

Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

Entwicklung und Charakterisierung eines neuen *in vitro*- Herzmuskelmodells aus embryonalen Stammzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Christina Rogge

Hamburg, September 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Korth

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Tag der Disputation: 07.09.2007

Inhaltsverzeichnis	I-IV
1. EINLEITUNG	1
1.1 Neue Therapieverfahren zur myokardialen Regeneration/Reparatur	1
1.1.1 Aktivierung des Zellzyklus in Kardiomyozyten	1
1.1.2 Implantation von Zellen mit einem kardiogenen Potential	3
1.1.3 Herstellung und Implantation von künstlichem Herzgewebe	3
1.2 Aufgabenstellung	5
2. METHODEN UND MATERIAL	8
2.1 Versuchstiere und Genehmigungen	8
2.2 DNA-Klonierung	8
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	8
2.2.2 Transformation	9
2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA	9
2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration	10
2.2.5 Restriktionsverdau von DNA	11
2.2.6 Dephosphorylierung von DNA	11
2.2.7 Agarosegelelektrophorese	11
2.2.8 Gelextraktion von DNA-Fragmenten	11
2.2.9 Phenol/Chloroform-Extraktion	12
2.2.10 Fällung von DNA	12
2.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	12
2.2.12 DNA-Sequenzierung	13
2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Klonierung	13
2.3 Murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen)	14
2.3.1 Herstellung von <i>Leukemia Inhibitory Factor</i> (LIF)	14
2.3.1.1 Translation von LIF	14
2.3.1.2 Proteinaufreinigung	14
2.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung	15
2.3.2 Murine embryonale Fibroblasten (MEF)	16
2.3.2.1 Isolation von MEF	16
2.3.2.2 MEF-Kultur	16
2.3.2.3 Inaktivierung von MEF mit Mitomycin C	16

2.3.3	mES-Zellkultur	17
2.3.4	Einfrieren und Auftauen von mES-Zellen	17
2.3.5	Genetische Manipulation von mES-Zellen	18
2.3.5.1	Elektroporation	18
2.3.5.2	Selektion transgener mES-Zellen	19
2.3.6	Genotypisierung mittels <i>Southern Blot</i>	19
2.3.6.1	DNA-Isolation aus mES-Zellen	19
2.3.6.2	<i>Southern Blotting</i>	20
2.3.6.3	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	20
2.3.6.4	Hybridisierung	20
2.3.7	Differenzierung von mES-Zellen	21
2.4	Humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen)	22
2.4.1	Herstellung muriner embryonaler Fibroblasten	23
2.4.2	Auftauen, Kultur und Einfrieren von hES-Zellen	23
2.4.3	Verdau humaner Embryoidkörper	24
2.5	<i>Engineered Heart Tissue (EHT)</i>	25
2.5.1	Herstellung von Kollagen Typ I	25
2.5.2	Herstellung von Hühnerembryonenextrakt (CEE)	26
2.5.3	Herstellung von EHTs	26
2.5.4	ES-Zell-EHT-Kultur	27
2.5.5	Gewinnung von murinen Nichtkardiomyozyten	28
2.6	<i>In vitro</i>-Charakterisierung von EHTs	29
2.6.1	Isometrische Kontraktionsexperimente mit EHTs	29
2.6.2	Analyse der Kontraktionsfrequenz	31
2.6.3	Morphologische Untersuchungen	31
2.6.3.1	Lichtmikroskopie	32
2.6.3.2	Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie	34
2.6.3.3	Ultrastrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie	35
2.6.4	Quantifizierung des RNA- und DNA-Gehalts von mES-Zell-EHTs	36
2.6.4.1	RNA-Isolation aus mES-Zell-EHTs	36
2.6.4.2	DNA-Isolation aus mES-Zell-EHTs	37
2.7	Implantation von hES-Zell-EHTs	37
2.7.1	Narkose	37
2.7.2	EHT-Implantation	38
2.7.3	Immunsuppression	38
2.7.4	Explantation	38
2.8	Statistik	39

2.9	Material	39
2.9.1	Substanzen	39
2.9.2	Hilfsmittel und Geräte	41
3.	ERGEBNISSE	44
3.1	Etablierung der mES-Zell-Kultur	44
3.1.1	Translation des LIF-Proteins	44
3.1.2	Einfluss von MEF und LIF auf die mES-Zell-Differenzierung	45
3.1.3	Herstellung selektionierbarer mES-Zelllinien	45
3.1.4	Auswahl einer optimalen mES-Zelllinie	49
3.1.5	Definition optimaler Selektionsbedingungen in 2D-Kultur	49
3.2	Herstellung von EHTs	50
3.2.1	Herstellung von EHTs aus selektionierten Kardiomyozyten der A6-mES-Zelllinie	51
3.2.2	Herstellung von EHTs aus Embryoidkörpern der A6-mES-Zelllinie	52
3.2.3	Herstellung von EHTs aus undifferenzierten Stammzellen der A6-mES-Zelllinie	52
3.2.4	Etablierung optimaler Selektionsbedingungen	55
3.2.5	Vergleich der kontraktile Funktion von EHTs aus unterschiedlichen mES-Zelllinien	57
3.2.6	Langzeitkulturen von mES-Zell-EHTs	58
3.3	Charakterisierung der mES-Zell-EHTs	60
3.3.1	Isometrische Kontraktionsexperimente	60
3.3.2	Morphologische Charakterisierung	60
3.3.2.1	Toluidinblau-Färbung	60
3.3.2.2	Hämatoxylin&Eosin-Färbung	60
3.3.2.3	Immunfluoreszenzfärbungen	60
3.3.2.4	Ultrastrukturanalyse	60
3.4	RNA/DNA-Analyse in mES-Zell-EHTs	61
3.5	Herstellung eines Multi-Indikator-mES-Zell-Modells	61
3.5.1	Klonierung eines Multi-Indikator-Expressionskonstruktes	65
3.5.2	Identifikation und Charakterisierung einer Multi-Indikator-mES-Zelllinie	66
3.6	Herstellung von hES-Zell-EHTs	66
3.7	Charakterisierung von hES-Zell-EHTs	70
3.7.1	Isometrische Kontraktionsmessungen	70
3.7.2	Frequenzmessung	70
3.7.3	Immunfluoreszenzfärbungen	70
3.7.4	Ultrastrukturanalyse	70

3.8	Implantation von hES-Zell-EHTs	74
4.	DISKUSSION	75
4.1	Kardiales <i>Tissue Engineering</i>	76
4.2	ES-Zellen zur Herstellung von EHTs	77
4.3	Eigenschaften von ES-Zell-EHTs	79
4.4	Bedeutung von Nichtkardiomyozyten bei der Herstellung von ES-Zell-EHTs	81
4.5	Implantation von EHTs	82
4.6	Alternativen zu ES-Zellen	83
4.7	Ausblick	84
5.	ZUSAMMENFASSUNG	85
6.	SUMMARY	87
7.	LITERATUR	89
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	102
9.	LEBENS LAUF	104
10.	VERÖFFENTLICHUNGEN	105
11.	ERKLÄRUNG	107
12.	DANKSAGUNG	108
13.	ANHANG	109

1. Einleitung

Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Aus chronischen Herzerkrankungen entwickelt sich trotz verbesserter pharmakologischer und interventioneller Therapie häufig eine Herzinsuffizienz mit einer schlechten Prognose [1]. Während Herzmuskeldefekte in Amphibien [2] und Fischen [3] z.T. durch Proliferation des Restmyokards ausgeglichen werden können, sind entsprechende Reparaturmechanismen in Säugetieren nicht vorhanden. Hier kommt es in der Regel initial durch Hypertrophie des Restmyokards zu einer Kompensation des Verlustes von Herzmuskelgewebe. Langfristig entwickelt sich eine Überbeanspruchung des Restmyokards, das schließlich nicht mehr in der Lage ist, die erforderliche Leistung zu erbringen. Dieses stellt den Zustand einer fortgeschrittenen Herzinsuffizienz dar.

Das therapeutische Vorgehen bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz besteht heute aus der Abschirmung des Herzens gegen endogene neuro-humorale Überstimulation (β -Adreno-Rezeptoren-Blocker, Inhibitoren des Angiotensin-Konvertierenden-Enzyms, Angiotensin-Rezeptoren-Blocker und Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten), einer mechanischen Entlastung der Herzmuskulatur (Diuretika) sowie einer Verbesserung der Myokard-Kontraktilität (Digitalis). So kann eine Verlangsamung des Krankheitsprozesses erreicht werden. Eine Heilung der Herzinsuffizienz ist allerdings nicht möglich. Im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz bleibt als letzte Therapieoption oft nur die Herztransplantation. Trotz guter klinischer Resultate steht die Herztransplantation aufgrund einer zu geringen Anzahl an Spenderorganen und einem stetig steigenden Organbedarf nur einem begrenzten Patientenkollektiv zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien für Patienten mit kardialen Funktionsstörungen dringend angezeigt.

1.1 Neue Therapieverfahren zur myokardialen Regeneration/Reparatur

Als regenerative Therapieverfahren, deren Ziel ein Ausgleich des krankheitsbedingten Verlusts an Herzmuskelzellen ist, werden heute folgende Ansätze erprobt:

1. Aktivierung des Zellzyklus in Kardiomyozyten [4, 5]
2. Implantation von Zellen mit einem kardiogenen Potential [6, 7]
3. Herstellung und Implantation künstlicher Herzgewebe [8, 9]

1.1.1 Aktivierung des Zellzyklus in Kardiomyozyten

Postnatale Herzmuskelzellen von Säugetieren sind nicht mehr teilungsfähig. So konnte zum Beispiel in der Maus und der Ratte gezeigt werden, dass die proliferative Aktivität von Herzmuskelzellen bereits *in utero* massiv abnimmt und schließlich innerhalb der ersten

Postnataltage komplett verschwindet [10]. Demnach ist davon auszugehen, dass Säugetiere über einen gesamten Lebenszeitraum mit einer bei Geburt festgelegten Anzahl von Herzmuskelzellen auskommen müssen. Aus dieser Schlussfolgerung ergibt sich, dass ein Verlust von Herzmuskelzellen (z.B. nach einem Myokardinfarkt) nicht gleichwertig, d.h. mit Kardiomyozyten, ersetzt werden kann. Das Dogma der postmitotischen Kardiomyozyte wird heute jedoch kontrovers diskutiert [10, 11]. Es mehren sich Befunde, die auf eine Anwesenheit von residenten Herzmuskelvorläuferzellen auch im postnatalen Myokard hinweisen [12-14]. Unstrittig ist jedoch, dass die physiologisch regenerative Kapazität des Herzens nicht ausreicht, um erkranktes Myokard in relevantem Umfang zu ersetzen. Demnach scheint die kontrollierte Induktion einer Zellteilung durch pharmakologische oder gentechnische Interventionen ein attraktives therapeutisches Konzept zu sein [4, 15, 16]. Erste Studien zur Aktivierung des Zellzyklus in Kardiomyozyten wurden in Mäusen durch Überexpression des SV40 Large T-Antigens unter der Kontrolle eines herzspezifischen Promotors durchgeführt. Diese Mäuse bildeten Tumoren in den rechten Atrien als Zeichen unbegrenzter Zellteilung der transgenen Kardiomyozyten [15]. Die auch heute noch in der kardiovaskulären Grundlagenforschung verwendete HL 1-Zelllinie wurde aus diesen *in vivo* immortalisierten Herzmuskelzellen gewonnen [17]. Während diese Daten eindeutig die Möglichkeit einer Zellzyklusinduktion in Kardiomyozyten zeigen, ist die Entwicklung von Techniken, die eine weniger starke und zugleich steuerbare Induktion der proliferativen Aktivität in Kardiomyozyten erlauben, für eine therapeutische Anwendung zwingend erforderlich. Dieser Ansatz wird gentechnologisch zumeist durch Überexpression von Zellzyklusmediatoren (D-Typ Cyclin [16], Cyclin A2 [18], CDK-2 [19], CDK-4 [20], Telomerasen [21], c-myc [22] oder p38 [23]) verfolgt. So konnte unter anderem an terminal differenzierten adulten Kardiomyozyten gezeigt werden, dass eine adenovirale Koexpression von CDK-4 und einem modifizierten Cyclin D1-Molekül den Zellzyklus *in vivo* aktiviert [20]. Weiterhin führte eine Expression von c-myc in adulten Kardiomyozyten zu hypertrophem Wachstum bei zugleich erhöhter DNA-Synthese, wobei es zur Ausbildung mehrkerniger Kardiomyozyten (Karyokinese), aber nicht zu einer Zellteilung (Zytokinese) kam [22]. In einem Infarktmodell der Maus führte die transgene Überexpression von Cyclin D2 im Gegensatz zu Cyclin D1 und Cyclin D3 vor allem im Infarktbereich zu einer Zellzyklusinduktion in Kardiomyozyten. Diese hatte zur Folge, dass die Infarktgröße in diesem Tiermodell nach 180 Tagen im Vergleich zu Kontrolltieren um 50% reduziert war [16]. Diese Versuche zeigen kollektiv, dass es prinzipiell möglich ist, den Zellzyklus von Kardiomyozyten zu induzieren und damit einem pathologischen myokardialen Zellverlust entgegen zu wirken. Für eine klinische Anwendung dieser Konzepte müssen allerdings pharmakologisch beeinflussbare Regelkreise identifiziert werden, über die z.B. in Analogie zum Cyclin D2-Mausmodell eine selektive Aktivierung des entsprechenden Zyklins in Herzmuskelzellen des Menschen möglich wäre.

1.1.2 Implantation von Zellen mit einem kardiogenen Potential

Eine weitere Möglichkeit zum Ausgleich eines Zellverlustes könnte die Implantation von Zellen mit einem kardiogenen Potential im Sinne einer zellulären Kardiomyoplastie sein [24-26]. Bei diesem Ansatz ist es entscheidend, dass sich implantierte Zellen in das funktionelle Synzytium des Herzens integrieren und dadurch die Kontraktionskraft des erkrankten Myokards verbessern. Bisher wurde die Anwendung von fetalen und neonatalen Kardiomyozyten [27], skelettalen Myoblasten [27-29], glatten Muskelzellen [30], Knochenmarkstammzellen [31-33] sowie zirkulierenden [34] und residenten Stammzellen [12] erprobt. Unabhängig von der verwendeten Zellspezies und interessanterweise auch von der Zellzahl kam es in den meisten Studien zu einer Verbesserung der myokardialen Funktion [31, 35]. Zugleich wurde in einigen Studien von einer gleichzeitig erhöhten Angiogenese [36-39] sowie von protektiven/reparativen parakrinen Effekten [40] berichtet, so dass vermutlich eher indirekte (u.a. Angiogenese, parakrine Faktoren) als direkte (kontraktiler Beitrag der implantierten Zellen zur Gesamtfunktion des Herzens) Effekte für die beobachteten therapeutischen Auswirkungen einer Zellimplantation verantwortlich waren. Das Verfahren der myokardialen Zelltherapie wird bereits in diversen klinischen Prüfungen untersucht. Erste Versuche wurden dabei mit skelettalen Myoblasten durchgeführt [36, 41, 42]. Dabei zeigte sich jedoch, dass Myoblasten und die sich daraus entwickelnden Myotuben keinen funktionellen Kontakt mit dem Empfängermyokard eingehen [43]. Vielmehr zeigte sich ein vermehrtes Auftreten von ventrikulären Arrhythmien, was die Implantation von Defibrillatoren in Patienten mit Myoblastenimplantation erforderlich gemacht hat [44]. Neben den initialen Myoblasten-Studien [29] sind mittlerweile vor allem Knochenmarkzellimplantationen auch in Patienten durchgeführt worden [45-48]. Diese Studien basieren auf Befunden der Arbeitsgruppe um P. Anversa, die zeigen konnte, dass Zellen aus dem Knochenmark im Herzen einen regenerativen Effekt hervorrufen können. Tatsächlich bestätigten auch einige klinische Studien diesen therapeutischen Effekt [45, 47, 48], während in anderen Studien keine Funktionsverbesserung nach Knochenmarkstammzellimplantation beobachtet wurden [46]. Wesentliche Probleme der Zellimplantation lassen sich wie folgt zusammenfassen: (1) Die Effekte scheinen weitgehend unabhängig von der Zellspezies zu sein, d.h. eine kardiale Differenzierung der Zellen scheint nicht notwendig [29]; (2) die Effekte sind ebenfalls nicht wesentlich von der Zellzahl abhängig [33, 46, 47]; (3) >85% der implantierten Zellen sterben *in situ* oder werden aus dem Myokard ausgespült [49]. Vor diesem Hintergrund ist somit fraglich, ob sich die direkte Implantation von Zellen tatsächlich auch zur Kompensation von großen Gewebedefekten eignet und sich damit alternativ zur Herztransplantation anwenden lässt.

1.1.3 Herstellung und Implantation von künstlichem Herzgewebe

Eine konzeptionelle Alternative zur Implantation von Einzelzellsuspensionen ist die Implantation von *in vitro* hergestellten Gewebekonstrukten zum Ersatz von erkranktem Myokard [50-53].

Hierzu muss zunächst *in vitro* künstliches Herzgewebe hergestellt werden, das bereits *ex vivo* morphologische und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard besitzt. Optimal wäre ein Gewebe, das eine hohe Dichte an funktionellem Myokard aufweist. Zur Herstellung künstlicher Herzgewebe haben sich drei Verfahren etabliert: (1) Die Besiedelung von vorgeformten synthetischen oder biologischen Matrices mit Herzmuskelzellen [50, 54-57], (2) die Förderung einer spontanen myokardialen Rekonstitution in einem kardiogenen Milieu aus Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und Herzzellen [58-60] und (3) die Stapelung von Einzelschichtkulturen [61].

Die in klassischen *Tissue Engineering*-Verfahren verwendeten Trägermaterialien bestehen i.d.R. aus biologisch resorbierbarem Material wie Natriumalginat, Calciumgluconat, Polymilchsäuren oder Polyglykolsäuren [50, 54, 55, 57, 62]. Durch Besiedelung dieser Matrices mit Herzmuskelzellen können spontan kontrahierende dreidimensionale Konstrukte generiert werden [51]. Dabei hat sich jedoch auch gezeigt, dass Herzmuskelkonstrukte aus vorgeformten Matrices nur sehr geringe Kontraktionskräfte entwickeln, was vermutlich an der Steifheit der verwendeten Matrices liegt [63, 64]. Eine Anwendung dieses Konzeptes zur kardialen Reparatur *in vivo* wurde bisher nur vereinzelt durchgeführt, wobei eine therapeutische Bedeutung bisher nicht nachgewiesen werden konnte [65]. Durch Stapelung von Einzelschichtkulturen konnten dagegen Konstrukte mit einer guten kontraktilen Funktion hergestellt werden [61]. Diese Konstrukte erreichen *in vitro* höchstens eine Höhe von 4 Einzelschichten mit einer gesamten Dicke von etwa 40 µm. Durch sequenzielle Implantationen können jedoch *in vivo* Implantatdicken von bis zu einem Millimeter erreicht werden [66]. In einer weiteren Studie wurde die Ausbildung elektrischer Kontakte zwischen geschichteten Gewebekonstrukten und nativem Myokard nachgewiesen [67]. Eine therapeutische Anwendung dieser Zellschichtkonstrukte ist bisher nicht erfolgt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein alternatives *Tissue Engineering*-Verfahren zur Herstellung von *Engineered Heart Tissue* (EHT) entwickelt [58-60]. Hier wird die spontane Aggregation von Herzzellen in einem dreidimensionalen Milieu zu einem differenzierten Muskelnetzwerk gefördert. EHTs wurden bisher aus Herzzellen embryonaler Hühner [58] und neonataler Ratten [59], Kollagen I und Matrigel (Mischung aus Basalmembranproteinen und Wachstumsfaktoren) hergestellt. EHTs kontrahieren spontan und zeigen morphologische und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard [60]. Implantationsstudien haben gezeigt, dass EHTs *in vivo* überleben, nach Implantation vaskularisiert und innerviert werden, sowie für mindestens acht Wochen *in situ* kontraktile bleiben [52]. Im Rahmen von experimentellen Therapiestudien in einem Ratteninfarktmodell konnte nachgewiesen werden, dass Versuchstiere mit einem EHT-Implantat nach 4 Wochen eine bessere linksventrikuläre Funktion aufweisen als Kontrolltiere [53].

Nachdem EHTs zunächst aus primären Kardiomyozyten des Huhns [58] und der Ratte [59] hergestellt wurden, konnte kürzlich ein murines EHT-Modell etabliert werden [68]. Für den Gebrauch von EHTs in einem großen Maßstab und für die klinische Anwendung *in vivo* stehen primäre Zellen jedoch nicht zur Verfügung. Daher ist die Identifikation einer *in vitro* vermehrbaren Zellspezies, die Eigenschaften von Herzmuskelzellen entwickeln kann, notwendig. Adulte und embryonale Stammzellen mit einem kardiogenen Potential kommen hierfür prinzipiell infrage.

Adulte Stammzellen können aus verschiedenen Geweben isoliert werden [12, 31, 69-71]. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um multipotente Stammzellen mit einem mesodermalen Differenzierungspotential. Von einigen Arbeitsgruppen ist für diese Zellen auch eine Differenzierung zu Herzmuskelzellen beschrieben worden. Diese wurde durch eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren [72, 73], oder eine Behandlung mit Azacytidin [14, 74] erzielt. Ob es sich bei diesen Differenzierungsereignissen tatsächlich um die Induktion eines „echten“ Herzmuskelzellphänotyps handelt, bleibt jedoch umstritten. Für eine Anwendung von adulten Stammzellen zur Herstellung künstlicher Herzgewebe müssen (1) das kardiale Differenzierungspotential dieser Zellen auch *in vitro* klar dokumentiert und (2) Techniken entwickelt werden, die eine Bereitstellung großer Mengen kardiogener Stammzellen ermöglichen.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert [75, 76] und sind im Gegensatz zu adulten Stammzellen pluripotent. Dies bedeutet, dass sie zu spezialisierten Zellen aller drei Keimblätter, u.a. auch zu Kardiomyozyten differenzieren können [77-81]. Darüber hinaus können undifferenzierte ES-Zellen vermutlich unbegrenzt vermehrt werden, so dass prinzipiell auch große Mengen spezialisierter Zellen aus ES-Zellen gewonnen werden können. Nach der Etablierung stabiler muriner ES-Zelllinien (mES-Zelllinien) in den frühen 80er Jahren des letzten Jahrhunderts [75, 76] ist es der Arbeitsgruppe um J. Thomsen erstmalig gelungen, Linien von humanen ES-Zellen (hES-Zellen) zu generieren [82]. Mittlerweile wurden weltweit über 500 stabile hES-Zelllinien etabliert, von denen in Deutschland ca. 20 für eine wissenschaftliche Nutzung zur Verfügung stehen. Dass hES-Zellen ein kardiales Differenzierungspotential aufweisen, ist von verschiedenen Gruppen bestätigt worden [79, 83, 84]. Dadurch wäre eine Anwendung dieser Zellen zur Herstellung humaner künstlicher Herzgewebe prinzipiell möglich.

1.2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob EHTs mit morphologischen und funktionellen Eigenschaften von nativem Myokard aus embryonalen Stammzellen hergestellt werden können. Dabei sollte zunächst ein mES-Zell-EHT-System entwickelt und charakterisiert

werden. Aufbauend auf diesen Untersuchungen sollten EHTs mit Kardiomyozyten aus hES-Zellen hergestellt werden.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt und lässt sich wie folgt zusammenfassen:

- (1) Etablierung der mES-Zellkulturtechnik im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
- (2) Herstellung genetisch modifizierter mES-Zelllinien zur Selektion differenzierter Kardiomyozyten analog zu einem von Klug et al. entwickelten Verfahren [85]
- (3) Entwicklung eines Protokolls zur Herstellung von EHTs aus mES-Zellen
- (4) Morphologische und funktionelle Charakterisierung von mES-Zell-EHTs
- (5) Etablierung von hES-Zellkulturen
- (6) Entwicklung eines Protokolls zur Herstellung von EHTs aus hES-Zellen
- (7) Morphologische und funktionelle Charakterisierung von hES-Zell-EHTs
- (8) Implantation von hES-Zell-EHTs mit anschließender morphologischer Analyse

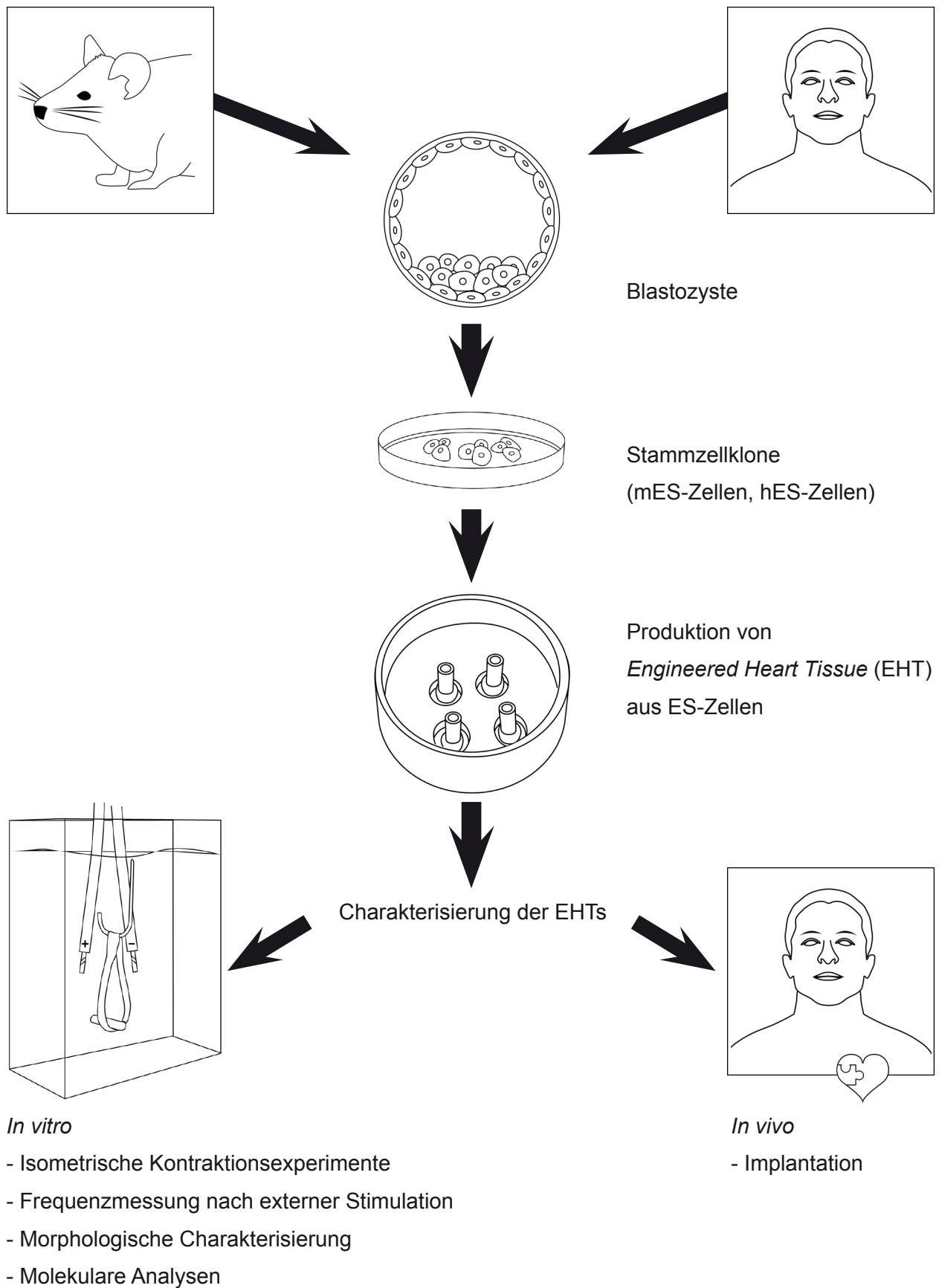


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entwicklung und Anwendung eines neuen *in vitro* generierten Herzmuskelmodells aus ES-Zellen.

2. Methoden und Material

2.1 Versuchstiere und Genehmigungen

Zur Herstellung embryonaler Fibroblastenkulturen (MEF; *mouse embryonic fibroblasts*) wurden tragende NMRI-Mäuse (ED 13-16; Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf), transgene C57/bl6-Mäuse (ubiquitäre Expression einer Hygromycinresistenz; ED 13; generiert von Frau PD Dr. rer. nat. I. Hermans-Borgmeyer) und CF1-Mäuse (ED 13,5; Jackson Laboratory-Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) verwendet. Für die Gewinnung von Nichtkardiomyozyten zur EHT-Herstellung wurden neonatale NMRI-Mäuse (Tag 1-3 postnatal) aus der Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #240; Org #241).

