* 368:915-921.

Saikumar P, Dong Z, Patel Y, Hall K, Hopfer U, Weinberg JM and Venkatachalam MA (1998). Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 17:3401-3415.

Sambrook J and Gething MJ (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-225.

Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JL, Lompre AM, Mercadier JJ and Swynghedauw B (1981). Myosin isoenzyme distribution correlates with speed of myocardial contraction. *J Mol Cell Cardiol.* 13:1071-1075.

Schwartz K, Lompre AM, Bouveret P, Wisnewsky C and Whalen RG (1983). Comparisons of rat cardiac myosins at fetal stages in young animals and in hypothyroid adults. *J Biol Chem.* 257:14412-14418.

Schwartz K, Carrier L, Chassagne C, Wisnewsky C and Boheler KR (1992). Contractile protein genes in development and disease. *Symp Soc Exp Biol* 46:265-272.

Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L and Menasche P (1996). Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation* 94:II337-II340.

Shimizu N, Yoshiyama M, Takeuchi K, Hanatani A, Kim S, Omura T, Iwao H and Yoshikawa J (1998). Doppler echocardiographic assessment and cardiac gene expression analysis of the left ventricle in myocardial infarcted rats. *Jpn Circ J.* 62:436-442.

Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M and Okano T (2002). Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90:40-48.

Shimizu T, Yamato M, Akutsu T, Shibata T, Isoi Y, Kikuchi A, Umezu M and Okano T (2002). Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets. *J Biomed Mater Res.* 60:110-117.

Shubeita HE, Martinson EA, Van Bilsen M, Chien KR and Brown JH (1992). Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1305-1309.

Siwick DA, Pagano PJ and Colucci WS (2001). Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *AM J Physiol Cell Physiol.* 280:C53-C60.

Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP and Mayer JE Jr (2000). Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation* 102:22-29.

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

Spinale FG (2002). Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 90:520-530.

Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, Freund M and Steinhoff G (2004). CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 52:152-158.

Statistisches Bundesamt Deutschland (2005). Gesundheitswesen; Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen. www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php

Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, Pethig K, Haverich A and Bader A (2000). Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: In vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 102:50-55.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA and Kleiner DE (1993). Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 7:1434-1441.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G and Wernet P (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106:e9039-e9040.

Sugiura S, Sata M and Serizawa T (1993). (Cardiac contractile proteins). *Nippon Rinsho.* 51:1146-1150.

Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsasser A and Schaper J (2003). Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 33:983-994.

- Takahashi T, Schunkert H, Isoyama S, Wei JY, Nadal-Ginard B, Grossman W and Izumo S (1992). Age-related differences in the expression of proto-oncogene and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium. *J Clin Invest.* 89:939-946.
- Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD and Kraus WE (1998). Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat.Med.* 4:929-933.
- Teebken OE and Haverich A. Tissue engineering of small diameter vascular grafts (2002). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 23:475-485.
- Thomas DP, Zimmerman SD, Hansen TR, Martin DT and McCormick RJ (2000). Collagen gene expression in rat left ventricle: interactive effect of age and exercise training. *J Appl Physiol.* 89:1462-1468.
- Vacanti JP, Langer R, Upton J and Marler JJ (1998). Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 33:165-182.
- van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoorn, Schrier PI and van der Laarse A (2002). Stretch-induced paracrine hypertrophic stimuli increase TGF-beta1 expression in cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 236:147-153.
- Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolar F, Ostadalova I and Drexler H (1995). Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na⁺-Ca(2+)-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 27:1689-1701.
- Vornanen M (1992). Force-frequency relationship, contraction duration and recirculating fraction of calcium in postnatally developing rat heart ventricles: correlation with heart rate. *Acta Physiol Scand.* 145:311-321.
- Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N and Chiu RC (2000). Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 120:999-1005.
- Webster KA, Discher DJ and Bishopric NH (1993). Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 268:16852-16858.
- Wessels A, Vermeulen JLM, Verbeek FJ, Kalamian F, Viragh S, Lamers WH and Moorman AFM (1992). Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle: Part III. An immunohistochemical analysis of the distribution of the

neural tissue antigen G1N2 in the embryonic heart; implications for the development of the atrioventricular conduction system. *Anat Rec.* 232:111.

Willenheimer R, Erdmann E, Follath F, Krum H, Ponikowski P, Silke B, Van Veldhuisen DJ, Van De Ven L, Verkenne P, Lechat P and CIBIS III investigators (2004). Comparison of treatment initiation with bisoprolol vs. enalapril in chronic heart failure patients: rationale and design of CIBIS-III. *Eur J Heart Fail.* 6:493-500.

Willis S, Day CL, Hinds MG and Huang DCS (2003). The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J of Cell Science* 116:4053-4056.

Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991). Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 48:173-182.

Woodcock-Mitchel J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson B and Gabbiani G (1988). Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 39:161-166.

Xie Z, Koyama T, Suzuki J, Fujii Y, Togashi H, Sawa H and Nagashima K (2001). Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins and cardiomyocyte apoptosis. *Jpn Heart J.* 42:759-770.