2.2 DNA-Klonierung

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Escherichia coli (verwendeter Stamm: DH5 α) wurden auf LB-Agar ausgestrichen. Einzelkolonien wurden nach Übernachtskultur bei 37 °C in 10 ml *Luria Broth* (LB)-Medium transferiert und 12 h bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (250 rpm, C 25 *Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific, USA) inkubiert. Anschließend wurden 500 ml LB-Medium mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (250 rpm) bis zu einer Zelldichte von 4-7x10⁷ Zellen/ml (entsprechend einer OD 600 nm = 0,6) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (5.000 g, 4 °C, 15 min).

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde das Zellpellet in 60 ml kalter TFB (*Transformation Buffer*) 1-Lösung resuspendiert, zentrifugiert (5.000 g, 4 °C, 15 min) und in 8 ml kalter TFB 2-Lösung auf Eis erneut resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden als 100 μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung elektrokompenter Bakterien wurde das Zellpellet zweimal in 170 ml kaltem Aqua bidest. resuspendiert und zentrifugiert (5.000 g, 4 °C, 15 min), anschließend in 10 ml Aqua bidest. mit 2 g Glycerin resuspendiert, zentrifugiert (3.000 g, 4 °C, 10 min) und erneut in 3 ml wässrigem 10%igen Glycerin (m/V) resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden als 100 μ l-Aliquots in N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

LB-Agarplatten: 300 ml LB-Medium und 4,5 g Agar autoklavieren; jeweils 10 ml Lösung für eine 10 cm-Platte verwenden; Gemisch zum Aushärten abkühlen lassen

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g NaCl, auf 1 l mit H₂O auffüllen; pH 7,0; autoklavieren; Lagerung bei 4 °C

TFB 1-Lösung: 0,3 g K-Acetat, 0,8 g MnCl₂, 1,2 g RbCl₂, 0,15 g CaCl₂, 18,9 g Glycerin in 100 ml Wasser lösen; pH 5,8; steril filtrieren

TFB 2-Lösung: 0,1 ml 1 M MOPS (3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure), 12 mg RbCl₂, 0,11 g CaCl₂, 1,89 g Glycerin mit Wasser auf 10 ml auffüllen; pH 7,0

2.2.2 Transformation

Chemische Transformation

Kompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut. Plasmid-DNA (1 µg) und kompetente Bakterien wurden kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C wurden die Bakterien wieder auf Eis gestellt. Die Zellsuspensionen wurden mit 900 µl LB-Medium (37 °C) ohne Antibiotika versetzt, für 45 min bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, auf LB-Agarplatten (50, 100 und 200 µl/Agarplatte) mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und 12-15 h bei 37 °C inkubiert.

Elektrische Transformation

Kompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut, umgehend mit 1 µg Plasmid-DNA gut gemischt und in einer 0,2 cm-Elektroporationsküvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Die Bakterien wurden in 450 µl LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, bei 37 °C für 30 min geschüttelt (250 rpm) und auf Agarplatten (50, 100 und 200 µl/Agarplatte) mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert.

Unabhängig von der Art der Transformation wurden zur Amplifikation von Plasmid-DNA Einzelkolonien in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin transferiert und über Nacht bei 37 °C und Rotation (250 rpm) kultiviert.

2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die DNA-Präparation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Firma Qiagen. Dabei wurden die kommerziell erhältlichen Puffer P 1-3 (Qiagen) verwendet. Die DNA wurde nicht chromatographisch über eine Säule aufgereinigt, sondern direkt gefällt. Hierfür wurden 5 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension zentrifugiert (9.000 g, RT, 30 sec). Die pelletierten Bakterien wurden in 200 µl P1 suspendiert und anschließend für maximal 5 min bei Raumtemperatur durch Zugabe von 200 µl P2 lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von

200 µl gekühltem P3 gestoppt. Nach Pelletierung der bakteriellen Membranfragmente und der genomischen DNA (13.000 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (13.000 g, 4 °C, 20 min) wurde das gebildete DNA-Pellet mit 450 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 g, 4 °C, 5 min). Der Ethanol wurde anschließend vorsichtig abgegossen. Die DNA wurde luftgetrocknet und darauf in 20 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen.

Zur Gewinnung großer DNA-Mengen (*large scale preparation*) wurden 3 ml einer Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) transferiert und bei 37 °C unter Schütteln (250 rpm) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien per Zentrifugation (6.000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert, in 10 ml P1 resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml P2 lysiert (vorsichtiges Mischen bei RT für 5 min). Nach Zugabe von 10 ml P3 und einer Inkubation von 20 min bei 4 °C wurden die Bakterienlysate zweimal zur Abtrennung von bakteriellen Proteinen und genomischer DNA zentrifugiert (jeweils 20.000 g, 4 °C, 30 min). Die Überstände (enthielten Plasmid-DNA) wurden schließlich zur weiteren Aufreinigung durch Membranfilter gegeben und auf eine mit 10 ml QBT äquilibrierte Silicasäule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit QC wurde die gebundene Plasmid-DNA mit 15 ml QF eluiert. Die DNA wurde anschließend mit 10 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation pelletiert (30 min, 15.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 2,5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (10 min, 4 °C, 15.000 g). Nach vorsichtigem Abgießen des Ethanols wurde die DNA luftgetrocknet und in 150 µl Wasser aufgenommen (DNA-Konzentration: ~1 µg/µl).

P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A; pH 8,0; bei 4 °C lagern

P2: 200 mM NaOH, 1% SDS

P3: 3 M K-Acetat; pH 5,5; bei 4 °C lagern

QBT: 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100; pH 7,0

QC: 1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol; pH 7,0

QF: 50 mM MOPS, 1,25 M NaCl, 15% Ethanol; pH 7,0

2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration isolierter DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 entsprach einer Konzentration von 50 mg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde durch parallele Bestimmung der Extinktion bei 280 nm und Berechnung der 260/280-Ratio bestimmt. Gereinigte Plasmid-DNA wies eine Ratio von >1,8 auf.

2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid- und genomische DNA wurden mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen in NEB (*New England Biolabs*) Restriktionspuffer 1-4, gegebenenfalls unter Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA, 0,1 µg/µl), bei der für die Enzyme optimalen Aktivitätstemperatur durchgeführt. Dabei wurde 1 µg DNA mit 2 U Enzym für 1-3 h in einem Gesamtvolumen von 50 µl verdaut. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme bei 60 °C hitzeinaktiviert.

NEB-Puffer 1: 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT); pH 7,9

NEB-Puffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT; pH 7,9

NEB-Puffer 3: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT; pH 7,9

NEB-Puffer 4: 50 mM K-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT; pH 7,9

2.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Um die 5'-Enden linearisierter DNA zu dephosphorylieren, wurden 500 nmol DNA mit 1 U Alkalische Kälberdarm-Phosphatase (CIP) in NEB-Puffer 3 in 50 µl Volumen für 30 min bei 37 °C inkubiert. CIP wurde durch Zugabe von EDTA (wässrige Lösung; pH 8,0; Endkonzentration 0,01 mM) und anschließendem Erhitzen (75 °C, 10 min) inaktiviert.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

DNA-Moleküle wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit der zu trennenden Molekulargewichte wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von 0,7%-1,2% in TAE-Puffer gewählt. An das Agarosegel wurde eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. Als Molekulargewichtsmarker wurde mit EcoRI und HindIII verdaute (Lamda-)DNA verwendet. Zum Anfärben von DNA-Banden wurde dem Gel vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugefügt. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, 20 mM Na-Acetat, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); pH 7,5

2.2.8 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die präparative Isolierung von durch Restriktionsverdau hergestellten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAspin *Gel Extraction Kits*. Auf einem UV-Tisch wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß

transferiert. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer NT 1 (Qiagen) zugegeben. Die Agarose wurde unter leichtem Schütteln gelöst (10 min, 50 °C). Die DNA-haltige Suspension wurde auf eine NucleoSpin-Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, RT, 10.000 g). Die Silikasäule wurde mit 600 µl ethanolischem Puffer NT 3 (Qiagen) gewaschen und zentrifugiert (1 min, 10.000 g, RT). Zur DNA-Elution wurde die Säule mit 50 µl sterilem Wasser (50 °C) für 1 min inkubiert und die DNA schließlich durch Zentrifugation (1 min, 10.000 g, RT) in einem sterilen Reaktionsgefäß gesammelt.

2.2.9 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung linearisierter DNA wurde diese mit einem Volumenteil Tris-gepuffertem Phenol/Chloroform-Gemisch unter Schütteln versetzt. Dabei kam es zum Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen Interphase vorlagen. Durch Zentrifugation (12.000 g, RT, 5 min) wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die DNA-enhaltende wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA anschließend mit Isopropanol gefällt.

Phenol/Chloroform-Gemisch: mit TE-Puffer gesättigtes Phenol; pH 7,8; Lagerung bei 4 °C; 1:1
mit Chloroform gemischt

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA

2.2.10 Fällung von DNA

Wässrigen DNA-Lösungen wurden 0,7 Volumenteile Isopropanol und 0,1 Volumenteil 3 M wässrige Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) zugesetzt. Danach wurde die DNA für 15-20 min bei 12.000 g pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach Zentrifugation (15.000 g, 4 °C, 20 min) luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge TE-Puffer oder Wasser (50 °C) aufgenommen.

2.2.11 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

DNA-Fragmente wurde mit Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 mithilfe von T4-Ligase für 3 h bei RT oder für 12 h bei 14 °C ligiert.

Pipettierschema:

Vektor-DNA: 30 fmol

Insert-DNA: 90 fmol

T4-Ligase: 1 U

10x T4-Ligasepuffer: 1 µl

Wasser zu 10 µl

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung mit *BigDye*-Terminatoren (Applied Biosystems) basiert auf einer modifizierten Form der enzymatischen Didesoxynukleotid-Methode [86].

Pipettierschema:

Plasmid-DNA: 200-400 ng

Primer: 15 pmol

BigDye-Terminator-Ready-Reaktion-Mix: 4 µl

Wasser zu 20 µl

Die DNA in diesem Reaktionsgemisch wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Denaturierung 1 min, 95 °C,

gefolgt von 25 Zyklen:

Denaturierung 30 sec, 96 °C

Annealing 15 sec, 50 °C

Elongation 4 min, 60 °C

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 80 µl Natriumacetat (0,3 M, pH 5,2) und 250 µl Ethanol gemischt und zentrifugiert (16.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten *BigDye*-Terminatoren erfolgte dort auf einem Applied Biosystems 377 *DNA-Sequencer*.

2.2.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Klonierung

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente zur exponentiellen *in vitro*-Amplifikation von DNA-Abschnitten. Durch das 30fache Wiederholen eines Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung von Primern und davon ausgehender Komplementärstrangsynthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase erreichte man eine Vervielfachung (ideale Kopienzahl bei 30 Zyklen: 2^{30}) des DNA-Fragmentes zwischen den Primern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde per PCR die für das klonierte Plasmid α MHC-NIGIL benötigte Neomycin-Resistenz amplifiziert.

Pipettierschema:

Ausgangs (*template*)-DNA: 150-200 ng

1x PCR-Puffer

MgCl₂: 2 mM

dNTPs: je 0,2 mM

Primer: je 0,25 µM

PrimeSTAR HS DNA Polymerase: 1,25 U

Wasser zu 50 µl

Verwendete *Primer* zur Amplifikation der Neomycinresistenz:

Vorwärtsprimer: 5'-GTCGACATGGGATCGGCCATTGAAC-3' (Sall-Schnittstelle)

Rückwärtsprimer: 5'-GGATCCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3' (BamHI-Schnittstelle)

Programm (30 Zyklen):

98 °C, 10 sec

55 °C, 5 sec

72 °C, 1 min

Durch die *PrimeSTAR HS DNA Polymerase* wurden glatte Überhänge (*blunt ends*) gebildet. 1 µl des PCR-Ansatzes wurde mit einem EcoRV linearisierten pBSK ligiert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert.

2.3 Murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen)

Murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen) wurden in Anwesenheit des Zytokins *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) auf wachstumsinaktivierten MEFs kultiviert, um eine spontane Differenzierung zu verhindern.

2.3.1 Herstellung von *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF)

2.3.1.1 Translation von LIF

Das LIF-Protein (20 kDa) wurde durch Translation in Bakterien hergestellt. Hierfür wurden *Escherichia coli* (DH5α) verwendet, die das Plasmid pGEX 2T-UF58 [87], das die Sequenz für das LIF-Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (LIF-GST) trägt, enthielten (Geschenk von Prof. Dr. rer. nat. A. Wobus, Gatersleben). Von den transformierten Bakterien wurde durch Inkubation (37 °C) in LB-Medium eine Suspension (800 ml) mit einer Extinktion von 0,5-0,6 bei 578 nm angefertigt. Mit Hilfe von Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 100 µM) wurde daraufhin die LIF-GST-Expression induziert (1 h, 37 °C).

2.3.1.2 Proteinaufreinigung

Die Bakterien wurden pelletiert (5.000 g, 4 °C, 10 min) und mittels Ultraschall (MS73, 10 min auf Eis) in 1% Triton-X-100 aufgeschlossen. Durch Zugabe von Glutathion-Agarose-Kugeln (12 h bei

4 °C in MTPBS gequollen) wurde das LIF-GST-Fusionsprotein an die Agarose-Kugeln gebunden und sedimentierte. Nach Zentrifugation (500 g, 21 °C, 1 min) und viermaligem Waschen mit MTPBS (jeweils 8 ml) wurde Thrombin (10 Units in 1 ml TNC) zugegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. So konnte das LIF-Protein von dem GST-Fragment abgetrennt und schließlich aus dem Überstand isoliert werden (Zentrifugation 500 g, 21 °C, 1 min).

MTPBS: 8,76g NaCl, 2,84 Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ in 1,0 l Aqua bidest.; pH 7,3

TNC: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂

2.3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

Die Qualität der LIF-Protein-Synthese wurde per diskontinuierlicher, denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Hierfür wurden jeweils 100 µl Zelllysate zentrifugiert (5 min, 4 °C, 14.000 g) und der Überstand in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 150 V in Laufpuffer und wurde beendet, sobald die Lauffront (Bromphenolblau) aus dem Gel austrat. Das Gel wurde 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt, anschließend 2x30 min in Entfärber 1 und 2x30 min in Entfärber 2 gewaschen. Abschließend wurde das Gel zum Entfernen des Eisessigs kurz gewässert und zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet. Parallel zu der SDS-PAGE-Analyse wurde die Proteinkonzentration der Lysate photometrisch per Bradford-Methode bestimmt. Dafür wurde eine Proteinstandardeihe (0–100 µg/ml Immunglobulin G) angefertigt. Die Absorption der Standardproteine wurde mit der Absorption der gefärbten LIF-Proteinproben bei 595 nm verglichen.

Trenngel (15%): 2,1 ml H₂O, 1,9 ml Acrylamid (40 %), 1,0 ml Tris (2 M ; pH 8,8 ; 0,4 M SDS), 25 µl Ammoniumpersulfat (10 %), 2,5 µl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)

Sammelgel (4 %): 1,9 ml H₂O, 0,305 ml Acrylamid (40 %), 0,8 ml Tris (0,5 M, pH 6,8, 0,4 M SDS), 30 µl Ammoniumpersulfat (10 %), 3 µl TEMED

Laemmli-Probenpuffer: 12,5 ml 0,5 M TrisHCl, 10 ml Glycerol, 10 ml SDS (20%), 5 ml Mercaptoethanol, 2,5 ml Bromphenolblau (0,05% w/v) zu 100 ml mit Aqua bidest.; pH 6,8

Laufpuffer: 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 5 ml SDS (20%) zu 1000 ml mit Aqua bidest.; pH 8,3

Coomassie-Färbelösung: 2 g Coomassie-Blue, 250 ml Isopropanol, 100 ml Eisessig zu 1000 ml mit Aqua bidest.; durch Faltenfilter filtrieren; Lagerung bei 4 °C

Entfärber 1: 50 ml Isopropanol, 50 ml Eisessig ad 500 ml mit Aqua bidest.; frisch verwenden

Entfärber 2: 50 ml Methanol, 50 ml Eisessig ad 500ml mit Aqua bidest.; frisch verwenden

2.3.2 Murine embryonale Fibroblasten (MEF)

2.3.2.1 Isolation von MEF

Primäre murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden unter sterilen Bedingungen aus 13-16 Tage alten Embryonen präpariert. Hierzu wurden den Embryonen der Kopf, die blutbildenden und die intestinalen Organe sowie das Herz entfernt. Die restlichen Gewebe wurden in Trypsinlösung (Difco; 0,2% in PBS [*Phosphate Buffered Saline*; Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung]) mechanisch durch Rühren mit Glaskugeln vereinzelt (RT, 35 min). Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an MEF-Medium beendet. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1.000 g, 4 °C, 4 min) und in MEF-Medium resuspendiert.

PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄ x 7(H₂O), 0,2 g KH₂PO₄ in 1,0 l Aqua bidest; pH 7,4; autoklaviert (Invitrogen)

MEF-Medium: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, 10% FCS (fetales Kälberserum), 1% nichtessentielle Aminosäuren (NEAA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

2.3.2.2 MEF-Kultur

Die vereinzelt Fibroblasten wurden auf Gewebekulturschalen, die mit 0,1%iger wässriger Gelatinelösung beschichtet waren, ausplattiert (Zellen aus fünf Embryonen/150 mm-Schale). Als Kulturmedium diente MEF-Medium. Die subkonfluenten Zellen wurden zweimal nach jeweils zwei bis vier Tagen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 geteilt. Hierzu wurden die MEFs mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml MEF-Trypsin/EDTA pro 150 mm-Schale für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Triturieren vereinzelt und anschließend mit doppeltem Volumen serumhaltigem Medium (MEF-Medium) zur Inaktivierung des Trypsins aufgenommen. Nach Pelletierung der Zellen (1.000 g, 4 min, 4 °C) wurden diese in MEF-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

MEF-Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA x 4Na in Hank's B.S.S. (Invitrogen)

2.3.2.3 Inaktivierung von MEF mit Mitomycin C

Um weitere Zellteilungen der MEFs zu verhindern, wurden die Zellen für zwei bis drei Stunden mit Mitomycin C (MMC; 10 µg/ml Medium) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Nach erneuter Inkubation mit MEF-Trypsin/EDTA wurden diese Zellen zunächst vereinzelt und auf Zellkulturschalen, die mit 0,1%iger Gelatinelösung beschichtet waren, ausgebracht (50.000 MEF/cm²). Diese teilungsinaktivierten Fibroblasten konnten zwei bis drei Wochen bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5-7%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert werden. Alternativ wurden die inaktivierten MEFs in MEF-Einfriermedium durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß eingefroren und in flüssigem N₂ bis zur späteren Verwendung gelagert.

MEF-Einfriermedium: 50% MEF-Medium, 40% FCS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

2.3.3 mES-Zellkultur

Zur Kultur undifferenzierter mES-Zellen wurden MEFs (50.000 MEF/cm²) auf Zellkulturschalen, die mit 0,1%iger Gelatinelösung beschichtet waren, ausplattiert (Abb. 2). Auf die Fibroblastenschicht wurden nach 1-2 Tagen vereinzelt mES-Zellen ausgebracht. Das Kulturmedium (mES-Medium) wurde täglich gewechselt. Die subkonfluenten mES-Zellen wurden alle zwei bis drei Tage abhängig von der mES-Zelldichte im Verhältnis 1:3 bis 1:6 geteilt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, ca. 1/5 des üblichen Kulturmedium-Volumens an ES-Trypsin/EDTA zugegeben und 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette durch Triturierung vereinzelt (im Mikroskop kontrolliert) und der Trypsin-Verdau mit mindestens dem doppelten Volumen an mES-Medium abgestoppt. Anschließend wurden die mES-Zellen zentrifugiert (1.000 g, 4 min, 4 °C), in mES-Medium resuspendiert und erneut ausplattiert (Verhältnis 1:3-1:6). Die Kultur der mES-Zellen erfolgte bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 7%igen CO₂-Atmosphäre.

mES-Medium: DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 15% FCS, 1% NEAA, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1% Nucleosidmix, 100 µM 2-Mercaptoethanol, 10 ng/ml LIF

Nucleosidmix: 80 mg Adenosin, 85 mg Guanodin, 73 mg Cytidin, 73 mg Uridin, 24 mg Thyminidin in 100 ml PBS bei 37 °C lösen; steril filtrieren

ES-Trypsin/EDTA: 2,5 g/l Trypsin, 0,38 g/l EDTA x 4 Na in Hank's B.S.S. (Invitrogen)

2.3.4 Einfrieren und Auftauen von mES-Zellen

Zum Einfrieren wurden die undifferenzierten Zellen mit PBS gewaschen und mit ES-Trypsin/EDTA abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an mES-Medium inaktiviert. Darauf wurden die Zellen durch Zentrifugation (1.000 g, 4 min, 4 °C) pelletiert und schließlich tropfenweise in eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Die Zellen (ca. 5x10⁷ Zellen/ml) wurden durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß eingefroren.

Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war. Dann wurde die Zellsuspension mit mindestens dem dreifachen Volumen an ES-Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (1.000 g, 4 min, 4 °C), das Pellet in mES-Medium resuspendiert und die Zellen anschließend ausplattiert.

mES-Einfriermedium: 50% mES-Medium, 40% FCS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

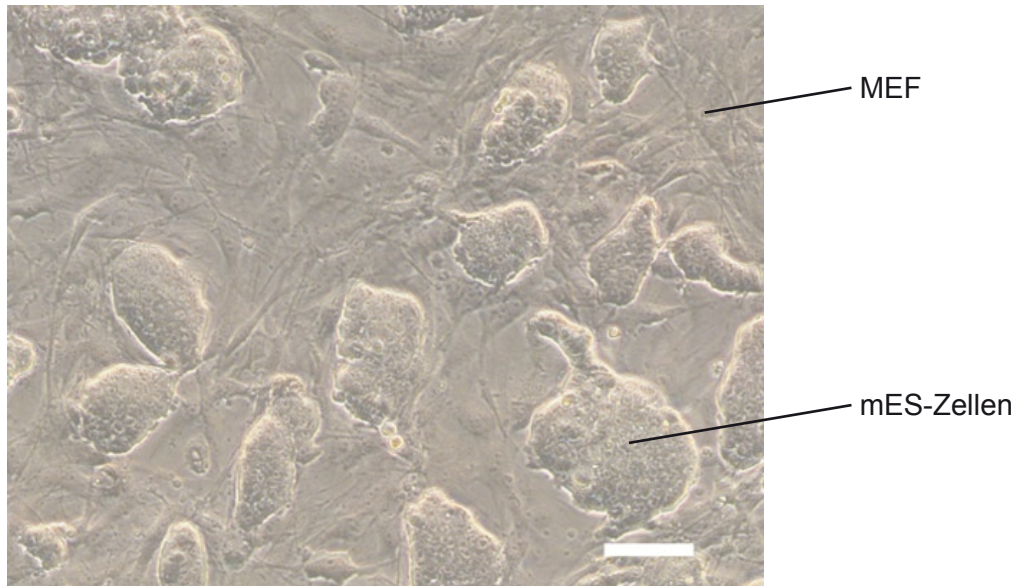


Abb. 2: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von mES-Zellen auf MEFs. Dargestellt ist die Expansion pluripotenter Zellen der A6-Linie, in die die Selektionskassette α MHC-NeoR stabil integriert ist. Durch die Zugabe von LIF (10 U/ml) und Kultur auf MEFs (50.000 MEF/cm²) wird eine Differenzierung der mES-Zellen verhindert. Maßstab: 100 µm.

2.3.5 Genetische Manipulation von mES-Zellen

2.3.5.1 Elektroporation

2×10^7 vereinzelte mES-Zellen wurden in 800 µl PBS aufgenommen, in einer Elektroporationskuvette (Gene-Pulser Kuvette 0,4 cm) mit 25 µg linearisierter DNA (α MHC-NeoR [Geschenk von Prof. L. Field, Indianapolis] bzw. α MHC-NeoR-IRES2-eGFP-IRES2-nLacZ [α MHC-NIGIL; im Rahmen dieser Arbeit kloniert]) gemischt und elektroporiert (300 V, 1.200 µF, Impuls 2 ms). Nach 10 min bei RT wurden die mES-Zellen in mES-Medium resuspendiert und direkt auf vier mit inaktivierten MEFs (50.000 MEF/cm²) bewachsenen, gelatinierten 100 mm-Schalen ausplattiert.

2.3.5.2 Selektion transgener mES-Zellen

Zwei Tage nach der Elektroporation wurde zur Selektion stabil transformierter mES-Zellen Hygromycin (100 µg/ml) zum Kulturmedium gegeben (neben der kardiomyozytenspezifischen Expression von unterschiedlichen Markergenen kodierten die transgenen Expressionskassetten für eine Hygromycin-Resistenz unter der Kontrolle des ubiquitär aktiven Phosphoglyceratkinase-Promotors). Resistente Zellklone wurden acht Tage nach der Transfektion isoliert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die Klone einzeln mit einer Pipettenspitze in etwa 25 µl PBS auf eine unbehandelte 96 *well*-Platte überführt. Die durch Zugabe von 25 µl ES-Trypsin/EDTA (37 °C, 4 min) vereinzelt mES-Zellen wurden mit 50 µl mES-Medium versetzt und auf eine neue, gelatinierte, mit MEF (50.000 MEF/cm²) bewachsene 96 *well*-Platte transferiert. Zwei Tage später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit ES-Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zugabe des doppelten Volumens an mES-Medium wurde die eine Hälfte dieser Zellsuspension auf zwei gelatinierte, mit einer dünnen MEF-Schicht (25.000 MEF/cm²) besiedelten 96 *well*-Platten, die andere Hälfte auf zwei gelatinierte, mit 50.000 MEF/cm² besiedelte 96-*well*-Platten überführt. Auf den dicht mit MEF bewachsenen Platten wurden die Stammzellklone bis zur Ausbildung von ausreichend großen Kolonien kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in mES-Trypsin/EDTA vereinzelt und das Trypsin mit doppeltem Volumen mES-Medium abgestoppt. Zu dieser Zellsuspension wurde das gleiche Volumen einer Mischung aus 80% FCS und 20% DMSO hinzugegeben. Nach Überschichten mit Mineralöl wurden die 96 *well*-Platten bei -80 °C eingefroren. Auf den dünn mit MEF bewachsenen 96 *well*-Platten wurden die mES-Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, um anschließend genomische DNA für eine Genotypisierung zu isolieren. Stabil transformierte mES-Zellklone wurden mittels *Southern Blotting* identifiziert.

2.3.6 Genotypisierung mittels *Southern Blot*

2.3.6.1 DNA-Isolation aus mES-Zellen

Für den Nachweis positiver mES-Zellklone wurde die genomische DNA von in 96 *well*-Platten konfluent gewachsenen mES-Zellen präpariert [88]. Die mES-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in 50 µl ES-Zell-Lyse-Puffer/*well* bei 60 °C in einer abgedichteten Feuchtkammer 2 h inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl alkoholischer Natriumchlorid-Lösung wurde die DNA 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Anschließend wurden die Überstände entfernt, die DNA zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und für etwa 20 min an der Luft getrocknet, bevor der Restriktionsverdau (*Bam*HI: mit αMHC-neoR transformierte mES-Zellen; *Eco*RI: mit αMHC-NIGIL transformierte mES-Zellen) in 50 µl Restriktionsmix bei 37 °C für 12 h erfolgte. 25 µl des Ansatzes wurden mithilfe eines 0,7-1%igen Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde für das *Southern Blotting* verwendet.

<u>Restriktionsmix:</u>	1x Restriktionspuffer, 100 µg/ml BSA, 50 µg/ml RNase, 10–15 U Restriktionsenzym
<u>ES-Zell-Lyse-Puffer:</u>	10 mM Tris pH 7,5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% N-Laurylsarcosin ("Sarcosyl"), 200 µg/ml Proteinase K
<u>Alkoholische Natriumchlorid-Lösung:</u>	5 M NaCl in Isopropanol

2.3.6.2 Southern Blotting

Die verdaute genomische DNA wurde im Agarosegel mit 0,25 M Salzsäure 10-20 min depuriniert und anschließend per Kapillarblot-Verfahren (*Southern Blot*) unter alkalischen Transferbedingungen (0,4 N NaOH; 12 h) auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Nylonmembran direkt zur Hybridisierung verwendet.

2.3.6.3 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

DNA-Fragmente (XhoI-BamHI-Fragment aus α MHC-NeoR, 6058 bp; Abb. 3A bzw. EcoRI-Fragment aus α MHC-NIGIL, 3644 bp; Abb. 3B) wurden mithilfe des *Prime-IT RmT Random Primer Labeling Kits* durch Einbau von α -³²P-dCTP radioaktiv markiert. Dafür wurden die Fragmente aus Agarosegelen eluiert (s.o.). 10-25 ng der DNA wurden in 45 µl TE-Puffer 10 min denaturiert (100 °C) und anschließend auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde mit dem *Labeling Mix (Rediprime TM II; Amersham)* gemischt und nach Zugabe von 5 µl α -³²P-dCTP (3.000 Ci/mmol) inkubiert (10 min, 37 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA gestoppt. Die markierten DNA-Fragmente wurden über Sephadex-G50-Säulen aufgereinigt. Die verwendeten Sonden hatten eine spezifische Aktivität von 100.000-200.000 cpm/µl. Die Sonden wurden direkt vor der jeweiligen Hybridisierung für 5 min bei 100 °C denaturiert.

2.3.6.4 Hybridisierung

Die Nylonmembran wurde mit 5 ml Hybridisierungslösung und 40 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml) prähybridisiert (60 °C, 30 min). Anschließend wurde denaturierte radioaktive Sonde (100.000 *counts/sec* pro ml Hybridisierungslösung) zur Hybridisierung (12 h, 60 °C) hinzugefügt. Darauf wurden die Membranen jeweils bei 60 °C 1x5 min mit 10 ml Waschlösung 1 und 2x mit 10 ml Waschlösung 2 gewaschen. Anschließend wurde die Membran feucht in Klarsichtfolie eingeschlagen und exponiert (*Phosphorimager*).

<u>Waschlösung 1:</u>	2xSSC; 0,5% SDS
<u>20xSSC-Puffer:</u>	175,3 g NaCl, 88,2 g Na ₃ -Citrat, Aqua bidest. ad 1 l; pH 7,0
<u>Waschlösung 2:</u>	0,1xSSC; 0,1% SDS

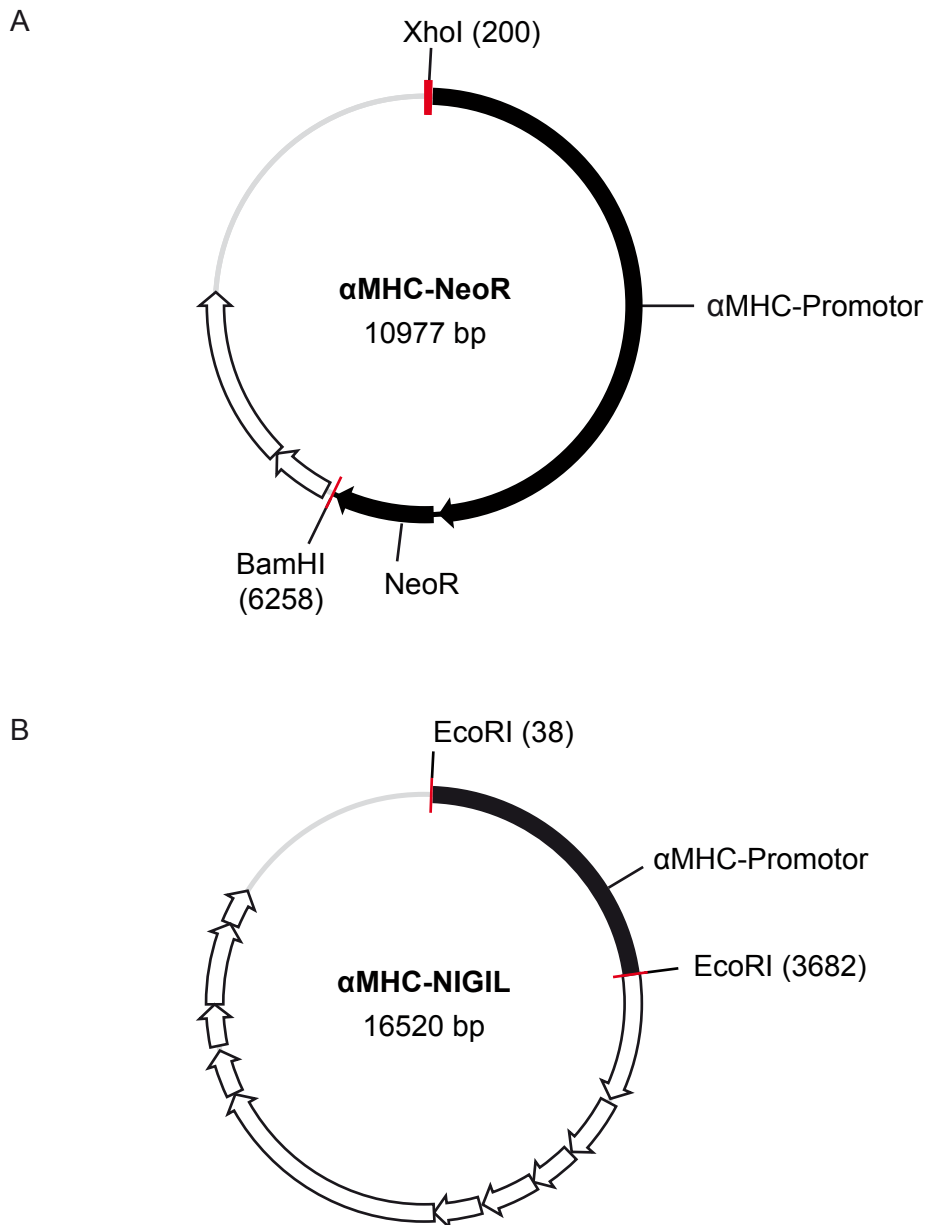


Abb. 3: Eingesetzte radioaktiv markierte Sonden zur Detektion transgener Zelllinien. A: 6058 bp großes XhoI-BamHI-Fragment aus dem Plasmid α MHC-NeoR. B: 3644 bp großes EcoRI-Fragment aus α MHC-NIGIL.

2.3.7 Differenzierung von mES-Zellen

Durch die Bildung von Embryoidkörpern (*embryoid bodies*; EBs) in hängenden Tropfen (500 Zellen/20 μ l Differenzierungsmedium 1) wurde die Differenzierung von mES-Zellen für 2 Tage initiiert und in einer anschließenden fünftägigen Suspensionskultur (Differenzierungsmedium 2) weitergeführt (Abb. 4). Für die Suspensionskulturen wurden Kulturschalen mit einer hydrophoben Beschichtung verwendet. Zur Förderung einer kardialen Differenzierung wurden

die Zellen schließlich auf gelatinisierten Zellkulturschalen ausplattiert und für weitere 12 Tage in Differenzierungsmedium 2 kultiviert. Die zu Kardiomyozyten differenzierten mES-Zellen konnten nach Ausbildung kontrahierender Areale mit G418 (200 µg/ml) selektioniert werden.

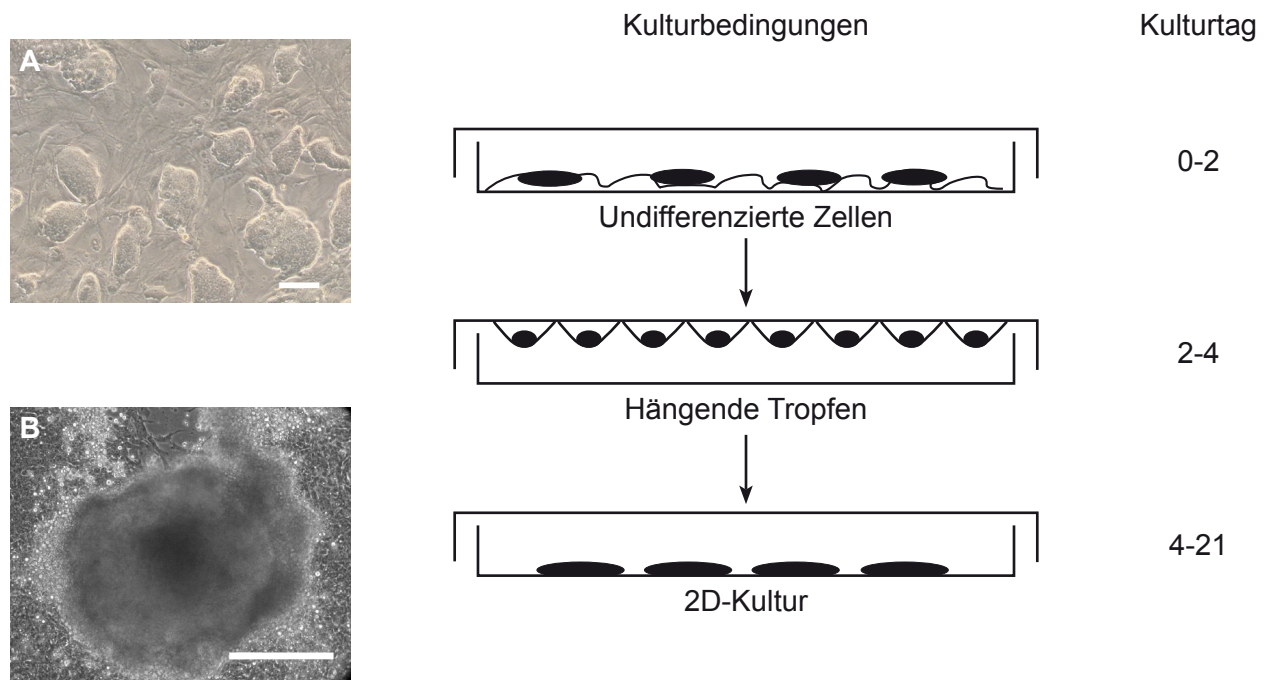


Abb. 4: Differenzierung von mES-Zellen. Undifferenzierte mES-Zellen wurden auf MEFs in Anwesenheit von LIF (10 U/ml) propagiert und anschließend in hängenden Tropfen und in 2D-Kultur differenziert. (A) Undifferenzierte mES-Zellen, (B) EB in 2D-Kultur. Maßstäbe: 100 µm.

Differenzierungsmedium 1: DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 20% FCS, 1% NEAA, 100 µM 2-Mercaptoethanol oder 50 µM 1-Thioglycerol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1% Nucleosidmix

Differenzierungsmedium 2: Iscove-Medium mit 20% FCS, 1% NEAA, 2 mM L- Glutamin, 100 µM 2-Mercaptoethanol oder 50 µM 1-Thioglycerol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.4 Humane embryonale Stammzellen (hES-Zellen)

Für die Kultur von undifferenzierten humanen ES-Zellen (hES-Zellen) waren wie bei den mES-Zellen MEFs erforderlich. Um den undifferenzierten Zustand zu erhalten, wurden anstelle von FCS und LIF *Serum Replacement* und *basic Fibroblast growth factor* (bFGF; 8 ng/ml) verwendet [89].

2.4.1 Herstellung muriner embryonaler Fibroblasten

MEFs für die hES-Zellkultur wurden aus CF1-Mäusen (ED 13,5), wie unter 2.3.2 für die mES-Zellkultur beschrieben, hergestellt.

2.4.2 Auftauen, Kultur und Einfrieren von hES-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hES-Zellen der Firmen WiCell (H1- und H9-Linie) und von *Embryonic Stem Cell International* (ESI; hES3-GFP Linie) bezogen. Die Anwendung dieser Zellen wurde durch das Robert-Koch-Institut (www.rki.de) genehmigt (12. Genehmigung). Von WiCell erhielten wir eingefrorene, undifferenzierte hES-Zellen, die wie im Folgenden beschrieben in Kultur genommen und propagiert wurden:

Zum Auftauen der hES-Zellen wurden die Einfrierröhrchen in der Hand aufgewärmt, bis nur ein kleiner Eisklumpen verblieb. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und tropfenweise mit 4 ml hES-Medium versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (200 g, RT, 5 min) und das Pellet, ohne die Zellklumpen zu zerbrechen, in hES-Medium resuspendiert. Kulturplatten mit MEF (s.o.; 50.000 MEF/cm²) wurden einmal mit PBS gewaschen, bevor die hES-Zellen darauf ausgebracht wurden. Die Kultur erfolgte bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre bei täglichem Mediumwechsel. Undifferenzierte hES-Zellen (Abb. 5) wurden geteilt, wenn (1) die MEFs älter als 10 Tage waren, (2) die Kolonien zu dicht gewachsen oder zu groß waren, oder (3) die hES-Zellen zu differenzieren begannen. Hierzu wurde das Kulturmedium von den Platten abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 10 min bei 37 °C mit Kollagenase-Lösung (100 µl/cm²) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellkulturschaber von den Kulturplatten abgelöst und mit einer weitlumigen Pipette 10x auf- und abpipettiert. Dabei musste ein zu starkes Auseinanderbrechen der Zellkolonien verhindert werden. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 g, RT, 5 min), in 3 ml hES-Medium vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (200 g, RT, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in hES-Medium erneut resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen entweder im Verhältnis 1:2 bis 1:5 ausplattiert, oder der Zellsuspension wurde langsam tropfenweise das gleiche Volumen Einfriermedium hinzugegeben. Die Zellen wurden eingefroren (Abkühlung um 1 °C/h in einem Isopropanol-Gefäß bei -80 °C) und anschließend in flüssigem N₂ gelagert.

<u>hES-Medium:</u>	DF 12 Medium mit 20% <i>Serum Replacement</i> , 0,5% Glutamin-Mercaptoethanol-Lösung, 1% NEAA, 8 ng/ml b-FGF
<u>Glutamin-Mercaptoethanol-Lösung:</u>	200 mM Glutamin-Lösung mit 20 mM 2-Mercaptoethanol
<u>b-FGF-Lösung:</u>	2 µg/ml b-FGF in PBS mit 0,1% BSA

<u>Kollagenase-Lösung:</u>	1 mg/ml Kollagenase Typ IV in DF 12 Medium; steril filtrieren; Lagerung bei 4 °C
<u>Einfriermedium (hES-Zellen):</u>	60% FCS, 20% DMSO, 20% hES-Medium

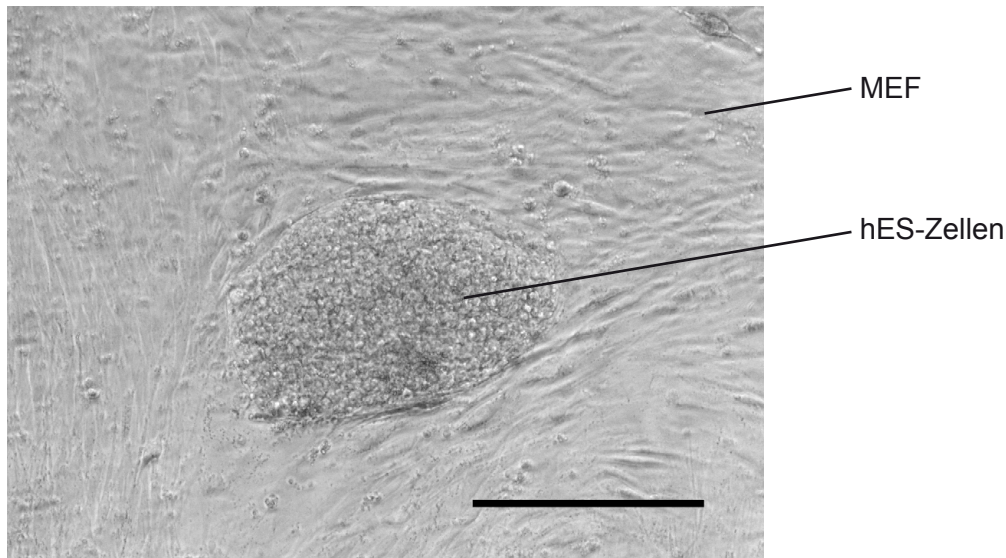


Abb. 5 : Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines undifferenzierten Zellklons der hES-Zelllinie H1 (Wicell). Maßstab: 100 µm.

2.4.3 Verdau humaner Embryoidkörper

hES-Zellen (hES3-ENVY) wurden von ESI vordifferenziert und als Lebendkulturen in Form von kontrahierenden EBs aus Singapur nach Deutschland geschickt (Abb. 6). Die EBs wurden nach 3-5 Kulturtagen aus den Kulturflaschen entnommen und in Zentrifugierröhrchen gesammelt. Dafür wurden die EBs nach Sedimentation mit calcium- und magnesiumfreiem PBS gewaschen und für 15 min in calcium- und magnesiumfreiem PBS bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellklumpen mit 2 ml ES-Trypsin/EDTA für 10 min bei 37 °C verdaut. Die entstandene Suspension wurde zum Dissoziieren der Zellklumpen 15x trituriert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 5 ml Differenzierungsmedium 2 abgestoppt. Die nun vereinzelteten Zellen wurden pelletiert (100 g, 10 min, RT), in Differenzierungsmedium 2 resuspendiert und direkt für die EHT-Herstellung verwendet.

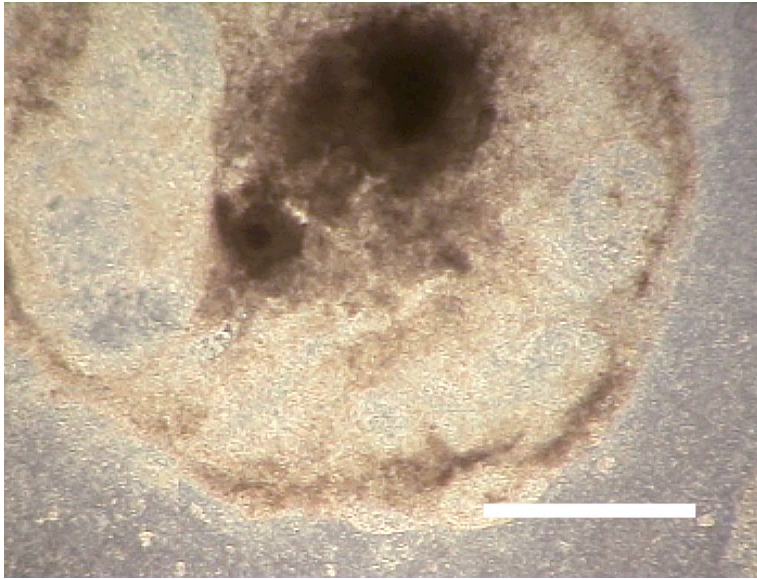


Abb. 6: Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines von der Firma ESI zur Verfügung gestellten kontrahierenden EBs. Die EBs bestanden zu 10-20% aus Kardiomyozyten und wurden nach Trypsinverdau zur Herstellung von hES-Zell-EHTs verwendet. Maßstab: 100 µm.

2.5 Engineered Heart Tissue (EHT)

EHTs wurden aus Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad (gewonnen aus ES-Zellen), Kollagen Typ 1, Matrigel und serumhaltigem (Pferdeserum und Hühnerembryonenextrakt [CEE]) Kulturmedium generiert. Kollagen und CEE wurden im Rahmen dieser Arbeit selber hergestellt.

2.5.1 Herstellung von Kollagen Typ I

Von 4 Rattenkadavern (Wistar) wurden die Schwänze abgetrennt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C gelagert. Vor der Kollagenpräparation wurden die Rattenschwänze aufgetaut und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Kollagenpräparation unter sterilen Bedingungen. Nach Inzision in der Längsachse des Schwanzes wurde die Haut mithilfe einer chirurgischen Pinzette entfernt. Die bindegewebigen, Kollagen I-enthaltenden Fasern wurden mit Skalpell und Pinzette abgetrennt und in PBS gewaschen. Darauf wurden diese in Essigsäure (0,1% in Aqua ad iniectabilia) unter permanentem Rühren über Nacht bei 4 °C fast vollständig gelöst. Nach Zentrifugation (20.000 g, 2 h, 4 °C) zur Abtrennung von nicht gelösten Geweberesten wurde der Überstand gesammelt. Zur Erhöhung der Salzkonzentration auf 4% wurde unter ständigem Rühren NaCl-Lösung (25% in Aqua ad iniectabilia; 4 °C) zugegeben. Das Kollagen wurde so bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend pelletiert (20.000 g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter Rühren über Nacht bei 4 °C in Essigsäure (0,1% in Aqua ad iniectabilia) aufgenommen. Durch zweimalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1%

in Aqua ad iniectabilia) bei 4 °C wurde der NaCl-Gehalt in der Kollagensuspension auf unter 0,9% reduziert. Die Bestimmung der Kollagenkonzentration erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen *Sirco*[®]-Assays. Reinheit und Konzentration des Kollagens wurden durch SDS-PAGE und anschließender Coomassiefärbung überprüft.

2.5.2 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt (CEE)

60 bebrütete Hühnereier (7.–9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert und am runden Pol geöffnet. Die Embryonen wurden steril entnommen, dekapitiert und in eine autoklavierte Flasche mit 300 ml PBS, 400 U/ml Penicillin und 400 µg/ml Streptomycin überführt. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis homogenisiert (Polytron[®]), zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C), in 300 ml PBS resuspendiert, erneut homogenisiert und anschließend zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Der zweite Überstand wurde mit dem ersten gepoolt. Der Extrakt wurde mikrobiologisch auf Kontamination mit Bakterien und Mykoplasmen geprüft und in Aliquots bei –20 °C gelagert. Eine Präparation ergab ein Gesamtvolumen von 180-230 ml CEE.

2.5.3 Herstellung von EHTs

In autoklavierbare Glaskulturschalen (Ø 6 cm) wurden je 4 Silikonschläuche (Ø 1 mm, etwa 80% Schalenhöhe) eingeklebt. Über diese Schläuche wurden Teflonscheiben (Ø 4 mm) gestülpt und die Schalen 5 mm hoch mit Silikon ausgegossen. Nach Aushärten des Silikons wurden die Teflonscheiben entfernt, so dass vier Vertiefungen von 4 mm Durchmesser mit zentralem Docht entstanden. Die Silikondochte wurden mit Teflonzylindern bestückt (Ø 2 mm). Dadurch entstanden 4 ringförmige Gussformen (Innendurchmesser 2 mm, Außendurchmesser 4 mm) mit einem Fassungsvermögen von je 450 µl (Abb. 7A). Die Kulturschalen wurden ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert.

Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Kollagen-Matrigel-Gemischs zu verhindern. Es wurde immer die gleiche Pipettierreihenfolge eingehalten. Kollagen Typ I wurde vorgelegt und volumengleich mit 2xMedium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemisches wurde mit NaOH (0,1 N) neutralisiert. Nach Zugabe von extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Matrigel[®]) erfolgte anschließend die Zugabe der Zellsuspension. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades (undifferenzierte ES-Zellen, Zellen aus EBs, selektionierte Kardiomyozyten aus Differenzierungskulturen) alleine oder zusammen mit murinen kardialen Nichtkardiomyozyten eingesetzt. Entsprechende Protokolle werden im Ergebnisteil detailliert dargestellt. Nach fünfmaligem Triturieren wurden zügig 450 µl der EHT-Mischung in jede Vertiefungen zwischen Silikon und Teflonröhrchen der autoklavierten

Kulturschalen pipettiert. Diese Mischung wurde für 1 h bei 37 °C, 5% CO₂ und 40% O₂ inkubiert, um eine leichte Aushärtung des Kollagen-Zell-Gemisches zu erreichen. Danach erfolgte die Zugabe von 6 ml Differenzierungsmedium 2 pro Kulturschale.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs aus ES-Zellen:

Kollagen Typ I (4,5 mg/ml)	392 µl	à 0,4 mg/EHT
2xMedium	478 µl	
NaOH (0,1 N)	86 µl	
Extrazelluläre Matrix	200 µl	à 10% v/v
Zellsuspension	844 µl	

2xMedium: 5 ml 10xDMEM, 5 ml Pferdeserum, 1 ml CEE, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin mit Aqua ad iniectabilia auf 25 ml aufgefüllt.

2.5.4 ES-Zell-EHT-Kultur

EHTs wurden zunächst 3 Tage in den zirkulären Kulturschalen mit 6 ml Differenzierungsmedium 2 pro Kulturschale kultiviert (7% CO₂, 40% O₂, 37 °C). Dann wurden die um den Teflonzylinder kondensierten EHTs vorsichtig herausgehoben und auf eine statische, vor Gebrauch autoklavierte Haltevorrichtung gespannt und maximal (6-8 mm) gedehnt (Abb. 7B). Die Kultur auf den Dehnungsvorrichtungen (28 Tage bei mES- und 7-21 Tage bei hES-Zell-EHTs) wurde mit wöchentlichem Mediumwechsel in 10 cm-Kulturschalen durchgeführt (50 ml Differenzierungsmedium 2 pro Kulturschale).

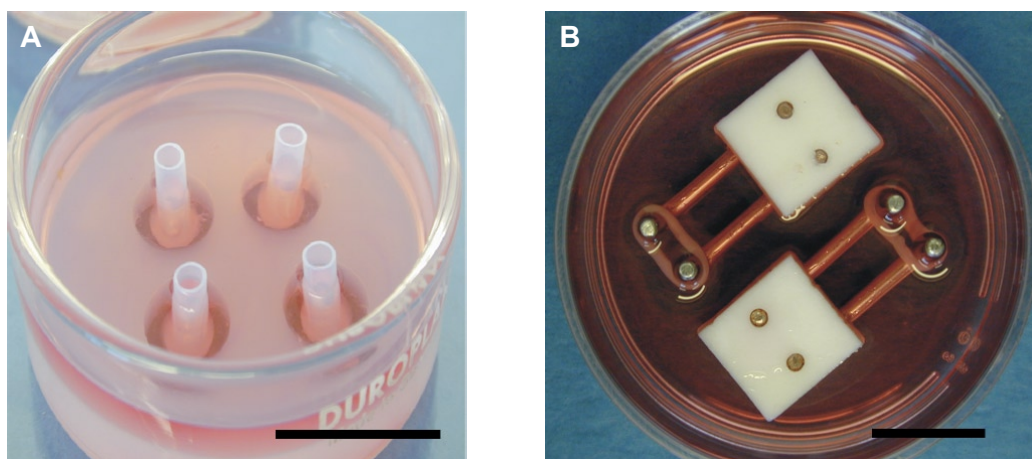


Abb. 7: EHT-Herstellung und -Kultur. (A) 4 Gussformen mit kondensierten EHTs. (B) An Kulturtag 3 wurden EHTs auf statische Dehnungsapparaturen transferiert und weiter kultiviert. Maßstäbe: 1 cm.

2.5.5 Gewinnung von murinen Nichtkardiomyozyten

Neonatale NMRI-Mäuse wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in einer Kulturschale mit gekühltem, calcium- und bicarbonatfreien Hanks Puffer mit HEPES (CBFHH) bis zur weiteren Bearbeitung zwischengelagert. Die anschließende Zellpräparation und Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) und das Zellsieb wurden vor jeder Präparation autoklaviert.

Die isolierten Herzen 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 bis auf eine Größe von kleiner als 2 mm³ zerkleinert. Mit einer weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der Gewebestücke in ein 50 ml-Sammelgefäß, in dem nach weiterem dreimaligen Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin durchgeführt wurde. Die Anzahl der Herzen pro Verdau schwankte zwischen 50 und 70. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 9 ml Trypsin-Arbeitslösung versetzt und für 10 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Desaga SM1, Sarstedt, Nümbrecht; Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min) inkubiert. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Nach Resuspendieren der Gewebestücke in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung und einer Inkubation (10 min) unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml-Sammelgefäß, das 2 ml hitzeinaktiviertes FCS zur Hemmung der enzymatischen Aktivität des Trypsins enthielt, überführt. Nach Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (9 ml) und Triturieren (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 Proteinverdau und Inaktivierung des Trypsins durch in der DNase-Arbeitslösung enthaltenes FCS wurde unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml Schritten auf 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung) jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes durchgeführt. Während der Präparation wurden die bereits isolierten Zellen auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C) und pro Sammelröhrchen in 2 ml Nichtkardiomyozyten-Medium (NKM-Medium) resuspendiert und vereinigt. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (0,8% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert. Nach Trituration wurden die Zellen erneut pelletiert (60 g, 15 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 30 ml NKM-Medium resuspendiert und durch ein Zellsieb (Maschengröße: 250 µm) gegeben. Die Zellsuspension wurde auf vier 10 cm-Zellkulturschalen verteilt. Das Volumen wurde auf 10 ml pro Schale mit NKM-Medium aufgefüllt und die Zellen für ca. 1 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit adhärten v.a. die Nichtkardiomyozyten

am Kulturschalenboden. Der Überstand, der zu ca. 70% aus Kardiomyozyten bestand, wurde für andere Versuche, die nicht Bestandteil dieser Arbeit waren, verwendet. Die Nichtkardiomyozyten wurden durch Verdauung mit MEF-Trypsin abgelöst und nach Inaktivierung des Trypsins mit doppeltem Volumen MEF-Medium verwendet.