Yokoyama T, Arai M, Sekiguchi K, Tanaka T, Kanda T, Suzuki T, Nagai R (1999). Tumor necrosis factor-alpha decreases the phosphorylation levels of phospholamban and troponin I in spontaneously beating rat neonatal cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 31:261-273.

Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, Nomura M, Abedin MJ, Unoki H, Yamamoto Y and Yamamoto H (1999). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *J Biol Chem.* 274:172-178.

Yue TL, Wang C, Romanic AM, Kikly K, Keller P, DeWolf WE Jr, Hart TK, Thomas HC, Storer B, Gu JL, Wang X and Feuerstein GZ (1998). Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol.* 30:495-507.

Zak R (1974). Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ Res.* 35:II17-II26.

Zhang HY and Phan SH (1999). Inhibition of myofibroblast apoptosis by Transforming growth factor β 1. *AM J Respir Cell Mol Biol.* 21:658-665.

Zhang L, Keane MP, Zhu Li X, Sharma S, Rozengurt E, Strieter RM, Dubinett SM and Huang M (2004). Interleukin-7 and transforming growth factor-beta play counter-regulatory roles in protein kinase C-delta-dependent control of fibroblast collagen synthesis in pulmonary fibrosis. *J Biol Chem.* 279:28315-28319.

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

Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier G, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyend M and Eschenhagen T (2002a). Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106:151-157.

Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Münzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL and Eschenhagen T (2002b). Tissue Engineering of a Differentiated Cardiac Muscle Construct. *Circ Res.*:223-230.

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

Veröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

Zimmermann WH, Didié M; Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, **Boy O**, Neuhuber WL; Weyand M; Eschenhagen T. (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. Circulation 106:1151-1157

Zimmermann WH, Didié M, Schubert P, Schneiderbanger K, Reichert T, **Boy O**, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002) In vitro heart model for functional studies and tissue replacement. Keystone Symposia, Molecular Biology of the Heart B6:#129.

Boy O, Hilpert A, Zimmermann WH (2003) Morphologische und molekulare Entwicklung von Engineered Heart Tissue. Z Kardiol 92:1/219.

Zimmermann WH, Kehat I, **Boy O**, Gepstein A, Neuhuber WL, Gepstein L. (2003) Three-Dimensional Culture Induces Advanced Differentiation of Primary Rat and Human Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes: Implications for Cardiac Tissue Engineering. Circulation 108:IV-243

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. T. ESCHENHAGEN für die Vergabe sowie Unterstützung bei der Ausarbeitung und Vorstellung der Promotionsarbeit.

Ganz besonderen Dank verdient mein Betreuer Herr Prof. Dr. med. W.-H. ZIMMERMANN für die wissenschaftliche und methodische Betreuung, sowie den anhaltenden Zuspruch und die kritische Beurteilung der vorliegenden Arbeit.

Ebenso danke ich weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische und Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, ohne deren geduldige und beharrliche Einweisungen und Erklärungen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Frau Andrea HILPERT (Anatomisches Institut der FAU) gilt besonderer Dank für die kompetente und zuverlässige Unterstützung bei der Aufarbeitung elektronenmikroskopischer Schnitte und Herrn Prof. Dr. Dr. Detlef SCHUPPAN sowie Dr. med. Michael BAUER (Innere Medizin I der FAU) für die Überlassung von Sonden und Primern der Matrixmetalloproteinasen.

Meinen Dank richte ich auch an meine Eltern, ohne deren Unterstützung und Zuspruch ich das Medizinstudium nicht durchgeführt und die vorliegende Arbeit nicht fertig gestellt hätte.

Mein innigster Dank gilt Heike WERNER, die mir immer eine liebevolle und geduldige Stütze auch in schweren Zeiten war und ist.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- 01.12.1973
- Geburtsort: Bergneustadt
- Eltern: Rüdiger Boy, Vera Boy (geb. Naber)
- Geschwister: Christopher Boy

Schulbildung

- 1980 - 1984: Grundschule (Wiehl)
1984 - 1993: Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium (Wiehl)

Hochschulbildung

- 1998 - 2000: Studium der Medizin, Friedrich-Wilhelm-Universität (Bonn)
03/2000: Physikum
2000 - 2004: Studium der Medizin, Friedrich-Alexander-Universität (Erlangen-Nürnberg)
03/2001: 1. Staatsexamen (Note: gut)
03/2003: 2. Staatsexamen (Note: gut)
11/2004: 3. Staatsexamen (Note: gut)

Praktisches Jahr

- 04 - 08/2003: 16-wöchige Unterassistenz, Chirurgie, Kantonsspital (CH-Chur)
08 - 11/2003: 16-wöchiges PJ-Tertial, Orthopädie, Waldkrankenhaus (Erlangen)
12/03 - 03/04: 16-wöchiges PJ-Tertial, Innere Medizin, Klinikum (Bayreuth)

Berufsausübung

- seit 01/2005: Assistenzarzt der kardiologischen Abteilung des Klinikums Memmingen (Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilian-Universität München)

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Morphologische und molekulare Analyse eines
dreidimensionalen Herzmuskelmodells“

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Thomas ESCHENHAGEN mit der Unterstützung von Herrn Professor Dr. med. Wolfram-Hubertus ZIMMERMANN ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 02.03.2006

Oliver Boy