<u>CBFHH:</u>	NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, MgSO ₄ 70,81 mM, Glucose 5,55 mM, KH ₂ PO ₄ 0,44 mM, Na ₂ HPO ₄ 70,34 mM, HEPES 20 mM; lösen in Aqua ad iniectabilia; pH 7,5
<u>Trypsin-Stammlösung:</u>	100 mg Trypsin pro ml CBFHH; bei 4 °C mindestens 12 h rotierend lösen; vor Gebrauch steril filtrieren
<u>Trypsin-Arbeitslösung:</u>	1,5 ml Trypsin-Stammlösung, 0,7 ml DNase-Stammlösung, 0,5 ml Penicillin (Stamm: 10.000 U/ml)/Streptomycin (Stamm: 10.000 µg/ml)-Mischung, CBFHH ad 50 ml
<u>FCS, inaktiv:</u>	FCS wurde bei mehrmaligem Umschwenken 1 h im Wasserbad auf 56 °C erhitzt
<u>DNase-Stammlösung:</u>	100 mg DNase in 50 ml PBS; steril filtrieren; Lagerung bei -20 °C
<u>DNase-Arbeitslösung:</u>	1 ml FCS (inaktiviert), 0,7 ml DNase-Stammlösung, 0,5 ml Penicillin (Stamm: 10.000 U/ml)/Streptomycin (Stamm: 10.000 µg/ml)-Mischung, CBFHH ad 50 ml
<u>NKM-Medium:</u>	DMEM, 10% FCS (inaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin

2.6 *In vitro*-Charakterisierung von EHTs

2.6.1 Isometrische Kontraktionsexperimente mit EHTs

Nach 28 Kulturtagen wurden die mES-Zell-EHTs zunächst ohne Vordehnung in temperierte (37 °C), mit Tyrode-Lösung gefüllte Organbäder zwischen ein Haltehäkchen und einen induktiven Kraftaufnehmer aufgehängt (Abb. 8) [58]. Die Tyrode-Lösung wurde zur pH-Einstellung (pH 7,4) mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast. Nach einer Äquilibrationszeit von 15 min wurden die mES-Zell-EHTs elektrisch stimuliert (Pulsfrequenz 4-8 Hz, Pulsdauer 5 ms, Stromstärke 10% über Schwelle, 120-160 mA). Bis zum Erreichen eines stabilen Kraftniveaus wurden die EHTs vorgedehnt. Alle Messungen der Kontraktionskraft wurden bei optimaler Vordehnung (L_{max}) durchgeführt. Neben kumulativen Konzentrationswirkungskurven für Calcium (0,4-2,0 mmol/l) wurde das Ansprechen auf β-adrenerge Stimulation mit Isoprenalin (10⁻⁶ mol/l bei 0,4 mmol/l Calcium) untersucht. Nach jeder Substanzzugabe wurde bis zum Erreichen eines Äquilibriums

mindestens 5 min gewartet, bevor eine weitere Intervention vorgenommen wurde. Die Kontraktionskraftmessung der hES-Zell-EHTs erfolgte analog, wobei die Stimulationsfrequenz 1,5 Hz betrug. Dabei wurden kumulative Konzentrationswirkungskurven für Calcium (0,2-2,8 mmol/l) und das Ansprechen auf Isoprenalinstimulation (10^{-6} mol/l bei 0,4 mmol/l Calcium) untersucht. Die Erfassung der Daten erfolgte mittels eines PC-gestützten Biomonitoring Systems (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Die Messverstärker wurden vor jeder Messung kalibriert. Die Ausgabe der minimalen und maximalen Kraft erfolgte durch die Messsoftware als Mittelwert einer Sekunde. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler Kraft und der Grundspannung errechnet (Abb. 9). Die Auswertung der Kontraktionskinetik erfolgte in der Regel als Anspannungszeit (T1) von 50% Kontraktion bis maximaler Kontraktion, als Relaxationszeit (T2) von maximaler Kontraktion bis 50% Relaxation oder als totale Kontraktionszeit (TD) von 50% Kontraktion bis 50% Relaxation (Abb. 9).

Tyrode-Lösung: 119,8 mmol/l NaCl, 5,4 mmol/l KCl, 0,2-2,8 mmol/l CaCl₂, 1,05 mmol/l MgCl₂, 22,6 mmol/l NaHCO₃, 0,42 mmol/l NaH₂PO₄, 5,05 mmol/l Glucose, 0,05 mmol/l Na₂EDTA und 0,28 mmol/l Ascorbinsäure in Aqua bidest.

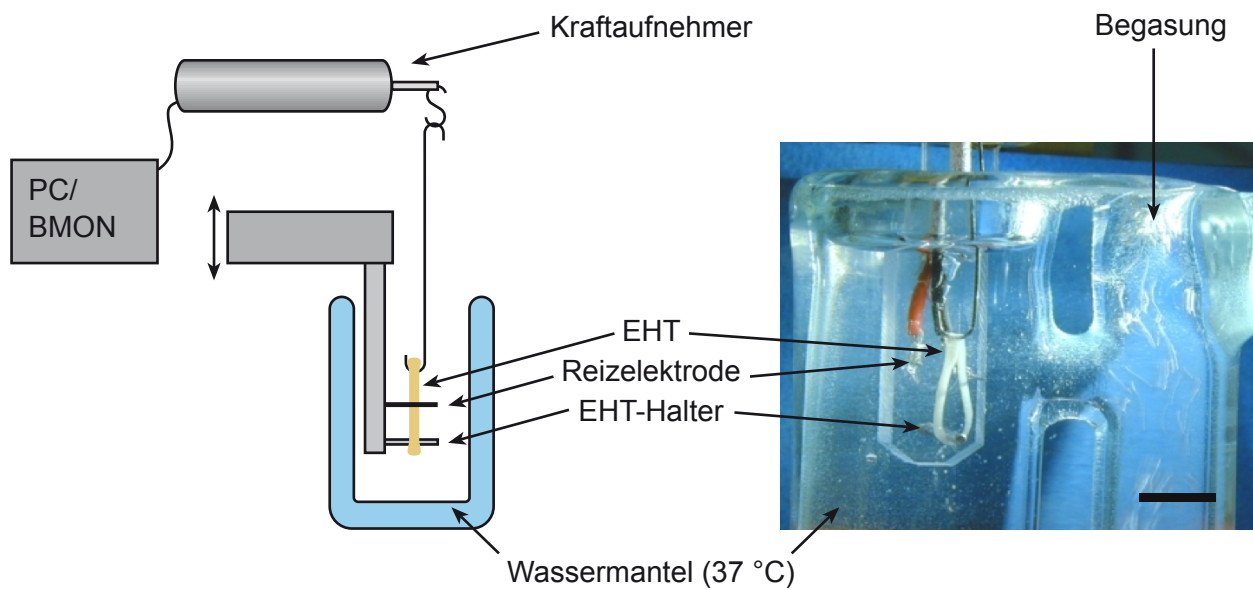


Abb. 8: Isometrisches Kontraktionsexperiment. EHTs wurden zwischen einem Haltedraht und einem induktiven Kraftaufnehmer gespannt und elektrisch stimuliert. Maßstab: 1 cm.

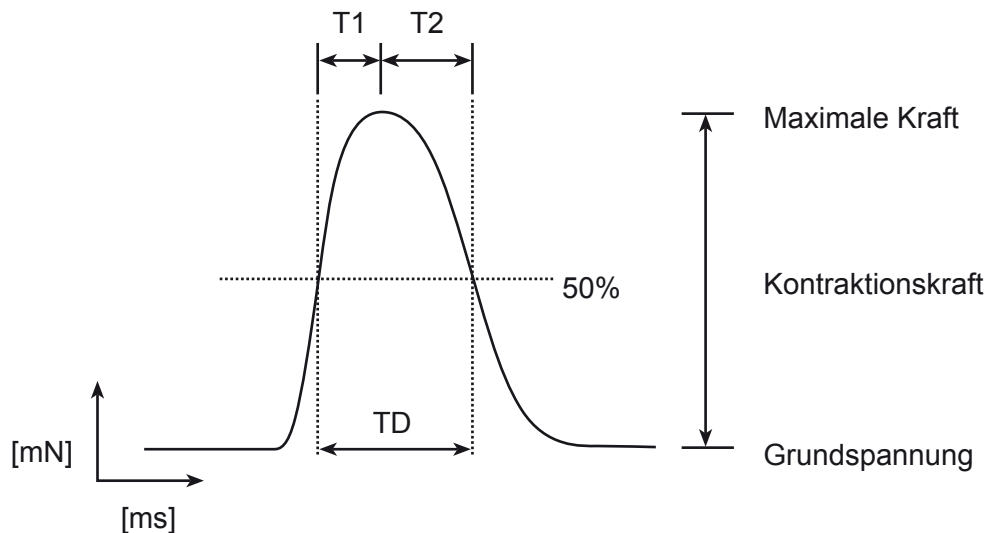


Abb. 9: Darstellung der Kontraktionsparameter anhand einer Einzelkontraktion. T1: Anspannungszeit von 50% Kontraktion bis maximaler Kontraktion; T2: Relaxationszeit von maximaler Kontraktion bis 50% Relaxation; TD: totale Kontraktionszeit von 50% Kontraktion bis 50% Relaxation.

2.6.2 Analyse der Kontraktionsfrequenz

Die Spontanfrequenz von mES-Zell- und hES-Zell-EHTs wurde ebenfalls im Rahmen der isometrischen Kontraktionsexperimente aufgezeichnet. Darüber hinaus wurde das Ansprechen von hES-Zell-EHTs auf chronotrope pharmakologische Stimuli mikroskopisch unter Echtzeitaufzeichnung von Bewegungsartefakten (*Edge-Detection*) per Ein-Zelllinien-*Scanning*-Technik mit einem *Laser-Scanning*-Mikroskop bei 37 °C in HEPES ([2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure])-gepufferter Tyrode-Lösung (HEPES-Tyrode-Lösung) bewertet.

HEPES-Tyrode-Lösung: 134 mmol/l NaCl, 4 mmol/l KCl, 1,8 mmol/l CaCl₂, 1,2 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l NaH₂PO₄, 11,0 mmol/l Glucose, 10,0 mmol/l HEPES in Aqua bidest.

2.6.3 Morphologische Untersuchungen

Für lichtmikroskopische und *laser-scanning*-mikroskopische Analysen wurden EHTs 12-15 h in 4% Formalin/PBS bei 4 °C fixiert und anschließend 8-12 h in TBS gewaschen. Darauf wurden die Proben in Agarose (4%) eingegossen, um die Handhabung der Gewebeproben im weiteren Aufbereitungsprozess zu vereinfachen. Für elektronenmikroskopische Analysen wurden EHT-Fragmente (1x2 mm) in 2,5% Glutaraldehyd/PBS mit 30 mM Butandionmonoxim (BDM) und 0,1 mM Calcium über Nacht fixiert und anschließend in TBS gewaschen.

10xTBS: Trishydroxymethylaminmethan *ultra pure* (TBS) 121,14 g, NaCl 180 g in 2000 ml aqua dest.; pH 7,4

2.6.3.1 Lichtmikroskopie

Paraffineinbettung

Die in Agarose eingeblockten, fixierten EHTs wurden in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe entwässert und in Paraffinblöcke, wie in Tabelle 1 dargestellt, eingebettet.

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

Tabelle 1: Protokoll zur Paraffineinbettung

Paraffinschnitten und H&E-Färbung

Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die nach dem Strecken in einem Wasserbad (52 °C) auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen wurden. Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 2 h bei 60 °C inkubiert und danach in Xylol entparaffiniert. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Ethanol-Reihe gewässert. Nach Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und in abschließendem Xylolbad wieder entwässert und mit Eukitt® eingedeckelt (siehe Tabelle 2). Morphologische Analysen wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop durchgeführt und mit einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss) dokumentiert.

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

Tabelle 2: Protokoll zum Eindeckeln von Paraffinschnitten

Poly-L-Lysin-Beschichtung: Objektträger wurden mit Aceton gereinigt, in destilliertem Wasser gewaschen, für 30 min bei Raumtemperatur in poly-L-Lysin (1 mg/ml) inkubiert, wieder in destilliertem Wasser gewaschen und 5-10 h bei 60 °C getrocknet. Die beschichteten Objektträger wurden innerhalb einer Woche verwendet.

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

Hämalaunlösung nach Mayer: 1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest gelöst, 0,2 g NaJO₃ und 50 g KAl(SO₄)₂ einrühren (blauviolette Lösung), 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zugeben, bis die Lösung rotviolett wird; vor Gebrauch filtrieren

Paraffinschnitte und Immunhistochemie

Mikrotomschnitte wurden wie oben beschrieben aus Implantatgewebe angefertigt und nach Antigendemaskierung mit einem polyklonalen Anti-GFP-Antikörper (Kaninchen, Verdünnung: 1:200-1:1000; abcam) markiert (immunhistochemische Färbung durch PD Dr. rer. nat. R. Simon; Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Toluidin-Färbung

In Agarose eingebettete EHTs wurden mit einem Vibratom geschnitten (150 µm). Diese Schnitte wurden in Toluidinblau 0,5% (w/v in 70% EtOH) für 2 h gefärbt und anschließend für 5 min in demineralisiertem Wasser entfärbt. Die Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop und einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss).

LacZ-Färbung

Kontrahierende EBs transgener αMHC-NIGIL-mES-Zelllinien wurden mit einer Pipette gepickt und mit 2%iger Formaldehydlösung, die 0,2% Glutaraldehyd enthielt, fixiert (1 min). Anschließend wurden die EBs in PBS gewaschen und für 30 min bei 37 °C in X-Gal-Färbelösung inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop und einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss).

Färbelösung: 2 mM MgCl₂, 5 mM K₃[Fe(CN)₆], 5 mM K₄[Fe(CN)₆] in PBS

X-Gal-Färbelösung: 1 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid; gelöst als 40 mg/ml in DMSO) in Färbelösung bei 37 °C

2.6.3.2 Konfokale *Laserscanning* Mikroskopie

Immunfluoreszenzfärbung

Vibratomschnitte (100 µm) wurden laut Protokoll in Tabelle 3 immunfluoreszenzmarkiert. Die Proben wurden mit Triton X-100 permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit FCS und bovinem Serumalbumin (BSA) belegt.

Blocklösung: 10% FCS, 1% BSA, 0,5% Triton X-100, 0,05% Thimerosal in TBS

Antikörperlösung: 1% BSA, 0,5% Triton X-100, 0,05% Thimerosal in TBS

Mowiol 4-88: 12 g Mowiol 4-88 in 30 ml H₂O lösen, 60 ml 0,2 M Tris-Puffer (pH 8,5) zugeben, über Nacht bei RT rühren, auf 90 °C für 45 min erhitzen, auf 50 °C abkühlen lassen, 30 g fluoreszenzfreies Glycerin einrühren; pH 8,5; Lagerung bei -20 °C

1.	Blocklösung	RT	1 h
2.	TBS	RT	5 min
3.	Primärer Antikörper	4 °C	über Nacht in einer Feuchtkammer
4.	TBS	RT	4x10 min
5.	sekundärer Antikörper	RT	2 h in einer Feuchtkammer
6.	TBS	RT	4x10 min
7.	Eindeckeln mit Mowiol 4-88	bei 4 °C im Dunkeln lagern	

Tabelle 3 : Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde folgender primärer Antikörper verwendet:
Anti- α -sarkomerisches Aktinin (Maus, IgG1, Klon EA-53, Verdünnung 1:800; Sigma)

Folgender sekundärer Antikörper wurde verwendet:

Anti-Maus IgG (Ziege; *Label*: Alexa 488, Verdünnung: 1:800; *Molecular Probes*)

2.6.3.3 Ultrastrukturanalyse mittels Elektronenmikroskopie

Glutaraldehyd-fixierte Präparate wurden für 2 h bei RT in 1% Osmiumtetroxyd und 1,5% Kaliumhexacyanoferrat III/PBS postfixiert. Nach erneutem Waschen in PBS über Nacht bei 4 °C wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanol-Acetonreihe dehydriert und in Epon mit 2% 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30) eingegossen (s. Tabelle 4). Nach Anfertigung von ultradünnen Schnitten (50 nm) und Aufziehen der Schnitte auf Kupfergitter wurden die Schnitte mit 10% Uranylacetat in 40% Ethanol (10 min, RT) und 2,8% Bleicitrat in 0,16 molarer NaOH (5 min, RT) kontrastiert. Nach Spülen mit Wasser wurden die Präparate mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss Leo 906 EM) betrachtet.

1.	2,5% Glutaraldehyd in PBS	über Nacht	4 °C
2.	PBS	über Nacht	4 °C
3.	1% Osmiumtetraoxyd + 1,5% Kaliumhexacyonoferrat (III) in PBS	2 h	RT
4.	PBS	3x10 min	RT
5.	PBS	über Nacht	4 °C
6.	70% Ethanol	1 h	RT
7.	80% Ethanol	30 min	RT
8.	90% Ethanol	30 min	RT
9.	100% Ethanol	2x30 min	RT
10.	50% Aceton in Ethanol	30 min	RT
11.	Aceton	30 min	RT
12.	33% Epon in Aceton	30 min	RT
13.	66% Epon in Aceton	30 min	RT
14.	Epon mit 2% DMP 30 I	über Nacht	4 °C
15.	Epon mit 2% DMP 30 II	über Nacht	60 °C
16.	Epon mit 2% DMP 30 III	über Nacht	80 °C

Tabelle 4: Protokoll zur Eponeinbettung für TEM-Untersuchungen

2.6.4 Quantifizierung des RNA- und DNA-Gehalts von mES-Zell-EHTs

2.6.4.1 RNA-Isolation aus mES-Zell-EHTs

Die EHTs wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 600 µl TRIzol® versetzt und auf Eis homogenisiert (Polytron®). Das Homogenat wurde mit 120 µl Chloroform vermischt und für 15 sec gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei RT wurden die Proben zur Beschleunigung der Phasenaufftrennung zentrifugiert (4 °C, 15 min, 12.000 g). Die wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Die phenolische Phase und die Interphase wurden für die anschließende DNA-Präparation auf Eis aufbewahrt. Der wässrige Überstand wurde mit 600 µl eisgekühltem Isopropanol versetzt, kurz gevortext und 10 min bei RT inkubiert.

Die RNA wurde pelletiert (12.000 g, 4 °C, 10 min), der klare Überstand verworfen und das Pellet in 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (7.500 g, 4 °C, 5 min) wurde das Pellet bei RT für 5-10 min getrocknet. Das Präzipitat wurde in 10 µl DEPC-Wasser gelöst und 10 min bei 60 °C zur Lösung von RNA-Doppelsträngen erwärmt. Danach wurden die Proben direkt auf Eis gestellt. Die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD 260/280 gebildet. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

DEPC-Wasser: 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) auf 1 l H₂O (0,1%) über Nacht bei RT unter ständigem Rühren lösen; autoklavieren

2.6.4.2 DNA-Isolation aus mES-Zell-EHTs

Die DNA-Präparation erfolgte im Anschluss an die RNA-Isolation aus der phenolischen Phase. Nach vollständigem Entfernen der hydrophilen Phase (RNA-haltig) wurde die phenolische Phase mit 240 µl Ethanol (100%) versetzt. Nach mehrfacher Inversion wurde die Mischung für 3 min bei RT inkubiert und die DNA pelletiert (2.000 g, 4 °C, 5 min). Das DNA-Pellet wurde in 1,2 ml 75% Ethanol aufgenommen und im Schüttelinkubator inkubiert (1.200 U/min, 20 min). Darauf wurde die DNA mittels Zentrifugation (2.000 g, 5 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets 15 min luftgetrocknet. Anschließend wurden die Pellets in 500 µl 8 mM NaOH (pH 9) über Nacht bei 37 °C und 1.200 U/min im Schüttelinkubator resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.7 Implantation von hES-Zell-EHTs

2.7.1 Narkose

Die Versuchstiere (männliche Wistar-Ratten, 300 g) wurden kurz mit CO₂ betäubt und anschließend durch Intubation mittels Isofluran-Inhalationsnarkose anästhesiert. Als Trachealtubus diente eine 18 G Venenverweilkanüle. Nach Intubation unter Sicht wurde die Narkose unter Isofluran (2%) fortgesetzt. Der korrekte Sitz des Tubus wurde durch Beobachtung eines regelmäßigen und beidseitigen Hebens und Senkens des Brustkorbs verifiziert. Die Beatmungsfrequenz betrug 48/min, der Gasvolumenfluss 0,5 l/min, der zeitliche Anteil der Inspiration 40% und der Beatmungsdruck zu Beginn der Implantation 120 mbar. Die Extremitäten wurden in Rückenlage fixiert, Bauch- und Brusthaare entfernt und das Operationsgebiet desinfiziert. Die

Körperkerntemperatur der Tiere wurde während des gesamten Eingriffs durch eine Wärmeplatte konstant bei 37 °C gehalten.

2.7.2 EHT-Implantation

Nach Narkoseeinleitung erfolgte der Zugang zum Herzen über eine linkslaterale Thorakotomie. Dabei wurde zunächst eine 3 cm große Hautinzision am Rand des *M. cutaneus trunci* durchgeführt. Anschließend wurde sowohl der *M. cutaneus trunci* als auch der *M. latissimus dorsi* entlang der Faszien mobilisiert und mit Haken nach kranial bzw. kaudal fixiert. Die *Mm. intercostales* wurden zwischen vierter und fünfter Rippe durchtrennt, die Pleura eröffnet und ein Retraktor in die Thoraxöffnung zwischen die Rippen gesetzt und gespannt. Das Herz wurde mobilisiert und das Perikard sorgfältig mit einer chirurgischen Pinzette entfernt. Pro Herz wurde ein hES-Zell-EHT nach siebentägiger Kultur auf statischen Dehnungsvorrichtungen anterior-apikal aufgebracht und mit 2 Einzelknopfnähten (5-0 Ethibond®, Ethicon) direkt auf dem Herzmuskel fixiert. Anschließend wurde vorhandenes Blut mit einem Tupfer aus dem Thorax entfernt. Der Thorax wurde mit zwei doppelten chirurgischen Knoten in maximaler Inspiration bei einem auf 180 mbar erhöhten Beatmungsdruck dicht geschlossen, um einen postoperativen Lungenkollaps zu vermeiden. Zusätzlich wurden zum Wundverschluß eine Muskelnaht und eine fortlaufende Hautnaht vorgenommen. Zur Entlastung des Herzens wurde den Tieren 1,6 mg/kg KG Furosemid intraperitoneal injiziert. Nach Einsetzen der Spontanatmung wurden die Versuchstiere extubiert und in Einzelkäfigen bei Wasser und Futter ad libitum gehalten. Die gesamte Operation von Einleitung bis Ausleitung der Narkose dauerte durchschnittlich 30 min. Alle Versuchstiere überlebten die EHT-Implantation.

2.7.3 Immunsuppression

Den Versuchstieren wurde täglich eine Immunsuppression, bestehend aus 5 mg/kg KG Ciclosporin A, 2 mg/kg KG Azathioprin und 2 mg/kg KG Methylprednisolon, verabreicht. Die Substanzen wurden kurz vor der Operation und dann täglich subkutan mit einer 1 ml Insulinspritze in einer CO₂-Kurzarkose verabreicht.

2.7.4 Explantation

Die Explantation der Implantate erfolgte 7 bzw. 21 Tage nach Implantation. Die Tiere wurden dafür erneut mit Isofluran narkotisiert. Bei Öffnung des Thorax wurden Verwachsungen vorsichtig gelöst, oder das Herz mit Implantat und Thoraxwand *en bloc* entfernt. Die Explantate wurden kurz in PBS gewaschen und zur weiteren histologischen Aufarbeitung in 4% Formalin/PBS fixiert (4 °C, 12 h).

2.8 Statistik

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

2.9 Material

2.9.1 Substanzen

- Aceton, Apotheke Roth, Deutschland
- Agarose, Invitrogen, Deutschland
- Ampicillintrihydrat, Serva, Deutschland
- Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn GmbH, Deutschland
- Ascorbinsäure, Merck, Deutschland
- Azathioprin, Imurek®, GlaxoSmithKline, Deutschland
- Bacto Trypton, Becton Dickinson, USA
- Bacto Yeast-Extract (Hefe-Extrakt), Becton Dickinson, USA
- *BigDye Terminator Ready Reaction Mix*, Applied Biosystems, Deutschland
- Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma Chemical Co., USA
- Bovines Serumalbumin (BSA), 100x, NEB, USA
- 5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal), Sigma, Deutschland
- *Calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP), NEB, USA
- Calciumchlorid (CaCl_2), Merck, Deutschland
- Carbacholhydrochlorid, Sigma Chemical Co., USA
- Carbogengas (95% O_2 , 5% CO_2), Linde AG, Deutschland
- *Chick embryo extract*, Hühnerembryonenextrakt, CEE, eigene Herstellung
- Chloroform, Merck, Deutschland
- Ciclosporin A, Sandimmun®, Novartis, Deutschland
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), Sigma, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deutschland
- DMEM, Gibco-BRL, Deutschland
- DNA ladder, 1 kb, NEB, USA
- DNA ladder, 100 bp, NEB, USA
- dNTP-Mix, MBI Fermentas, USA

- D-PBS, Gibco, Deutschland
- Eosin G, gelblich, Merck, Deutschland
- Ethanol, Apotheke Roth, Deutschland
- Ethidiumbromid-Lösung, wässrig, 1%, Fluka, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na₂EDTA; Titriplex® III), Merck, Deutschland
- ExpressHyp Hybridisierungslösung, BD Bioscience, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FCS), 0,1 µm steril filtriert, Gibco, Deutschland
- Formaldehyd, säurefrei mindestens 37%, Merck, Deutschland
- Formalin Solution Roti Histofix 4%, Carl Roth, Deutschland
- Furosemid, Lasix® 20 mg Injektionslösung, Aventis Pharma, Deutschland
- Gelatine, Sigma, Deutschland
- Geneticinsulfat (G418), Gibco, Deutschland
- Glucose, Merck, Deutschland
- Glutamin (100x=200 mM), Gibco-BRL, Deutschland
- Glycerol, Merck, Deutschland
- Glycin, fluoreszenzfrei, Sigma Chemical Co, USA
- Hämatoxylin, Sigma Chemical Co, USA
- Harbor Extracellular Matrix, TEBU GmbH, Deutschland
- Hybridisierungslösung ExpressHyb Solution, BD Bioscience, USA
- Hydrogenchlorid (HCl), Merck, Deutschland
- [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES), Sigma Chemical Co., USA
- Hygromycin, Sigma, Deutschland
- Isofluran, Baxter International Inc, USA
- (±)-Isoprenalin-HCl, Sigma Chemical Co, USA
- Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) Sigma, Deutschland
- Isopropranolol, Merck, Deutschland
- Kaliumhexacyonoferrat III, Sigma, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), Merck, Deutschland
- *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), 10⁷ U/ml, Esgro Chemicon, Deutschland
- Lithiumchlorid (LiCl), Merck, Deutschland
- *Loading dye*, 6x, Fermentas, Deutschland
- *Mega prime DNA Labeling System*, Amersham, Deutschland
- Magnesiumchlorid (MgCl₂), Merck, Deutschland
- Magnesiumsulfat (MgSO₄), Merck, Deutschland
- Methanol, Merck, Deutschland
- MEM, *non-essential amino acids*, Gibco, Deutschland
- 2- Mercaptoethanol, Gibco, Deutschland

- Methylprednisolon, Urbason®, Aventis, Deutschland
- Mineralöl, Sigma, Deutschland
- Minimal Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Life Technologies LTD, Schottland
- Mitomycin C, Sigma, Deutschland
- Mowiol 4-88, Calbiochem, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Merck, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Merck, Deutschland
- Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Deutschland
- Natriumpyruvat, Gibco, Deutschland
- NEBuffer 1-4, NEB, USA
- NucleoSpin plasmid isolation kit, Macherey & Nagel, Deutschland
- Osmiumtetroxyd, Sigma Chemical Co, USA
- ³²P-dCTP, Amersham, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (100x; P/S), Gibco-BRL, Deutschland
- Pferdeserum, Gibco-BRL, Deutschland
- *PrimeSTAR HS DNA Polymerase*, Takara Bio Europe, Frankreich
- *Prime-IT RmT Random Primer Labeling Kit*, Amersham, Deutschland
- Puffer P1, P2, P3, Qiagen, Deutschland
- *Qiaquick Gel Extraction Kit*, Qiagen, Deutschland
- Sodium-dodecyl-sulfat (SDS), Sigma Chemical Co, USA
- T4 DNA Ligase, NEB, USA
- T4 DNA Ligase *buffer*, NEB, USA
- Thimerosal, Sigma Chemical Co, USA
- *Tissue freezing medium* (Tissue Tec®), Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
- Topo® *Cloning Vector*, Invitrogen, Deutschland
- 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (DMP30), Sigma, Deutschland
- Trishydroxymethylaminmethan (Tris), Merck, Deutschland
- Triton-X 100, Fluka, Deutschland
- Trypsin EDTA, Gibco, Deutschland
- Xylol, Roth, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen verfügten über den höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

2.9.2 Hilfsmittel und Geräte

- Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT, Bio-Rad Laboratories, USA
- Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Deutschland

- Brutschrank, Hera cell 240, Heraeus Instruments, Deutschland
- Brutschrank, BBD 6220 Heraeus Instruments, Deutschland
- *Cell Counter* CASY, Schärfe System, Deutschland
- Chirurgische Fäden, Ethicon Prolene, Johnson-Johnson Intl, Belgien
- Chromatographierpapier 3MM Whatman, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Curix cassette 35X43 cm, AGFA-GEVAERT, USA
- Einfriergefäße 1,8 ml, Nunc, Deutschland
- Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml, B.Braun Melsungen AG, Deutschland
- Elektroporationsküvette, BioRad Laboratories, USA
- Eppendorf *Safe Lock* Reaktionsgefäße, Deutschland
- Feinanalysewaage, Mettner H51, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera, Carl Zeiss, Deutschland
- Fuji *Imaging Plate* 23X40 cm, FUJI, Deutschland
- *Gene Pulser* II Bio-Rad Laboratories, USA
- *GeneScreen* plus Membran NEF 1017, NEN, USA
- Heizplatte, FMI EHE-3501, Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland
- *Hybridization Bottles* HB-OV-BM, Thermo EC, USA
- *Hybridization mini oven* MKII HYBAID, Thermo EC, USA
- Isofluran Vapor 19,3; Drägerwerk AG, Deutschland
- Konfokales *Laser Scanning* Mikroskop, LSM 510 Meta auf Axiovert 100, Zeiss, Deutschland
- Kraftaufnehmer, Ingenieurbüro G. Jäckel, Deutschland
- Kryotom, CM 3050S, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
- Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200, Beckman Instruments Inc., USA
- Kulturschalen, Nunc, Deutschland
- Kulturschalen (Polymethylpenten), Nalge Co, Nalgene Labware Div., USA
- Mikroskop, Labovert, Leitz, Deutschland
- Mikroskop, Axioplan, Carl Zeiss, Deutschland
- Mikrowelle, SHARP, Deutschland
- Multikanalpipetten, 8 und 12 Kanäle, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Deutschland
- Nitrozellulosemembran Protan BA85, 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Parafilm, American National, USA
- Pasteur Pipetten, Brand GmbH, Deutschland
- pH-Meter, Knick GmbH, Deutschland
- *Phospho Imager* FLA 3000, Fujifilm, Deutschland
- Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl, Sarstedt, Deutschland
- Pipetten, 10 ml , wide tip with plug, Becton Dickinson Labware, USA

- Pipetten (serologisch), 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Sarstedt, Deutschland
- Pipettenspitzen, Sarstedt, Deutschland
- Pipettierhilfe, pipettus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- *Power Pac Basic supply*, Bio-Rad Laboratories, USA
- Präparationsbesteck, Hammacher Instrumente, Deutschland
- Rotationsmikrotom, Leica RM 2125 RT, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
- Sephadex G-50 *Spin* Säulen, Amersham Pharmacia Biotech, Deutschland
- Silikon, Dow Corning GmbH, Deutschland
- Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
- Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Deutschland
- Sterilfilter (0,2 µm), einmal Filterhalter, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Sterilfilter (0,22 µm), Steritop, Vakuumfilter, Millipore, USA
- Thermomixer, Eppendorf, Deutschland
- Transmissions Elektronen Mikroskop, TEM, Zeiss Leo 906 EM, Carl Zeiss, Deutschland
- *Ultracut*, UCT, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
- Ultrazentrifuge Centricon T-2170, Kontron Instruments, Deutschland
- Venenverweilkanüle, Vasofix Braunüle, B.Braun Melsungen AG, Deutschland
- Vortex Typ REAX 1, Heidolph, Deutschland
- Waage, OHAUS GT410, Florham Peak, USA
- Waage, PM 480 Delta Range, Mettler Instruments, Deutschland
- Wasserbad, GfL m.b.H., Deutschland
- Wasserbad, Medax Nagel GmbH, Deutschland
- Zellsieb, 60 mesh (250 µm), CD-1 Sieb, Sigma Chemical Co, USA
- Zentrifugierröhrchen 15 ml, 50 ml, Sarstedt, Deutschland

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der mES-Zell-Kultur

mES-Zellen (R1-Linie [90]) können ausschließlich im undifferenzierten Zustand propagiert werden. Hierfür sind die Zugabe des Zytokins LIF und die Kultur auf MEFs essentiell. LIF ist kommerziell erhältlich (ESGRO® Chemicon). MEFs wurden in der Regel frisch aus Mausembryonen präpariert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte LIF zunächst durch Translation gewonnen werden, um die Kosten für die mES-Zellkulturen zu reduzieren.

3.1.1 Translation des LIF-Proteins

Durch Translation von LIF-GST in *Escherichia coli* (DH5α) konnten in zwei Präparationen insgesamt 368 µg LIF-Protein hergestellt werden. Mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung wurde die Qualität der LIF-Herstellung überprüft (Abb. 10). Dabei zeigten sich die erwartete Molekülgröße von 20 kD sowie eine Reinheit des LIF-Proteins von ca. 95% in den beiden Präparationen.

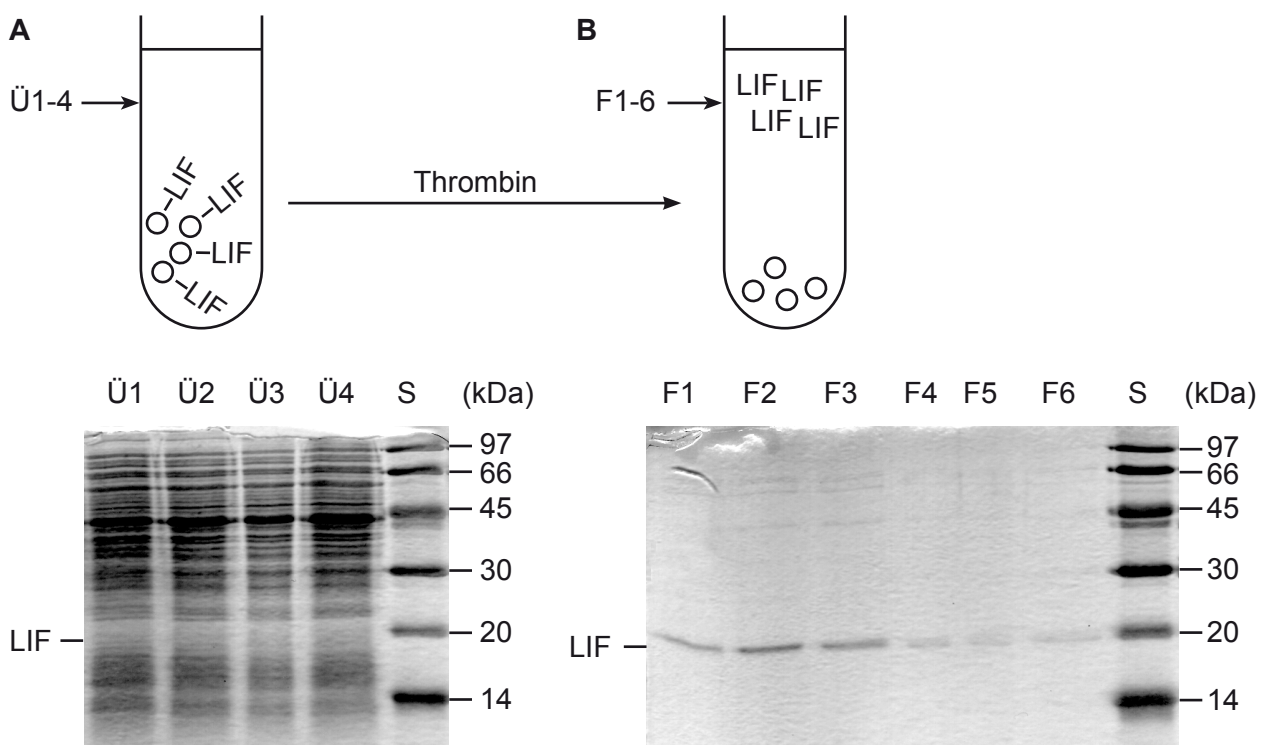


Abb. 10: Auftrennung von Bakterienlysaten durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung nach Translation von LIF-GST in *E. coli* (DH5α). (A) Proteingemische aus den Überständen (Ü1-Ü4), die während der Waschschrte bei der LIF-Herstellung entstanden sind. Darin sollte kein oder nur wenig LIF enthalten sein. (B) LIF-Fractionen (F1-F6) nach Thrombinbehandlung zur Freisetzung des LIFs von der Glutathion-Agarose. S: Größenstandard.

3.1.2 Einfluss von MEF und LIF auf die mES-Zell-Differenzierung

Die biologische Aktivität des selbst hergestellten LIF-Proteins wurde an mES-Zellkulturen in Anwesenheit und Abwesenheit von MEFs (50.000/cm²) untersucht. In den Versuchsgruppen wurden jeweils 3x10⁶ undifferenzierte mES-Zellen eingesetzt (n=3/Gruppe). Die mES-Zellen wurden zwei Tage kultiviert, im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturschalen verteilt und für weitere zwei Tage unter den entsprechenden Bedingungen kultiviert. Da sich undifferenzierte mES-Zellen erheblich schneller teilen als differenzierte Zellen, war die Bestimmung der Zellzahl nach vier Kulturtagen eine Möglichkeit, den Differenzierungsgrad anhand der Teilungsgeschwindigkeit abzuschätzen. Es zeigte sich eine optimale Amplifikation der mES-Zellen bei 10-30 ng/ml LIF unter gleichzeitiger Verwendung von MEFs (Abb. 11+12). Bei einem direkten Vergleich mit kommerziell erwerblichem LIF (ESGRO[®]) zeigte sich weder morphologisch (Abb. 11) noch im Wachstumsverhalten (Abb. 12) eine Überlegenheit des ESGRO[®] LIFs (10 U/ml [1 U entspricht 1 ng LIF] vs. 10 ng/ml LIF eigene Herstellung). Trotz der zunächst festgestellten Gleichwertigkeit der LIF-Präparationen wurde dennoch zur besseren Standardisierbarkeit (umfangreiche Chargenkontrolle des Herstellers mit Nachweis der Keimbahngängigkeit der ES-Zellen) für die meisten Experimente dieser Arbeit auf das ESGRO[®] LIF zurückgegriffen.

3.1.3 Herstellung selektionierbarer mES-Zelllinien

Durch stabile Integration einer Hygromycinresistenz (HygroR) unter Kontrolle des ubiquitär aktiven Phosphoglyceratkinasepromotors (PGK-Promotor) und einer Neomycinresistenz (NeoR) unter der Kontrolle des kardiospezifischen α Myosin Heavy Chain-Promotors (α MHC-Promotor) sollte eine mES-Zelllinie generiert werden, die eine Aufreinigung von Kardiomyozyten unter G418 (Geneticin)-Selektionsdruck, wie von Klug et al. [85] beschrieben, ermöglicht. Dafür wurden mES-Zellen (R1-Linie) stabil mit dem α MHC-NeoR-Plasmid transformiert (2.3.5). 192 transformierte Zelllinien wurden unter Hygromycinselektion (100 μ g/ml) isoliert. Die Transgenintegration wurde mittels *Southern Blotting* (Abb. 13A) überprüft. Ein stabiler Plasmideinbau konnte in 17 Klonen verifiziert werden. Die Selektionierbarkeit der zu Kardiomyozyten differenzierten transgenen mES-Zellen (2.3.7) wurde zunächst exemplarisch gezeigt (Abb. 13B).

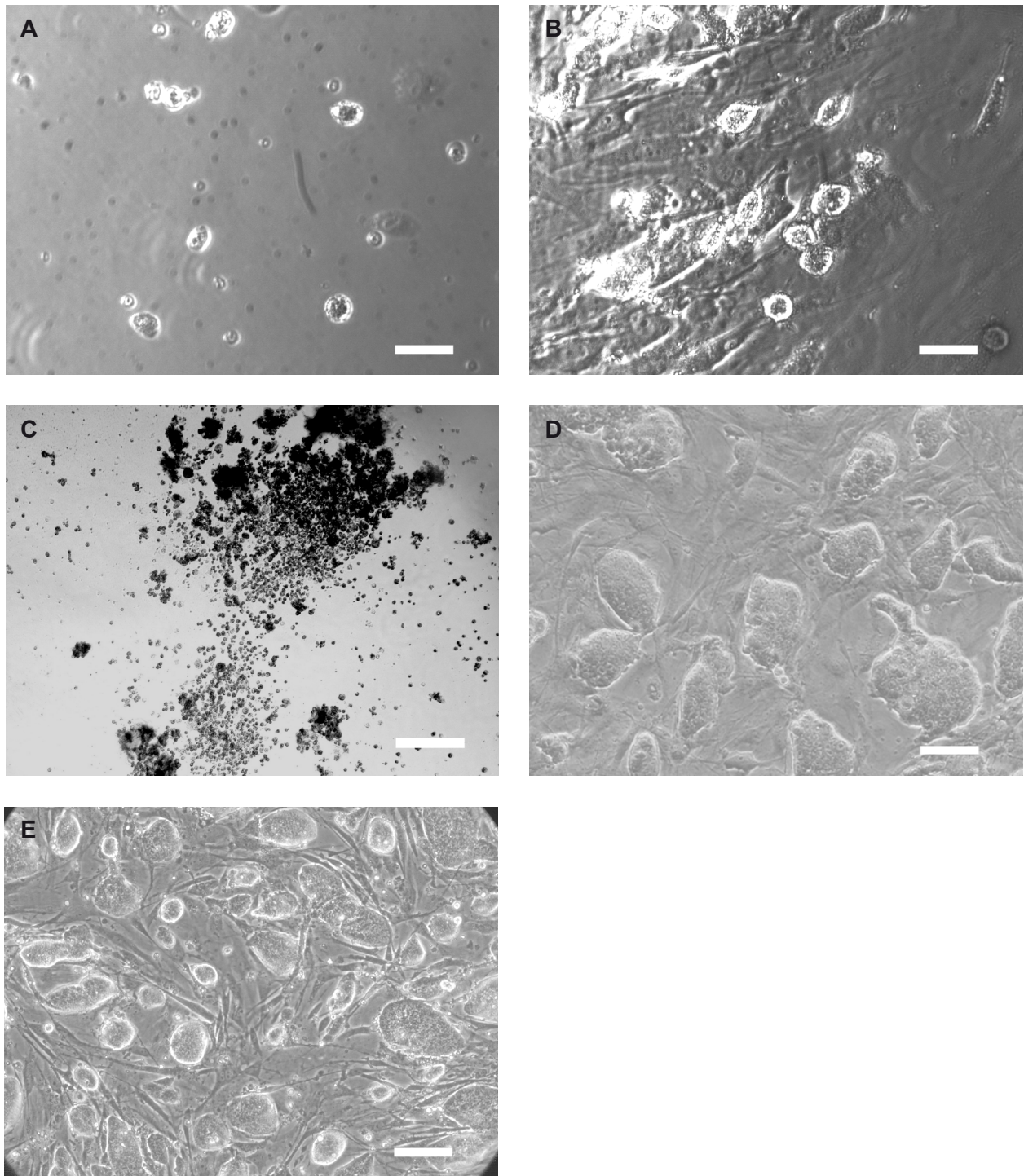


Abb. 11: Wachstum von mES-Zellen in An- und Abwesenheit von LIF und/oder MEF. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen von mES-Zellen (R1-Linie) nach viertägiger Kultur unter den angegebenen Bedingungen. (A) Kultur ohne MEF und ohne LIF, (B) Kultur auf MEF (50.000 MEF/cm²) aber ohne LIF, (C) Kultur ohne MEF aber mit LIF (10 U/ml; ESGRO®), (D) Kultur auf MEF (50.000 MEF/cm²) in Anwesenheit von LIF (10 U/ml; ESGRO®) und (E) Kultur auf MEF (50.000 MEF/cm²) in Anwesenheit von LIF (30 ng/ml; hergestellt). Maßstäbe: 100 µm.

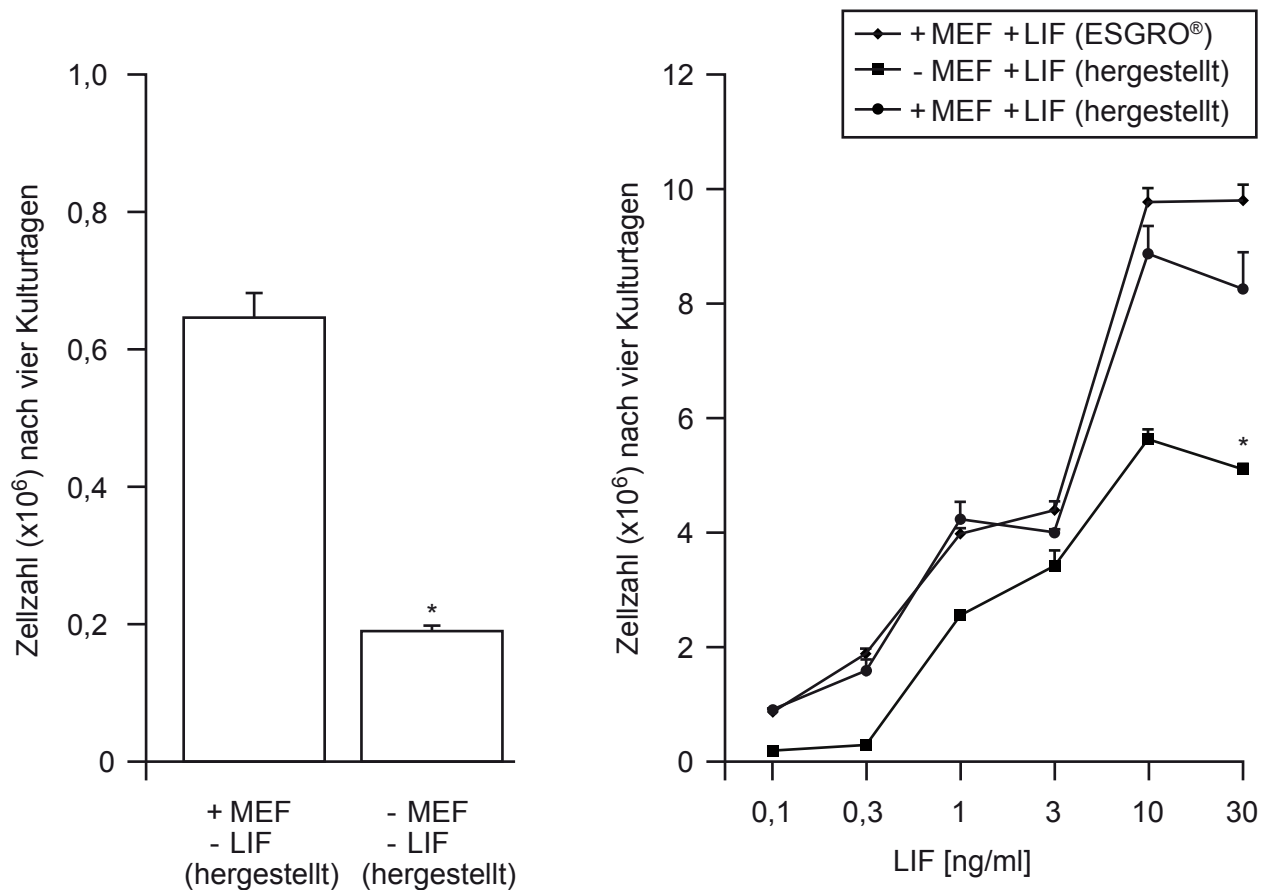


Abb. 12: Optimierung der Kulturbedingungen von undifferenzierten mES-Zellen. Dargestellt ist die Zellzahl nach viertägiger Kultur mit verschiedenen LIF-Konzentrationen (0-30 ng/ml des selbsthergestellten und 0-30 U/ml des ESGRO®-LIFs) und unter An- bzw. Abwesenheit von MEFs. Die Daten wurden jeweils in Dreifachbestimmung (n=3-6/Gruppe) erhoben. *p<0,05 vs. +MEF -LIF (ungepaarter zweiseitiger t-Test) bzw. vs. +MEF +LIF (two-way ANOVA).

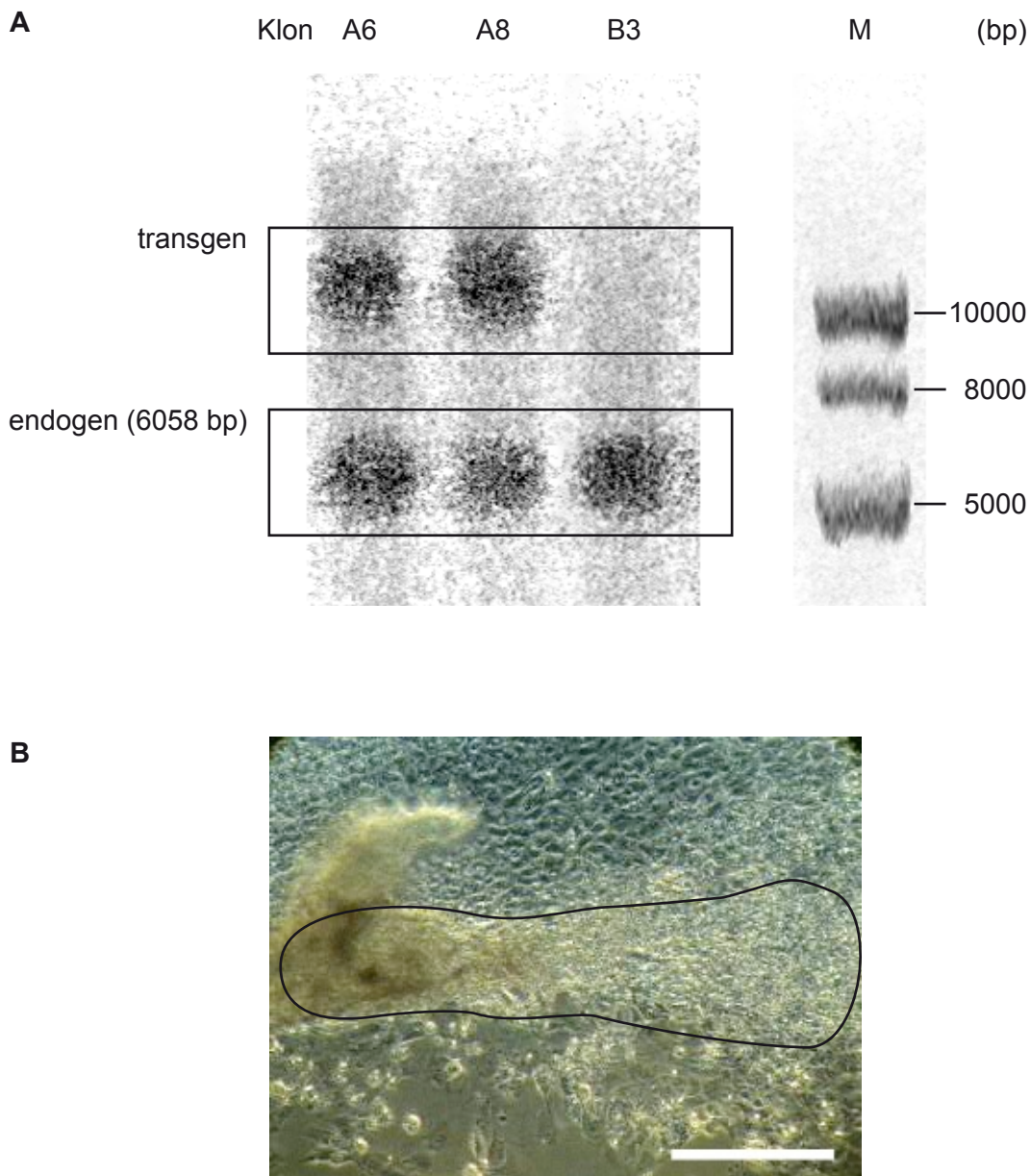


Abb. 13: Herstellung einer selektionierbaren mES-Zelllinie. (A) *Southern Blot*-Detektion von mES-Zelllinien mit stabil integriertem Transgen (α MHC-NeoR-Plasmid). Endogenes α MHC-Fragment (6058 bp). Dargestellt sind zwei positive Klone (A6 und A8) sowie ein negativer Klon (B3). M: DNA-Längenstandard. (B) Die Funktionalität der Neomycinresistenz wurde an differenzierten Zellen der verschiedenen Linien an Kulturtag 29 (2 Tage hängender Tropfen + 5 Tage Suspensionskultur + 22 Tage Adhäsionskultur) überprüft (hier A6). Unter Zugabe von G418 (200 μ g/ml ab dem 12. Tag in Adhäsionskultur) kam es zum Absterben von Nichtkardiomyozyten. Hier ist eine spontan kontrahierende Zellansammlung (s. Markierung) zu sehen.

3.1.4 Auswahl einer optimalen mES-Zelllinie

Zunächst wurde das kardiale Differenzierungsverhalten der identifizierten transgenen mES-Zelllinien orientierend untersucht. Dafür wurden die Zellen in hängenden Tropfen (2 Tage) und anschließend in Suspensions- (5 Tage) und Adhäsionskultur (12 Tage) differenziert. Semiquantitative Analysen der 17 als stabil transformiert identifizierten transgenen mES-Zelllinien deuteten auf ein erhöhtes kardiales Differenzierungspotential in den Zelllinien A6, A8 und A9 hin. Diese Zelllinien wurden schließlich detailliert untersucht. Dabei zeigte sich, dass der Anteil kontrahierender EBs (Abb. 6) in allen Zelllinien im Kulturverlauf (8-12 Tage Adhäsionskultur) zunahm (Abb. 14). Nach 12 Tagen Adhäsionskultur kontrahierten schließlich $65\pm 6\%$ (A6; n=3 mit jeweils 150 EBs), $18\pm 4\%$ (A8; n=3 mit jeweils 150 EBs) und $26\pm 5\%$ (A9; n=3 mit jeweils 150 EBs) der entsprechenden EBs. Folglich wurden die weiteren Experimente im Wesentlichen mit der A6-Zelllinie durchgeführt (Ausnahme: Vergleich der Zelllinien A6, A8, A9 zur Herstellung von EHTs; 3.2.5).

3.1.5 Definition optimaler Selektionsbedingungen in 2D-Kultur

Zur Überprüfung der Funktionalität des kardiomyozytenspezifischen Selektionstransgens und zur Bestimmung der optimalen G418-Konzentration zur selektiven Abtötung von Nichtkardiomyozyten wurden mES-Zellen in hängenden Tropfen zu EBs aggregiert (2 Kulturtage) und in anschließender Suspensions- (5 Kulturtage) sowie Adhäsionskultur (12 Kulturtage) differenziert. Die Selektion wurde durch Zugabe von 100-600 $\mu\text{g/ml}$ G418 durchgeführt (Kulturtage 12-28). Pro Gruppe wurden 150 EBs (auf drei Kulturschalen: 3x50 EBs) optisch bewertet. 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 führte zu keiner relevanten Abtötung von Nichtkardiomyozyten. Unter 600 $\mu\text{g/ml}$ G418 kam es neben einer Abtötung von Nichtkardiomyozyten auch zu einem umfassenden Verlust von Kardiomyozyten (Tabelle 5). Als optimale G418-Konzentration zur Selektion von Kardiomyozyten in 2D-Kultur für den gewählten Zeitraum (16 Kulturtage) wurden 200 $\mu\text{g/ml}$ identifiziert.

G418 ($\mu\text{g/ml}$)	100	200	300	400	500	600
Effekt auf Kardiomyozyten	-	-	-	-	+	+
Effekt auf Nichtkardiomyozyten	-	+	+	+	+	+

Tabelle 5: Kardiomyozytenselektion durch G418. Semiquantitative Darstellung der mikroskopischen Analyse von 150 EB-Kulturen nach 16tägiger G418-Selektion (Kulturtag 12-28). (-): kein G418-Effekt, (+): Zelltod in Anwesenheit von G418.

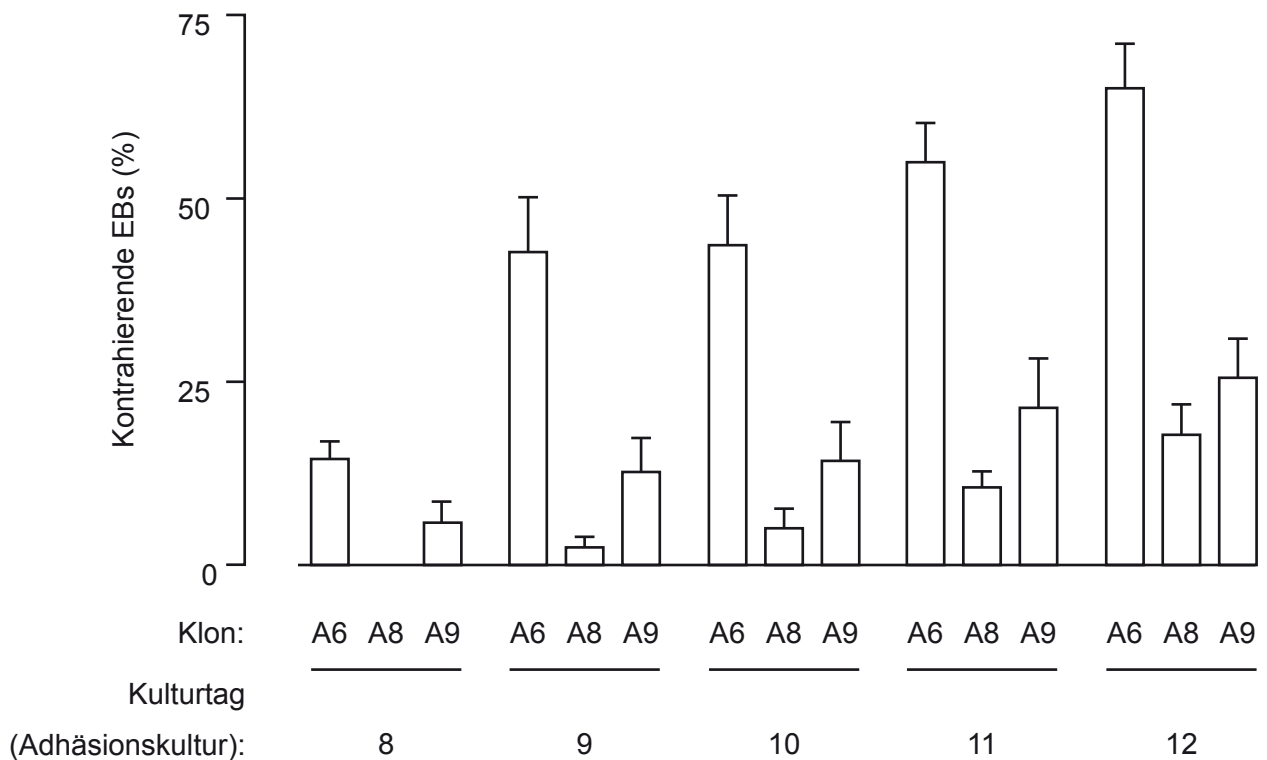


Abb. 14: Vergleich des kardiogenen Potentials der mES-Zelllinien A6, A8 und A9. Die Anzahl der kontrahierenden EBs (in %) wurde an verschiedenen Kulturtagen (2 Tage hängender Tropfen + 5 Tage Suspensionskultur + 8 bis 12 Tage Adhäsionskultur) bestimmt (n=3 mit jeweils 50 EBs/Gruppe). * $p < 0,05$ Kulturtag 8 vs. Kulturtag 12 (ungepaarter zweiseitiger t-Test). ‡ $p < 0,05$ Zelllinie A6 vs. Zelllinie A8 bzw. A9 an Kulturtag 12 (ANOVA mit Bonferroni *post hoc*-Test).

3.2 Herstellung von EHTs

Zellen unterschiedlichen Differenzierungsgrades wurden zur EHT-Herstellung verwendet:

- selektionierte Kardiomyozyten der A6-mES-Zelllinie
- EBs der A6-mES-Zelllinie
- undifferenzierte Stammzellen der A6-mES-Zelllinie

Diese Versuche wurden zum Teil nur an einzelnen Gewebekonstrukten orientierend durchgeführt, um schließlich eine optimale Rekonstitutionsbedingung zu identifizieren und diese dann in weiterführenden Untersuchungen detailliert zu charakterisieren.

3.2.1 Herstellung von EHTs aus selektionierten Kardiomyozyten der A6-mES-Zelllinie

Zellen der A6-mES-Zelllinie wurden, wie in 2.3.7 beschrieben, differenziert und 15 Tage in 2D-Kultur mit G418 selektioniert. Dieses führte zu einer Anreicherung von Kardiomyozyten in dem Zellkollektiv. Zur Herstellung von EHTs wurden diese alleine oder zusammen mit Nichtkardiomyozyten aus Herzen neonataler Mäuse verwendet. Im EHT wurde nicht mit G418 selektioniert. Der Nichtkardiomyozytenzusatz erfolgte mit der Absicht, die EHT-Entwicklung zu fördern und die Konstrukte zu stabilisieren. Zugleich wurde die Zahl der Kardiomyozyten ($1,5 \times 10^6$ vs. 3×10^6) sowie die Anzahl der Nichtkardiomyozyten (3×10^5 – $7,5 \times 10^5$ – $1,5 \times 10^6$) variiert. Diese Experimente erforderten hohe Kardiomyozytenzahlen und waren daher besonders zeit- und arbeitsaufwendig. Aus diesem Grund wurde diese Versuchsserie lediglich orientierend durchgeführt ($n=1$ /Gruppe; Tabelle 6). Dabei konnten nur in einzelnen EHTs lokal kontrahierende Areale beobachtet werden. Synchron kontrahierende EHTs wurden in dieser Versuchsserie nicht generiert. Diese Experimente zeigten jedoch, dass es prinzipiell möglich ist, EHTs mit aus Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten herzustellen. Der Zusatz von Nichtkardiomyozyten hatte keinen offensichtlichen Effekt auf die Ausbildung von EHTs.

Anzahl Kardiomyozyten	Anzahl Nichtkardiomyozyten	Gesamtzellzahl/EHT	Lokal begrenzte Kontraktionen ab EHT-Kulturtag
$1,5 \times 10^6$	-	$1,5 \times 10^6$	11
$1,5 \times 10^6$	3×10^5	$1,8 \times 10^6$	keine Kontraktionen
$1,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$2,25 \times 10^6$	10
$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	3×10^6	keine Kontraktionen
3×10^6	-	3×10^6	8
3×10^6	3×10^5	$3,3 \times 10^6$	keine Kontraktionen
3×10^6	$7,5 \times 10^5$	$3,75 \times 10^6$	11
3×10^6	$1,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	keine Kontraktionen

Tabelle 6: EHTs aus selektionierten Kardiomyozyten mit und ohne Zusatz von Nichtkardiomyozyten. Die Tabelle fasst die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse zusammen ($n=1$ /Gruppe).

3.2.2 Herstellung von EHTs aus Embryoidkörpern der A6-mES-Zelllinie

Unter G418-Selektion kam es zum Absterben von Nichtkardiomyozyten. Dieser Prozess war mit einem Ablösen der multizellulären EBs von den Kulturschalen verbunden. Mit den EBs lösten sich schließlich auch regelhaft die nicht abgetöteten Kardiomyozyten von den Kulturschalen, was zu einer niedrigen Herzmuskelzellausbeute nach G418-Selektion führte. Daher wurde in einer zweiten Versuchsserie die Anwendung von EBs direkt aus hängenden Tropfen zur Herstellung von EHTs getestet (50 vs. 100 EBs/EHT). Von Kulturtag 15-31 erfolgte in allen EHTs eine G418-Selektion (200 µg/ml). Auch hier sollte zunächst die Anwendbarkeit des Verfahrens orientierend untersucht werden. Analog zu den vorangegangenen Untersuchungen wurden den EHTs zum Teil Nichtkardiomyozyten zugesetzt. Dieses erfolgte unter der Annahme, dass Nichtkardiomyozyten gerade zu Beginn der EHT-Rekonstitution sowohl Kardiomyozytendifferenzierung fördernde parakrine Faktoren bereitstellen, als auch für die Ausbildung eines mechanisch stabilen Gewebekonstruktes wichtig sind. Hier zeigte sich ebenfalls eine Entwicklung spontan kontrahierender Areale in den EHTs, wobei sich die Zugabe von Nichtkardiomyozyten als förderlich erwies. Auch dieses Verfahren war äußerst zeit- und arbeitsaufwendig und erlaubte daher lediglich die Herstellung einer begrenzten Anzahl von EHTs (Tabelle 7).

Anzahl EBs	Anzahl Nichtkardiomyozyten	Lokal begrenzte Kontraktionen ab EHT-Kulturtag
100	250.000	15
50	120.000	16
50	-	keine Kontraktionen

Tabelle 7: EHTs aus EBs mit und ohne Zusatz von Nichtkardiomyozyten. Die Tabelle fasst die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse zusammen (n=1/Gruppe).

3.2.3 Herstellung von EHTs aus undifferenzierten Stammzellen der A6-mES-Zelllinie

Als dritter Ansatz wurde die Herstellung von EHTs aus undifferenzierten mES-Zellen zunächst mit und ohne Nichtkardiomyozytenzusatz, gefolgt von einer Variation der G418-Selektion im Kulturverlauf, erprobt. Die G418-Selektion wurde initial an EHT-Kulturtag 19 begonnen (d.h. 3 Tage in Gussform + 16 Tage ohne Selektion auf Dehnungsvorrichtungen), da sich zu diesem Zeitpunkt in Standard-mES-Differenzierungskulturen (2 Tage hängender Tropfen + 5 Tage Suspensionskultur + 12 Tage Adhäsionskultur) bereits größere Mengen an Kardiomyozyten identifizieren ließen (Abb. 13B). Auch hier wurde davon ausgegangen, dass Effekte durch Nichtkardiomyozyten zu Beginn der EHT-Herstellung von Bedeutung sein könnten, so dass ein Abtöten der nicht

resistenten Nichtkardiomyozyten durch G418 während der späteren EHT-Kultur inkorporiert wurde. Nach 28 EHT-Kulturtagen, d.h. nach 3tägiger Kondensationsphase 16 Tage ohne und anschließend 9 Tage mit G418-Selektion, zeigten alle EHTs lokale Kontraktionen (n=2; Tabelle 8). Durch den Zusatz von Nichtkardiomyozyten konnte die Ausbildung von kontrahierenden EHTs nicht verbessert werden.

Anzahl der undifferenzierten mES-Zellen	Anzahl Nichtkardiomyozyten	Gesamtzellzahl/EHT	Lokal begrenzte Kontraktionen ab EHT-Kulturtag
$1,5 \times 10^6$	-	$1,5 \times 10^6$	24-26
$1,5 \times 10^6$	150.000	$1,65 \times 10^6$	24
$1,5 \times 10^6$	375.000	$1,875 \times 10^6$	28
$1,5 \times 10^6$	750.000	$2,25 \times 10^6$	25-27
3×10^6	-	3×10^6	26
3×10^6	150.000	$3,15 \times 10^6$	25-27
3×10^6	375.000	$3,375 \times 10^6$	28
3×10^6	750.000	$3,75 \times 10^6$	28
$4,5 \times 10^6$	-	$4,5 \times 10^6$	26
6×10^6	-	6×10^6	28

Tabelle 8: EHTs aus undifferenzierten mES-Zellen mit und ohne Zusatz von Nichtkardiomyozyten. Die Tabelle fasst die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse zusammen (n=2/Gruppe).

Zusammenfassend zeigte sich, dass mES-Zellen mit unterschiedlichem Differenzierungsgrad zur Herstellung von EHTs grundsätzlich verwendet werden können (Abb. 15). Eine Beimischung von kardialen Nichtkardiomyozyten führte bei Verwendung von isolierten Kardiomyozyten und mES-Zellen zu keiner verbesserten Ausbildung kontraktiler EHTs. Dagegen schien eine Nichtkardiomyozytenzugabe bei der Anwendung von multizellulären EBs die Ausbildung von EHTs mit kontraktile Arealen zu fördern. Da die Fallzahlen in diesen orientierenden Versuchen gering waren (n=1-2), ist eine abschließende Bewertung der Bedeutung von Nichtkardiomyozyten nicht möglich. Um ihre Funktion bei der Ausbildung und insbesondere während der Kultur der EHTs unter G418-Selektion besser analysieren zu können, wäre für zukünftige Experimente die Verwendung von antibiotikaresistenten Nichtkardiomyozyten angezeigt.

Die Anwendung von undifferenzierten mES-Zellen zur Herstellung von EHTs mit einer „in EHT-Selektion“ war vor allem durch das Weglassen der aufwendigen Vorkulturen (hängender Tropfen, Suspensions- und Adhäsionskultur mit Selektion) und die Verfügbarkeit großer Mengen von undifferenzierten mES-Zellen am besten geeignet, um große EHT-Serien für potentielle *in vitro*- und *in vivo*-Anwendungen zu generieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden so an einzelnen Versuchstagen bis zu 100 mES-Zell-EHTs generiert.

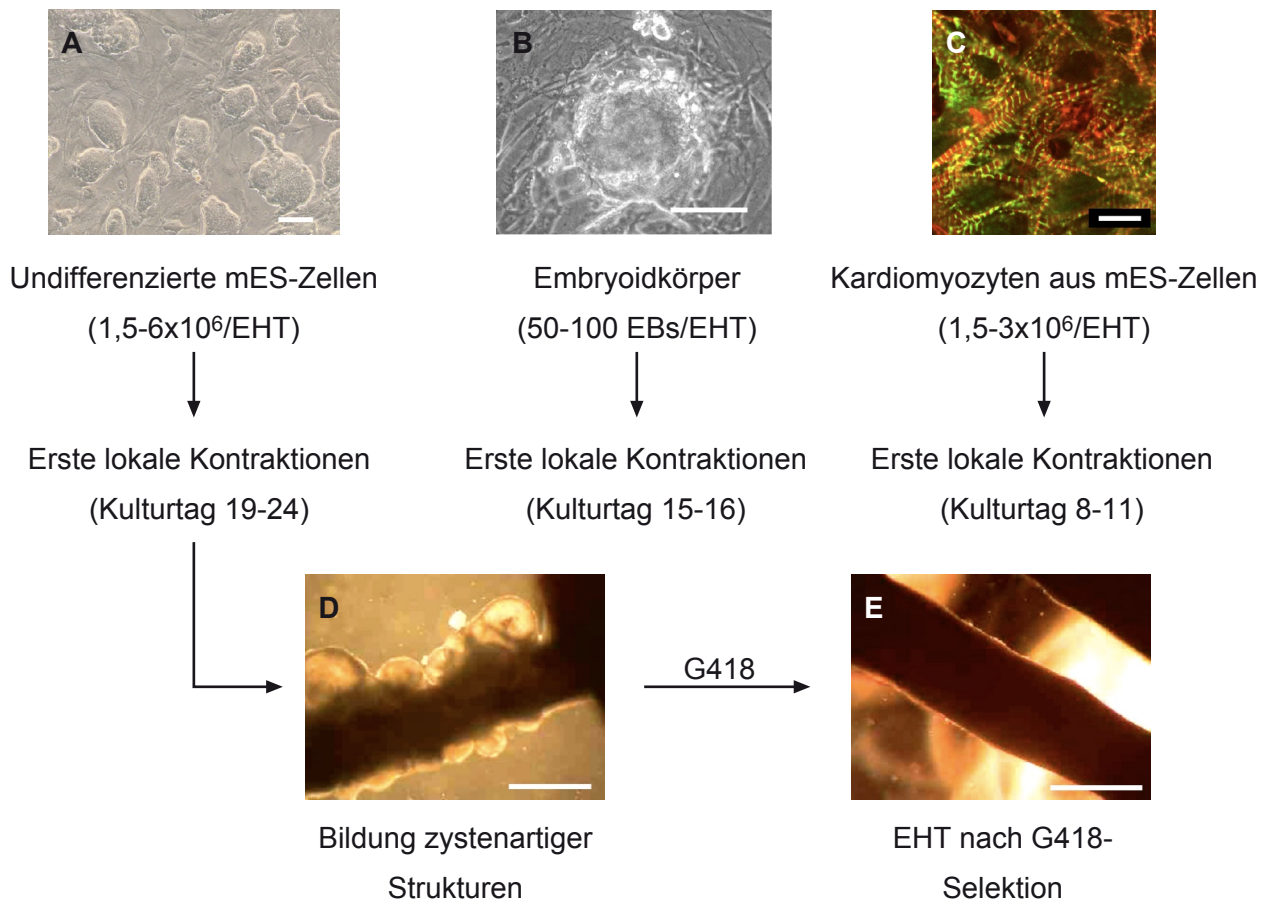


Abb. 15: Herstellung von EHTs aus selektionierbaren Kardiomyozyten. EHTs wurden aus (A) undifferenzierten mES-Zellen, (B) EBs oder (C) G418-selektionierten Kardiomyozyten hergestellt. Lokale Kontraktionen konnten unter allen Bedingungen beobachtet werden. Durch Positivselektion mit G418 wurde eine unkontrollierte Proliferation von Nichtkardiomyozyten (D) verhindert. Lediglich bei Verwendung von undifferenzierten mES-Zellen und G418-Selektion während der EHT-Kultur gelang die Herstellung synchron kontrahierender EHTs (E). Maßstäbe: (A+B) 100 μ m; (C) 10 μ m; (D+E) 1 mm.

3.2.4 Etablierung optimaler Selektionsbedingungen

Um den optimalen Zeitpunkt für den Beginn der Kardiomyozytenselektion zu definieren, wurden EHT-Kulturen mit $1,5 \times 10^6$ und 3×10^6 undifferenzierten mES-Zellen hergestellt und nach 3 Tagen (Kondensationsphase) auf Dehnapparaturen transferiert (Abb. 7B). Nach weiteren 6, 8, 10, 12, 14 und 16 Kulturtagen wurde jeweils G418 (200 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt ($n=2/\text{Gruppe}$). Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte wöchentlich. Nach 22 Kulturtagen auf den Dehnungsvorrichtungen zeigten EHTs aus $1,5 \times 10^6$ und 3×10^6 mES-Zellen, die seit Kulturtag 9, 11 und 13 mit G418 behandelt wurden, erstmalig zusammenhängende Kontraktionen. EHTs, die zu einem späteren Zeitpunkt selektioniert wurden, entwickelten lediglich lokale Kontraktionen. Darüber hinaus wurde die Verwendung unterschiedlicher G418-Konzentrationen (100-600 $\mu\text{g/ml}$, $n=3$) zur Kardiomyozytenselektion ab Kulturtag 11 erprobt. Bei einer G418-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ kam es zu einer extremen Bildung von Embryoidkörpern in den EHTs (ähnlich wie in Abb. 15D dargestellt). Ab 400 $\mu\text{g/ml}$ bildeten sich keine stabilen EHTs aus. Bei G418-Konzentrationen von 200 $\mu\text{g/ml}$ und 300 $\mu\text{g/ml}$ konnten kohärente Kontraktionen beobachtet werden (Tabelle 9).

G418 ($\mu\text{g/ml}$)	100	200	300	400
EB-Bildung	+	-	-	-
Funktionelle EHTs	-	+	+	-

Tabelle 9: Kardiomyozytenselektion durch G418 im EHT. Semiquantitative Darstellung der mikroskopischen Analyse von EHTs nach 20tägiger G418-Selektion (Kulturtag 11-31). (-): kein G418-Effekt, (+): Zelltod in Anwesenheit von G418.

In einer größeren Versuchsserie wurden die bisher orientierenden Befunde zur direkten Anwendung von undifferenzierten mES-Zellen zur EHT-Herstellung überprüft. Dazu wurden EHTs aus mES-Zellen (1×10^6 , $1,5 \times 10^6$ und 2×10^6) hergestellt und, wie oben beschrieben, beginnend an unterschiedlichen Kulturtagen einer G418-Selektion (200 $\mu\text{g/ml}$) ausgesetzt (Kulturtag 9, 11, 13; $n=10-15/\text{Gruppe}$). Alle EHTs dieser Versuchsgruppe zeigten spontane und kohärente Kontraktionen. Zunächst wurde die Stabilität der EHTs an Kulturtag 31 bewertet (Abb. 16A). Dabei zeigte sich, dass 12 von 36 (33%) der EHTs aus 1×10^6 ES-Zellen bei der Abnahme von der Haltevorrichtung (Abb. 7B) nicht zerrissen. EHTs aus $1,5-2 \times 10^6$ ES-Zellen waren dagegen deutlich stabiler (35 von 42 [83%] bei $1,5 \times 10^6$ und 25 von 35 [71%] bei 2×10^6 blieben nach Abnahme von den Haltevorrichtungen stabil). Der Beginn der G418-Selektion hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die EHT-Stabilität (stabile EHTs mit Selektionsbeginn an Kulturtag 9: 19 von 34 [56%], Tag 11: 24 von 41 [59%], Tag 13: 25 von 38 [66%]). Bei einigen EHTs aus dieser Serie ($n=5-10/\text{Gruppe}$) wurde die maximale Kontraktionskraft an Kulturtag 31 im isometrischen Kontraktionsexperiment

ermittelt (Abb. 16B). Dabei zeigte sich eine Tendenz zur Abnahme der Kraftentwicklung in Anhängigkeit vom Selektionsbeginn, d.h. je später die Selektion gestartet wurde, desto weniger Kraft entwickelten die EHTs nach 28 Tagen auf den Dehnungsvorrichtungen.

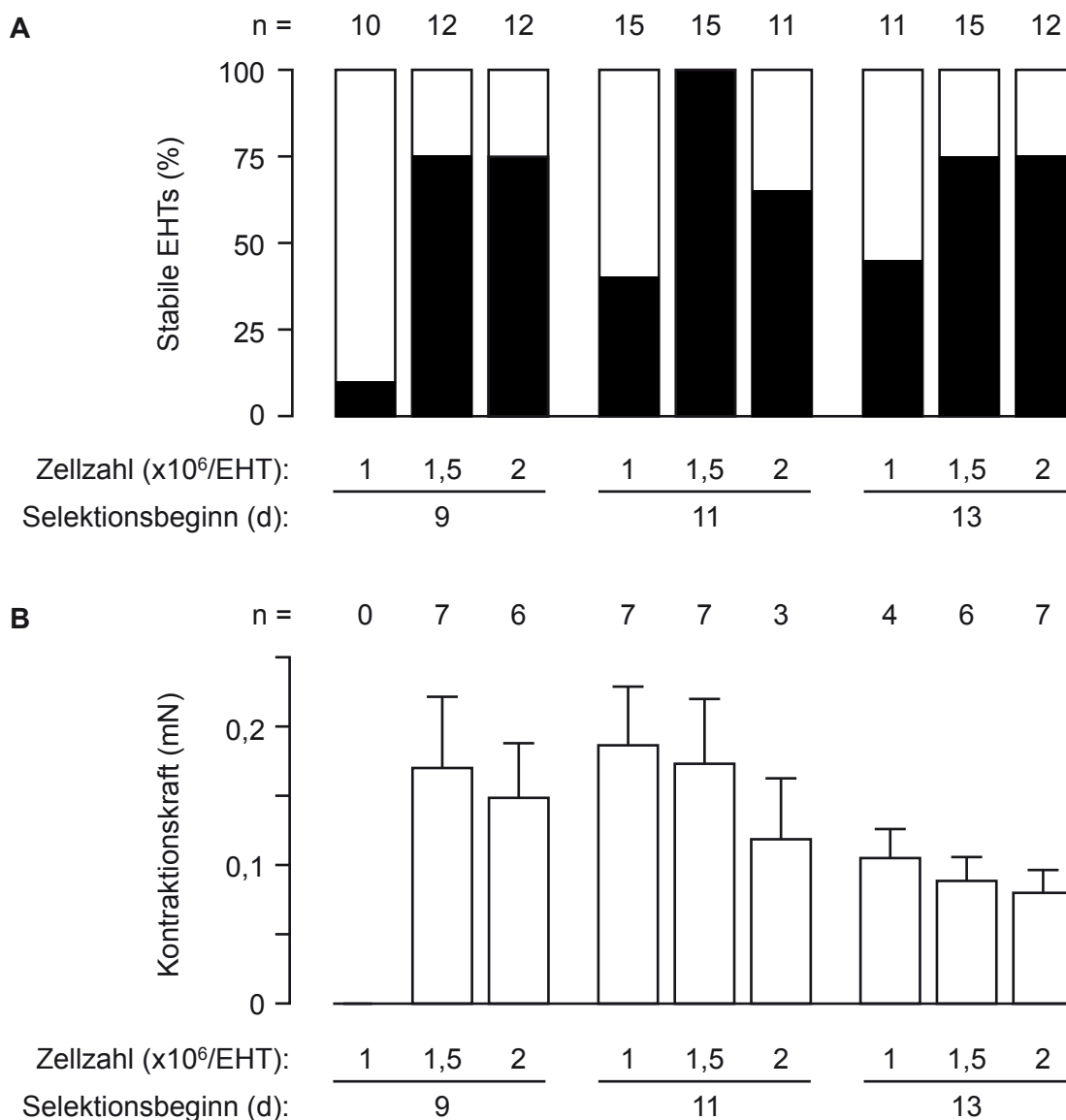


Abb. 16: Optimierung der mES-Zell-EHT-Herstellung. (A) Stabilitätsbestimmung der *in vitro* hergestellten EHTs: Aus $1-2 \times 10^6$ undifferenzierten mES-Zellen hergestellte und ab Kulturtag 9-13 mit G418 (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) selektionierte EHTs ($n=10-15$) wurden hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht. Als schwarze Säulen sind die EHTs angegeben, die beim Transfer aus der Gussform (Abb 7A) auf die Dehnungsvorrichtungen (Abb 7B) nicht gerissen sind. Die Ordinate zeigt den Anteil der EHTs, die sich transferieren ließen in % von der Gesamtanzahl der hergestellten EHTs. (B) Kontraktionskräfte gemessen unter isometrischen Bedingungen bei 2,4 mM Calcium und 4 Hz elektrischer Stimulation. Das EHT aus 1×10^6 Zellen und Selektionsbeginn an Kulturtag 9 war beim Transfer in das Organbad gerissen.

Nach diesen Versuchen zur Etablierung optimaler Bedingungen zur Herstellung von EHTs aus selektionierbaren mES-Zellen wurde ein Standardprotokoll für die weiteren Experimente dieser Arbeit definiert (Abb. 17). Folgende Einzelpunkte sind dabei hervorzuheben:

- 1) EHT-Herstellung aus undifferenzierten selektionierbaren mES-Zellen
- 2) $1,5 \times 10^6$ mES-Zellen pro EHT
- 3) Transfer der EHTs auf Dehnungsvorrichtungen nach 3 Kulturtagen (EHT-Kondensation)
- 4) Selektion mit $200 \mu\text{g/ml}$ G418 ab Kulturtag 11
- 5) Wöchentlicher Mediumwechsel
- 6) Gesamtkulturdauer 3 Tage Kondensationsphase und 28 Tage auf Dehnungsvorrichtung

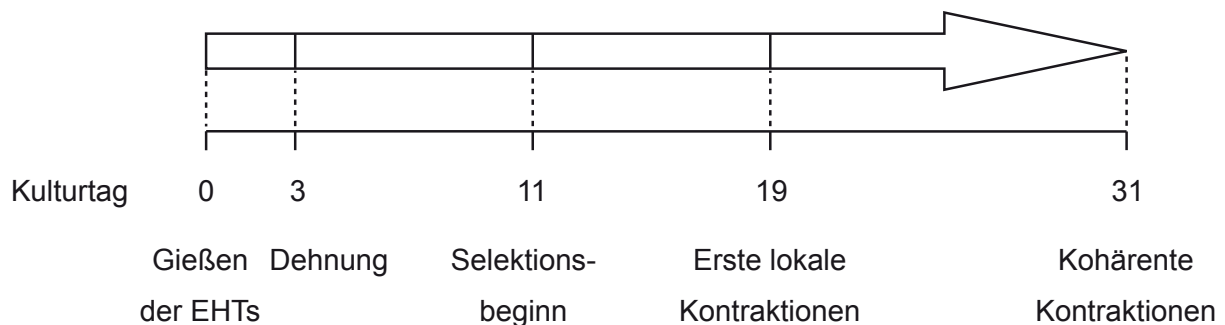


Abb. 17: Kulturschema zur Herstellung kohärent kontrahierender EHTs. Nach dreitägiger Kondensationsphase in zirkulären Gussformen wurden die Kulturen unter statischer Dehnung für 28 Tage fortgesetzt. Ab Kulturtag 11 wurde G418 ($200 \mu\text{g/ml}$) zur Selektion von Kardiomyozyten eingesetzt. Am 19. Kulturtag waren bereits in einigen EHTs erste lokale Kontraktionen zu beobachten. An Kulturtag 31 zeigten die EHTs kohärente Kontraktionen.

3.2.5 Vergleich der kontraktile Funktion von EHTs aus unterschiedlichen mES-Zelllinien

Zur Untersuchung, ob es generell möglich ist, aus mES-Zellen verschiedener selektionierbarer Linien funktionelle EHTs herzustellen, wurden die Linien A6, A8 und A9 verwendet ($1,5 \times 10^6$; jeweils $n=5$). Alle EHTs zeigten kohärente Kontraktionen an Kulturtag 31, die in isometrischen Kontraktionsexperimenten bei $2,4 \text{ mM}$ Calcium gemessen wurden (A6: $0,18 \pm 0,04 \text{ mN}$, A8: $0,15 \pm 0,04 \text{ mN}$, A9: $0,13 \pm 0,04 \text{ mN}$; Abb. 18).

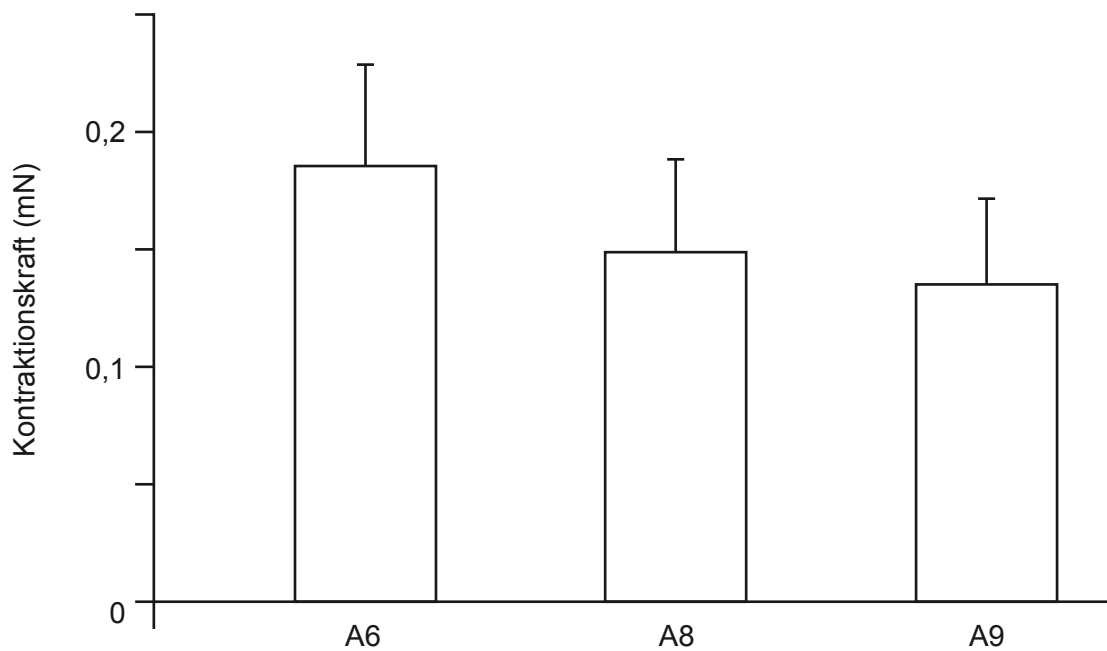


Abb. 18: Isometrische Kontraktionsexperimente mit mES-Zell-EHTs verschiedener Zelllinien. Dargestellt ist die Kontraktionskraft von mES-Zell-EHTs aus undifferenzierten Zellen der Linien A6, A8 und A9 bei 2,4 mM Calcium an Kulturtag 31 (n=5/Gruppe).

3.2.6 Langzeitkulturen von mES-Zell-EHTs

Nachdem die Kulturdauer von 28 Tagen unter Dehnung zur zuverlässigen Herstellung kontraktiler mES-Zell-EHTs definiert wurde, sollte untersucht werden, ob mES-Zell-EHTs auch über einen längeren Zeitraum stabil kontrahierten. Dafür wurden mES-Zell-EHTs für 31, 38 und 183 Tage kultiviert (jeweils n=3-4). In dem Kulturverlauf zeigte sich unter ständiger G418-Selektion keine Ausbildung von Embryoidkörpern. Darüber hinaus war die maximale Kraftentwicklung der mES-Zell-EHTs zu allen Zeitpunkten vergleichbar (31 Tage: $0,13 \pm 0,07$ mN, 38 Tage: $0,14 \pm 0,04$ mN, 183 Tage: $0,17 \pm 0,05$ mN; Abb. 19). Insgesamt wurden 4 EHTs für 188 Tage kultiviert. Zwei EHTs dieser Gruppe wurden von Kulturtag 183 bis 188 ohne G418 gehalten. Diese zeigten bereits an Kulturtag 185 deutliche nichtkontraktile Wucherungen (Abb. 20) als Hinweis auf eine Proliferation von Nichtkardiomyozyten. An Kulturtag 188 zeigte nur noch eines dieser EHTs kohärente Kontraktionen.

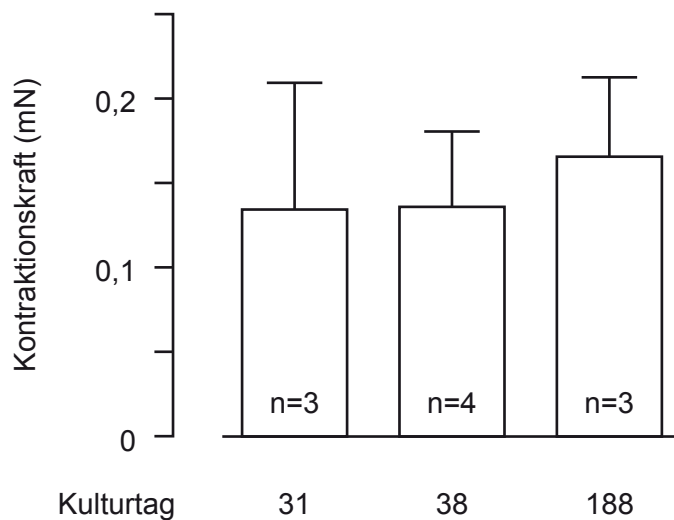


Abb. 19: Isometrische Kontraktionsexperimente von mES-Zell-EHTs nach unterschiedlicher Kulturdauer. Dargestellt ist die Kontraktionskraft von mES-Zell-EHTs an den Kulturtagen 31, 38 und 188 bei 2,4 mM Calcium. 2 von 3 EHTs in der 188 Tage-Gruppe wurden durchgehend mit G418 behandelt. 1 von 3 EHTs in der 188 Tage-Gruppe wurde von Kulturtag 183 bis 188 ohne G418 kultiviert, zeigte aber dennoch spontan kohärente Kontraktionen.

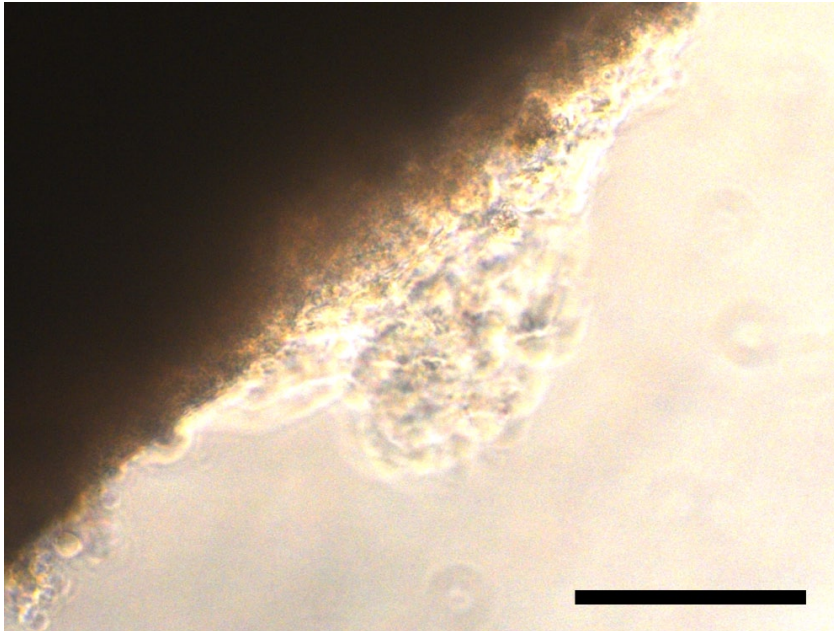


Abb. 20: Bildung von Wucherungen nach Weglassen der G418-Selektion. Durchlichtmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines mES-Zell-EHTs zwei Tage nach Beendigung einer 180tägigen G418-Selektion (200 µg/ml).

3.3 Charakterisierung der mES-Zell-EHTs

3.3.1 Isometrische Kontraktionsexperimente

Für die Funktion von Herzmuskelgewebe ist die Entwicklung von messbarer Kontraktionskraft essentiell. Einzelne mES-Zell-EHTs entwickelten maximale Kontraktionskräfte von 0,56 mN bei 2 mM Calcium. Im Mittel entwickelten mES-Zell-EHTs Kontraktionskräfte von $0,24 \pm 0,08$ mN bei maximaler inotroper Stimulation mit Calcium (2 mM, $n=8$; Abb. 21A). Auf β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin (1 μ M bei 0,4 mM Calcium) zeigten mES-Zell-EHTs eine Zunahme der Kontraktionskraft von $0,06 \pm 0,01$ auf $0,09 \pm 0,01$ mN ($n=14$, Abb. 21B). Diese positiv inotropen Effekte entsprechen denen des nativen Myokards, allerdings sind sie in den mES-Zell-EHTs schwächer ausgeprägt.

3.3.2 Morphologische Charakterisierung

3.3.2.1 Toluidinblau-Färbung

Zur Darstellung der Zellstrukturen in mES-Zell-EHTs wurden Vibratomschnitte (150 μ m) mit Toluidinblau gefärbt. Dabei zeigten sich dichte Zellverteilungen an der Oberfläche sowie Zellaggregate innerhalb der mES-Zell-EHTs (Abb. 22A). Die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes, wie es beim Herzmuskel zu beobachten ist, war in den mES-Zell-EHTs nur in kleinen Arealen vorhanden.

3.3.2.2 Hämatoxylin&Eosin-Färbung

In H&E-Färbungen zeigte sich sowohl in den Zellansammlungen an der EHT-Oberfläche als auch innerhalb des Gewebes meistens Anordnungen von Muskelbündeln. Die zumeist runden Zellkerne in deutlich eosinophilem Zytoplasma (Abb. 22B) deuteten auf einen gewissen Reifegrad der Zellen hin. Als Folge der G418-Selektion kam es darüber hinaus zu einer Anhäufung von Zelltrümmern (nicht abgebildet).

3.3.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Detailanalysen der bereits in den H&E-Färbungen deutlich nachweisbaren Muskelstränge erfolgten durch Immunfluoreszenzmarkierungen von sarkomerischem Aktinin. Dabei zeigte sich die Ausbildung von zum Teil auch längs ausgerichteten Muskelbündeln (Abb. 22C), was charakteristisch für reifere Kardiomyozyten ist.

3.3.2.4 Ultrastrukturanalyse

In elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mES-Zell-EHTs wurden Sarkomerstrukturen (Abb. 23A) und die für funktionelles Herzmuskelgewebe typische Ausbildung von spezifischen

Kontaktzonen zwischen einzelnen Kardiomyozyten durch Desmosome (Abb. 23B) und Gap *Junctions* (Abb. 23C) deutlich. Weiterhin konnten zahlreich ausgebildete T-Tubuli sowie Diaden aus T-tubulärem System und sarkoplasmatischem Retikulum nachgewiesen werden (Abb. 23D). Diese Strukturen bilden sich erst mit Reifung der Kardiomyozyten aus.

3.4 RNA/DNA-Analyse in mES-Zell-EHTs

RNA- und DNA-Analysen in mES-Zell-EHTs zeigten einen deutlichen Anstieg der RNA und der DNA an den Kulturtagen 3 (nach dreitägiger Kondensation vor Transfer auf die Dehnevorrichtung) und 11 (8 Tage nach Transfer auf die Dehnevorrichtung) im Vergleich zur Ausgangslage (Abb. 24). Nach Beginn der G418-Selektion zeigte sich eine deutliche Abnahme der DNA- und RNA-Menge pro mES-Zell-EHT.

3.5 Herstellung eines Multi-Indikator-mES-Zell-Modells

Mit dem Plasmid α MHC-NeoR war es nur eingeschränkt möglich, die Entwicklung und Verteilung der Kardiomyozyten während der EHT-Kultur zu untersuchen. Durch die Etablierung eines Multi-Indikator-mES-Zell-EHT-Modells (Expression von grün-fluoreszierendem Protein [GFP], kernlokalisierter β -Galaktosidase [β Gal] und NeoR unter der Kontrolle des α MHC-Promotors) sollte die Möglichkeit geschaffen werden, die Herzmuskelzellentwicklung innerhalb eines mES-Zell-EHTs in Lebendkulturen direkt beobachten (GFP) bzw. in fixierten Präparaten Herzmuskelzellen anhand des β -Galaktosidase-Signals im Zellkern nachweisen zu können. Im Folgenden wird die Klonierung des entsprechenden multicistronischen Expressionskonstruktes sowie die Herstellung stabiler Indikator-mES-Zelllinien beschrieben. Die Verwendung dieser Zellen zur Herstellung von EHTs ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt, aber für weiterführende Untersuchungen geplant.

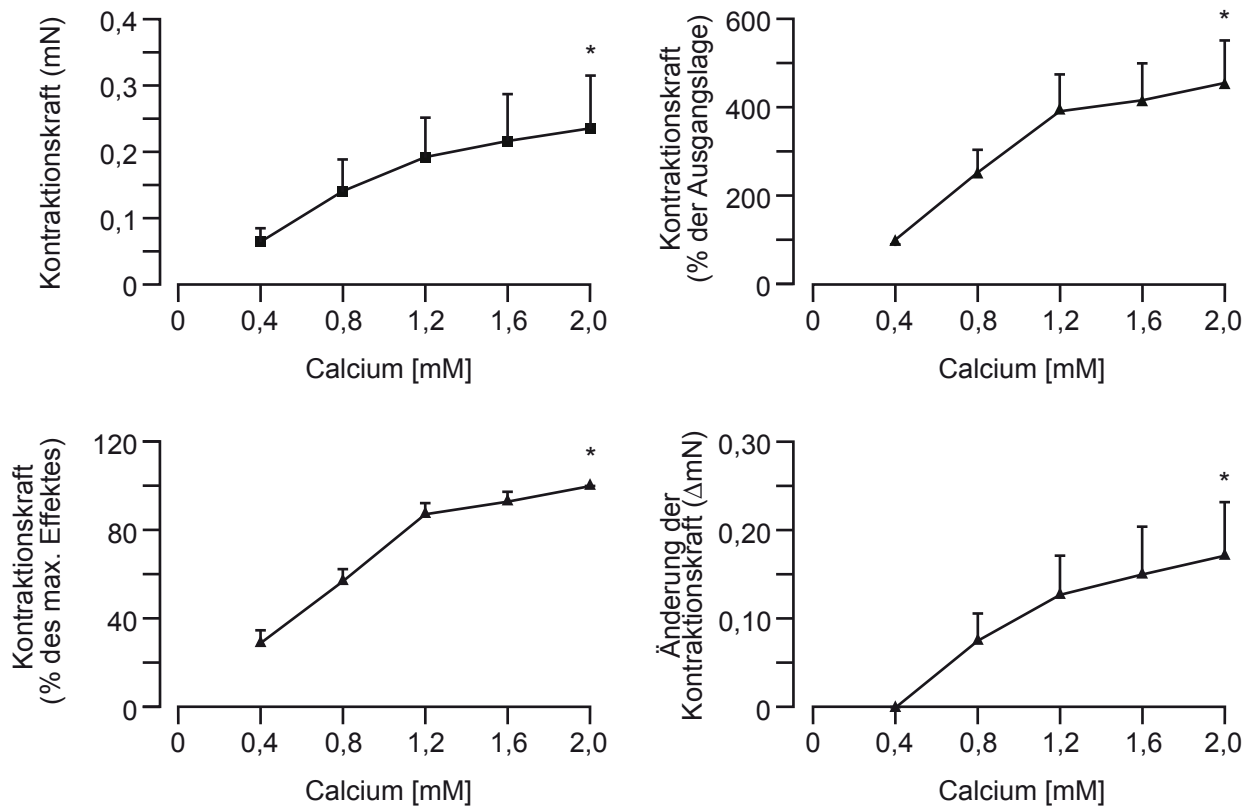
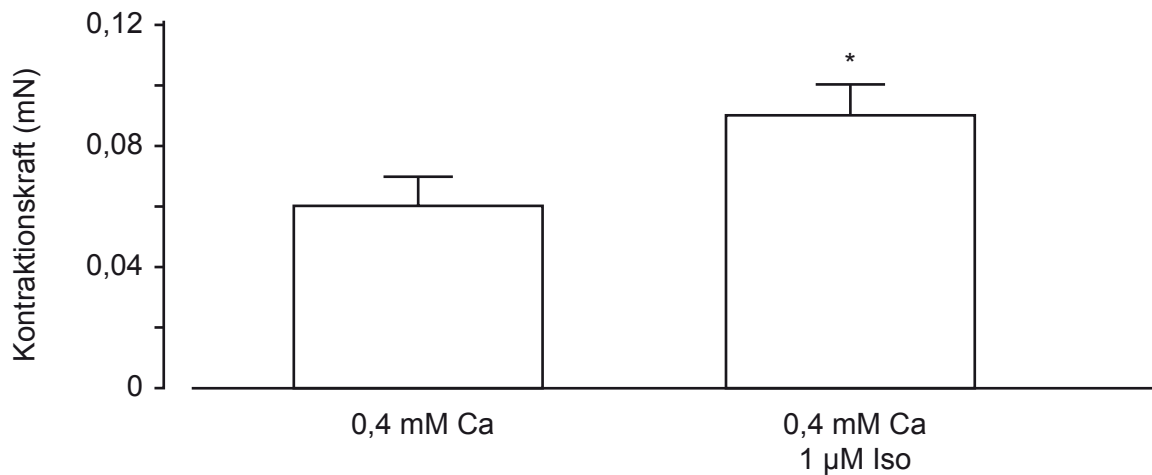
A**B**

Abb. 21: Isometrisches Kontraktionsexperiment mit mES-Zell-EHTs. (A) Gemessen wurde die Kontraktionskraft (mN) in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration (0,4-2,0 mM; n=8). (B) Dargestellt ist die Veränderung der Kontraktionskraft (in mN) nach Zugabe von 1 μ M Isoprenalin (Iso) bei 0,4 mM Calcium (n=14). * $p < 0,05$ vs. 0,4 mM Ca^{2+} (ANOVA für Messwiederholungen [A] bzw. gepaarter zweiseitiger t-Test [B]).

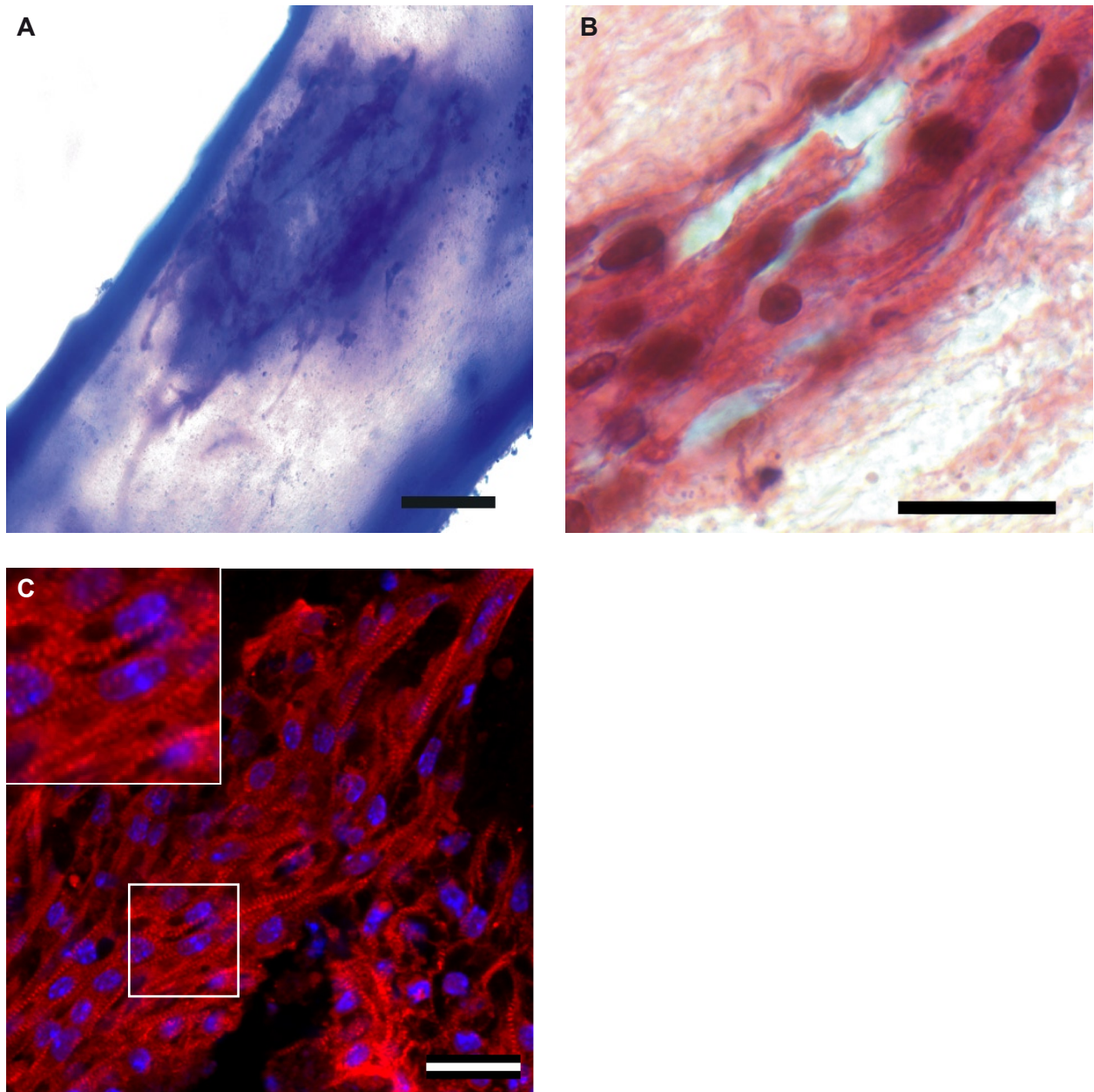


Abb. 22: Morphologische Untersuchungen von mES-Zell-EHTs: (A) Toluidinblau-Färbung eines Vibratomschnittes (150 μm) von einem mES-Zell-EHT nach 31 Kulturtagen. Zelluläre Bestandteile der EHTs waren blau gefärbt. (B) H&E-Färbung eines Mikrotomschnittes (4 μm) von einem mES-Zell-EHT. Dargestellt ist ein Muskelstrang in einem mES-Zell-EHT. (C) Immunfluoreszenzfärbung eines Vibratomschnittes (100 μm) von einem mES-Zell-EHT. In blau sind die Kerne mittels DAPI-Färbung dargestellt, in rot ist α -sarkomerisches Aktinin gefärbt. Der markierte Ausschnitt wurde zur besseren Darstellung der geordneten Sarkomerausbildung in mES-Zell-EHTs vergrößert. Maßstäbe: (A) 100 μm ; (B) 15 μm ; (C) 20 μm .

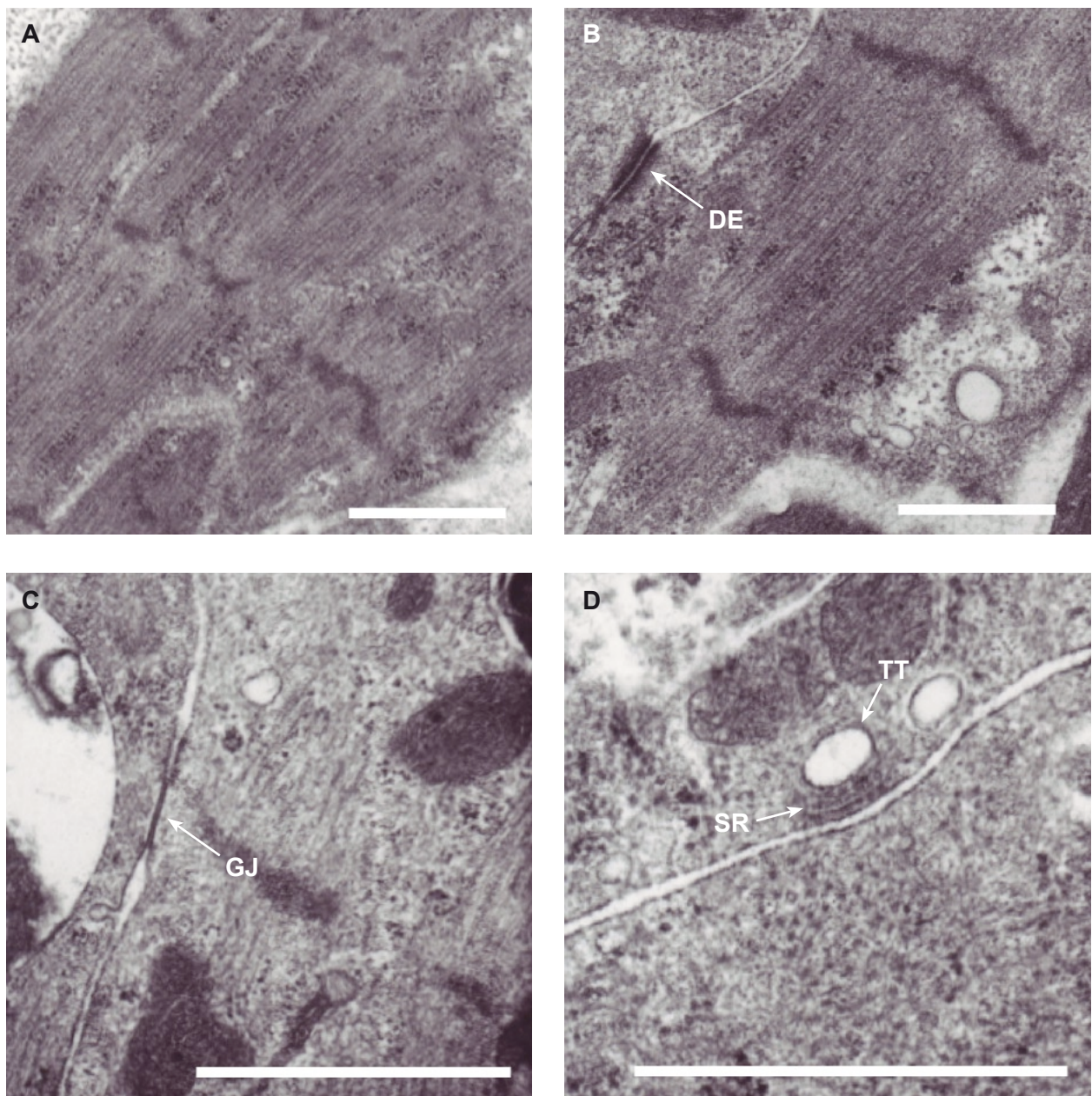


Abb. 23: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von mES-Zell-EHTs. (A) Ausbildung dichter, z.T. gut ausgebildeter Sarkomere. (B) Sarkomer und Zell-Zell-Kontakt durch ein Desmosom (DE). (C) Interzellularkontakt durch eine *Gap Junction* (GJ). (D) Diade, bestehend aus sarkoplasmatischem Retikulum (SR) und einem T-Tubulus (TT). Maßstäbe: 1 μm .

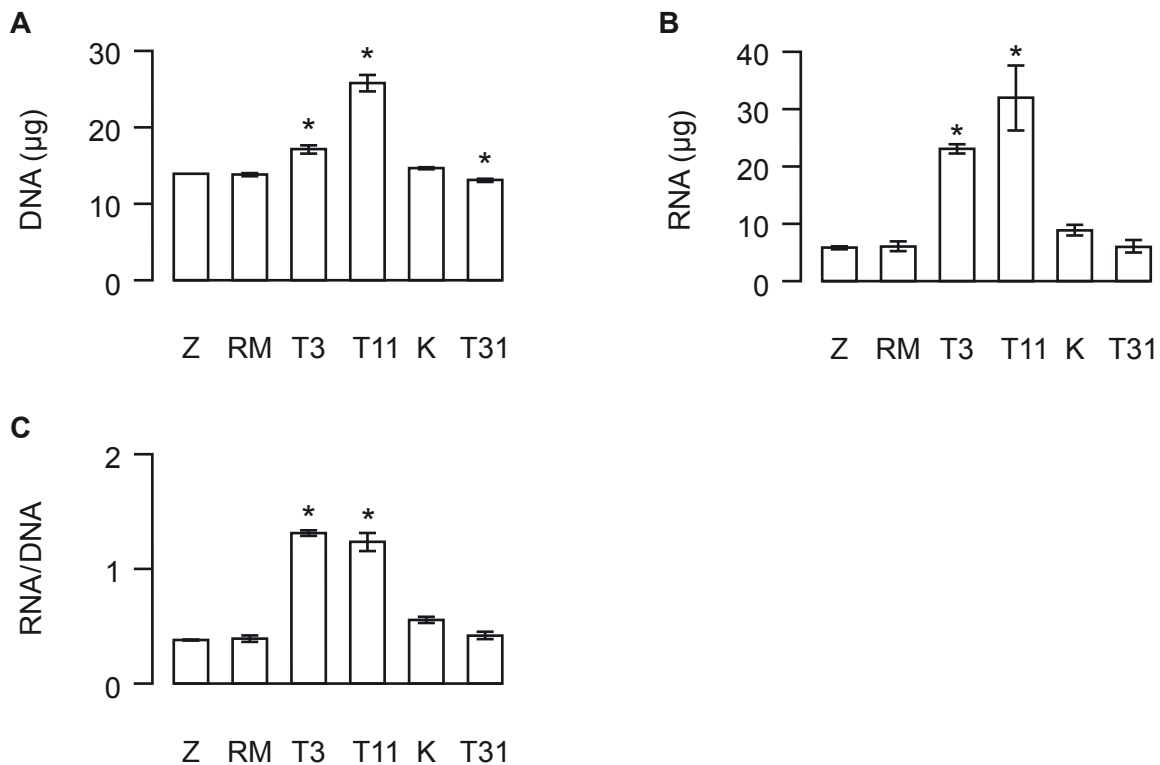


Abb. 24: Vergleich des DNA- (A) und RNA-Gehalts (B) sowie des Quotienten RNA/DNA in mES-Zellen und mES-Zell-EHTs ($1,5 \times 10^6$ Zellen/EHT; $n=7$ /Gruppe).

Z: $1,5 \times 10^6$ undifferenzierte mES-Zellen

RM: EHT-Rekonstitutionsmischung mit $1,5 \times 10^6$ undifferenzierten mES-Zellen

T3: EHTs an Kulturtag 3 vor Transfer auf die Dehnapparatur

T11: EHTs nach 11 Kulturtagen auf der Dehnapparatur ohne G418

K: EHTs mit ersten spontanen Kontraktionen an Kulturtag 19-24; G418-Selektion wurde ab Kulturtag 11 durchgeführt.

T31: EHTs nach 31 Kulturtagen

* $p < 0,05$ vs. RM (ANOVA mit Dunnett *post hoc*-Test)

3.5.1 Klonierung eines Multi-Indikator-Expressionskonstruktes

nLacZ (kodiert für die bakterielle β -Galaktosidase) mit dem Poly-A-Signal des humanen EF1-Proteins (Originalsequenz aus dem pWhere-Vektor [Invivogen]) wurde aus einem bereits klonierten Vektor (pBSK-L-pA; kloniert von S. Döker) isoliert (3694 bp NcoI-SpeI-Fragment) und in pBSK-IL (I: *internal ribosomal entry site 2* [IRES2; Originalsequenz aus pIRES2-Clontech-Vektor], L: nLacZ; kloniert von S. Döker) unter gleichzeitiger Exzision der nLacZ-Sequenz als NcoI-SpeI-Fragment eingefügt. Dieser Schritt war nötig, um ein nLacZ-Transgen mit einer adäquaten

Terminator-Poly-A-Sequenz 3' von der IRES2-Sequenz einzufügen. Das so hergestellte Plasmid wurde als pBSK-IL-pA bezeichnet. Im Folgenden wurde das IL-pA als XbaI-SpeI-Fragment (4293 bp) in pBSK-IRES2-GFP (pBSK-IG; kloniert von S. Döker) 3' der für eGFP kodierenden Sequenz über eine singuläre XbaI-Schnittstelle eingefügt (pBSK-IGIL). Das NeoR-Fragment wurde über PCR unter Verwendung von *Primern* mit künstlichen Sall- (Vorwärts*primer*) und BamHI (Rückwärts*primer*)-Schnittstellen aus dem α MHC-NeoR-Plasmid (Geschenk von Prof. Dr. L. Field, Indianapolis, USA) amplifiziert (811 bp) und in einen mit EcoRV geschnittenen pBSK-Vektor eingefügt (pBSK-N). Schließlich wurde das IRES2-eGFP-IRES2-nLacZ-pA (IGIL)-Fragment in die künstliche BamHI-Schnittstelle 3' von der NeoR in den pBSK-N eingefügt (pBSK-NIGIL). Aus dem Plasmid α MHC-NeoR wurde mit NotI die Neomycinresistenz ausgeschnitten und durch das SpeI-XhoI NeoR-IRES2-eGFP-IRES2-nLacZ-pA (NIGIL)-Fragment (6456 bp; nach Auffüllen der freien Sequenzenden mittels Klenow-Reaktion) direkt 3' vom α MHC-Promotor eingefügt (α MHC-NIGIL). Die Sequenz der klonierten Fragmente wurde jeweils per Sequenzierung überprüft. Das Klonierungsprotokoll für den α MHC-NIGIL-Vektor ist in Abb. 25 schematisch dargestellt.

3.5.2 Identifikation und Charakterisierung einer Multi-Indikator-mES-Zelllinie

mES-Zellen der R1-Zelllinie wurden mit 25 μ g des mit SspI linearisierten Plasmids α MHC-NIGIL mittels Elektroporation transformiert. 192 hygromycinresistente mES-Zellklone wurden isoliert. Die Überprüfung der Transgenintegration mittels *Southern Blotting* ergab 23 positive Klone (Abb. 26). Die Transgenexpression wurde schließlich in EB-Kulturen von 8 unabhängigen Zelllinien mittels Immunfluoreszenzdetektion von GFP (Abb. 27A), x-Gal-Reaktion (nLacZ; Abb. 27B) und erfolgreicher G418-Selektion (200 μ g/ml; 8 Kulturtage) nachgewiesen.

3.6 Herstellung von hES-Zell-EHTs

Spontan kontrahierende Embryoidkörper, gewonnen aus der humanen Zelllinie hES3-ENVY (von ESI zur Verfügung gestellt; [91]), wurden nach Verdau mit ES-Trypsin/EDTA (37 °C, 10 min) zur Herstellung von hES-Zell-EHTs verwendet. Dabei wurden zur EHT-Herstellung (450 μ l) 10.000 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen pro EHT eingesetzt (10.000 Zellen/EHT, n=4; 250.000 Zellen/EHT, n=4; $1,5 \times 10^6$ Zellen/EHT, n=18; $1,5 \times 10^6$ Zellen/EHT, n=2). Unter fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle konnte die Ausbildung der hES-Zell-EHTs beobachtet werden (Abb. 28). Nach 4 Tagen zeigten sich erste Kontraktionen größerer Zellaggregate in allen hES-Zell-EHTs unabhängig von der eingesetzten Zellzahl. In EHTs mit $1,5 \times 10^6$ und $1,5 \times 10^6$ Zellen wurde die Ausbildung zusammenhängender Muskelstränge beobachtet. Nach 5-7 Kulturtagen zeigten EHTs mit $1,5 \times 10^6$ bzw. $1,5 \times 10^6$ Zellen spontane und synchrone Kontraktionen (Kontraktionsfrequenz: $1,1 \pm 0,1$ Hz, n=3), die über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 3 Wochen konstant blieben. hES-Zell-EHTs mit weniger als $1,5 \times 10^6$ Zellen zeigten über diesen Kulturzeitraum lokale Kontraktionen.

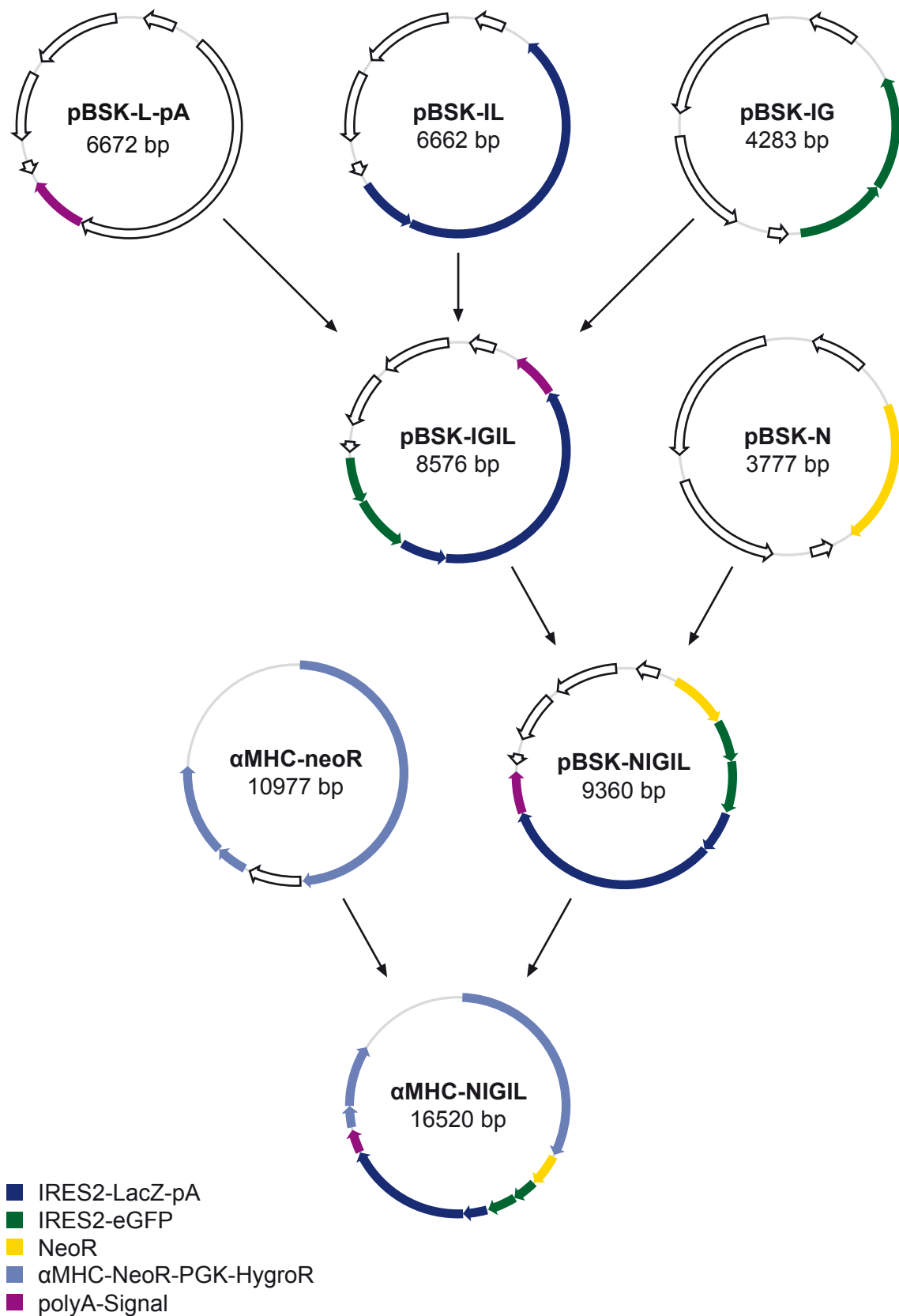


Abb. 25: Schematische Darstellung der Klonierung eines Multi-Indikator-Expressionskonstruktes.

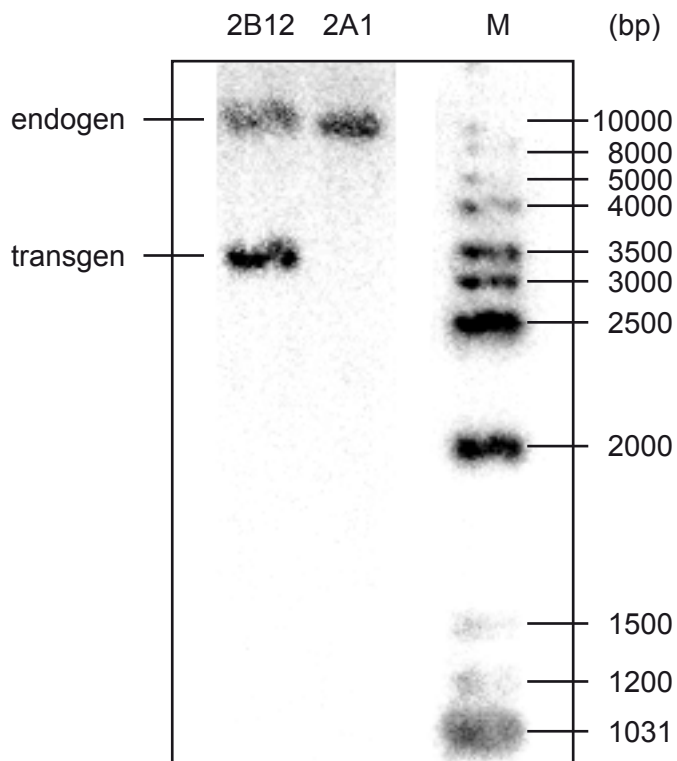


Abb. 26: *Southern Blot*-Analyse von mES-Zellen nach Elektroporation mit dem Reporterplasmid α MHC-NIGIL. Im *Southern Blot* (EcoRI-verdaute genomische DNA) zeigte sich eine endogene Bande bei ca. 10 kb (Fragment: 9594 bp), bei Integration des Transgens ergab sich eine zusätzliche Bande bei ca. 3,5 kb (Fragment: 3644 bp). M: DNA-Längenstandard.

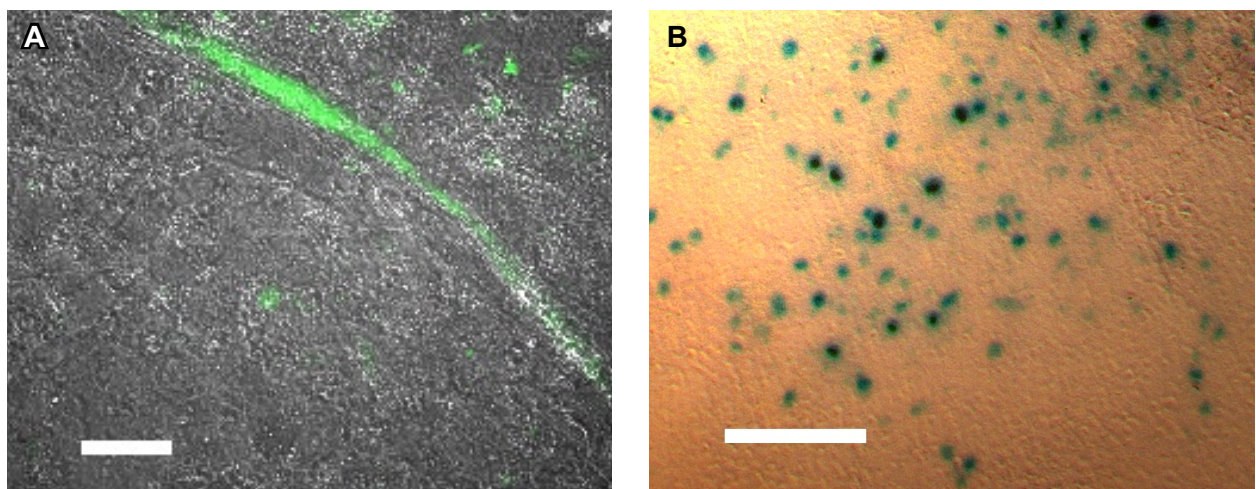


Abb. 27: Kontrolle der Transgenexpression in kontrahierenden Bereichen von EB-Kulturen. (A) Immunfluoreszenzdetektion von GFP und (B) Durchlichtmikroskopische Analyse der β -Galaktosidase-Expression. Maßstäbe: (A) 20 μ m; (B) 100 μ m.

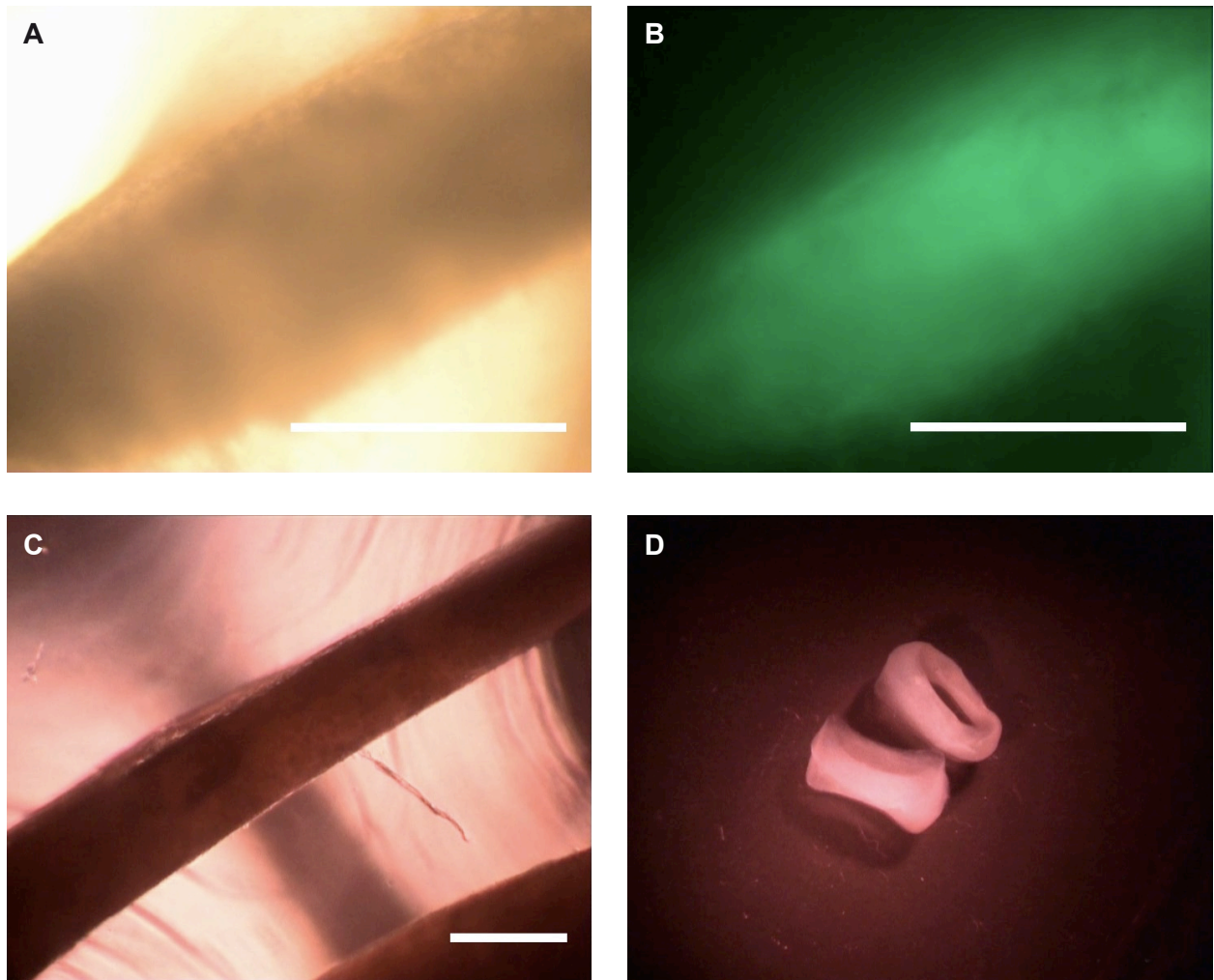


Abb. 28: Makroskopische und mikroskopische Darstellung von hES-Zell-EHTs. (A) Detailaufnahme eines kohärent kontrahierenden hES-Zell-EHT-Arms an Kulturtag 4 auf der Dehnapparatur. (B) Durch die ubiquitäre Expression von GFP in den hES-Zellen wird die Zellverteilung aus Abb. A veranschaulicht. (C) Vergrößerung eines hES-Zell-EHT-Segmentes auf einer statischen Dehnungsvorrichtung an Kulturtag 10. (D) Makroskopische Übersicht der kondensierten, kohärent kontrahierenden EHTs an Kulturtag 10. Maßstäbe: 1mm.

3.7 Charakterisierung von hES-Zell-EHTs

3.7.1 Isometrische Kontraktionsmessungen

Einzelne hES-Zell-EHTs entwickelten maximale Kontraktionskräfte von 0,24 mN (n=5) bei 2,8 mM Calcium. Im Mittel entwickelten hES-Zell-EHTs Kontraktionskräfte von $0,2\pm 0,01$ mN bei maximaler inotroper Stimulation mit Calcium (2,8 mM; n=5; Abb. 29A). Die Kontraktionskraft war unabhängig von der initial verwendeten Zellzahl ($1,5\text{-}15\times 10^6$) und der Kulturdauer (1-3 Wochen). Auf β -adrenerge Stimulation mit Isoprenalin (1 μM bei 0,4 mM Calcium) zeigten hES-Zell-EHTs eine Zunahme der Kontraktionskraft ($0,06\pm 0,01$ vs. $0,08\pm 0,004$ mN; Abb. 29B) und eine Verkürzung der Relaxationszeit (87 ± 4 vs. 111 ± 6 ms; n=3, $p<0.05$).

3.7.2 Frequenzmessung

hES-Zell-EHTs (n=3) zeigten in Tyrodelösung bei ca. 35 °C eine Spontanfrequenz von $0,8\pm 0,11$ Hz. Nach Zugabe von Isoprenalin (1 μM) zeigte sich ein positiv chronotroper Effekt mit einer Erhöhung der Kontraktionsfrequenz auf $1,2\pm 0,2$ Hz. Eine zusätzliche Gabe von 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX; 100 μM) zur maximalen Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führte zu einer weiteren Steigerung der Kontraktionsfrequenz auf $1,7\pm 0,1$ Hz (Abb. 30).

3.7.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Konfokale lasermikroskopische Aufnahmen von immunfluoreszenzmarkierten Vibratomschnitten (100 μm) der hES-Zell-EHTs zeigten die Ausbildung von Muskelbündeln mit längs ausgerichteten Sarkomerstrukturen (Abb. 31A) vergleichbar mit nativem Myokard, aber auch einzelne Kardiomyozyten ohne klare Ausrichtung (Abb. 31B). Die ubiquitäre Expression von GFP war ebenfalls nachweisbar.

3.7.4 Ultrastrukturanalyse

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der hES-Zell-EHTs zeigten zahlreiche Kardiomyozyten mit dünnen, aber gut differenzierten Sarkomeren (Abb. 32A). Ebenfalls zeigten sich analog zu den mES-Zell-EHTs Zell-Zell-Kontakte zwischen Kardiomyozyten in Form von *Fasciae adherentes* (Abb. 32B) sowie *Gap Junction/Desmosom*-ähnliche Strukturen (Abb. 32C) als Merkmal reifer Kardiomyozyten. Ein Großteil der hES-Zell-EHTs setzte sich aus Matrix zusammen. Dabei wurden vor allem quergestreifte Kollagenfibrillen identifiziert (Abb. 32D), was auf eine Neusynthese während der EHT-Kultur hinweist.

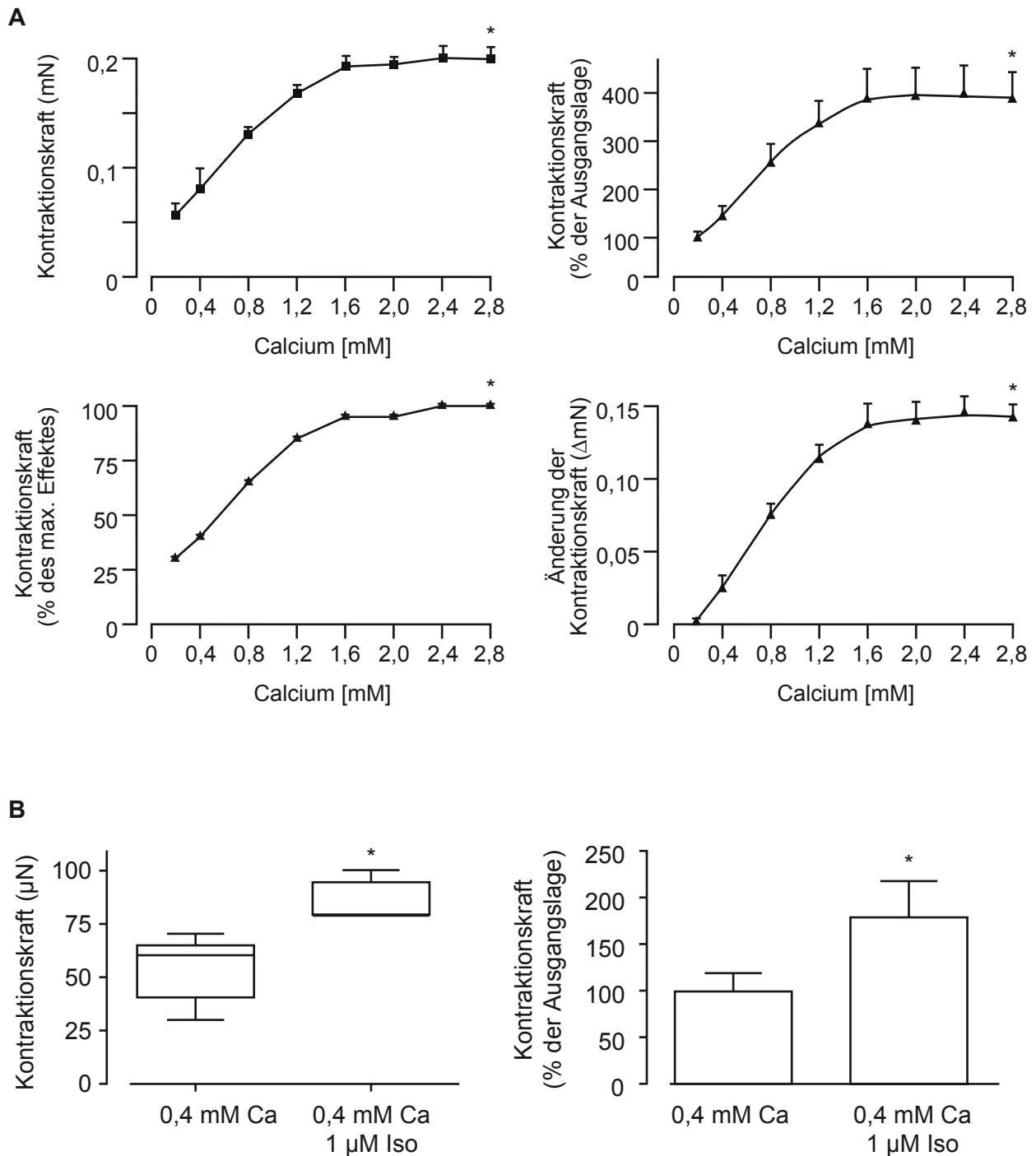


Abb. 29: Isometrisches Kontraktionsexperiment mit hES-Zell-EHTs. (A) Gemessen wurde die Kontraktionskraft (mN) in Abhängigkeit der extrazellulären Calciumkonzentration (0,2-2,8 mM; n=5). (B) Dargestellt ist die Veränderung der Kontraktionskraft nach Zugabe von 1 μM Isoprenalin (Iso) bei 0,4 mM Calcium (n=5). *p<0,05 vs. Ausgangslage (A) ANOVA für Messwiederholungen, (B) gepaarter zweiseitiger t-Test.

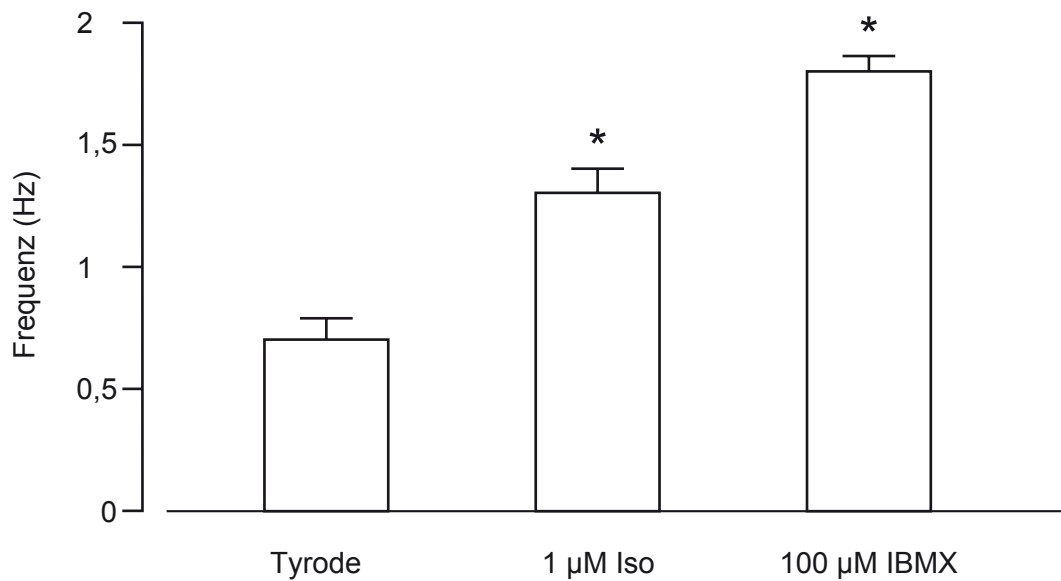


Abb. 30: Frequenzmessung von hES-Zell-EHTs (n=3). Bestimmung der Frequenz von hES-Zell-EHTs spontan, nach Zugabe von Isoprenalin (1 µM) und zusätzlich 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX; 100 µM) in HEPES-Tyrodelösung bei ca. 35 °C. *p<0,05 vs. Spontanfrequenz (ANOVA für Messwiederholungen).

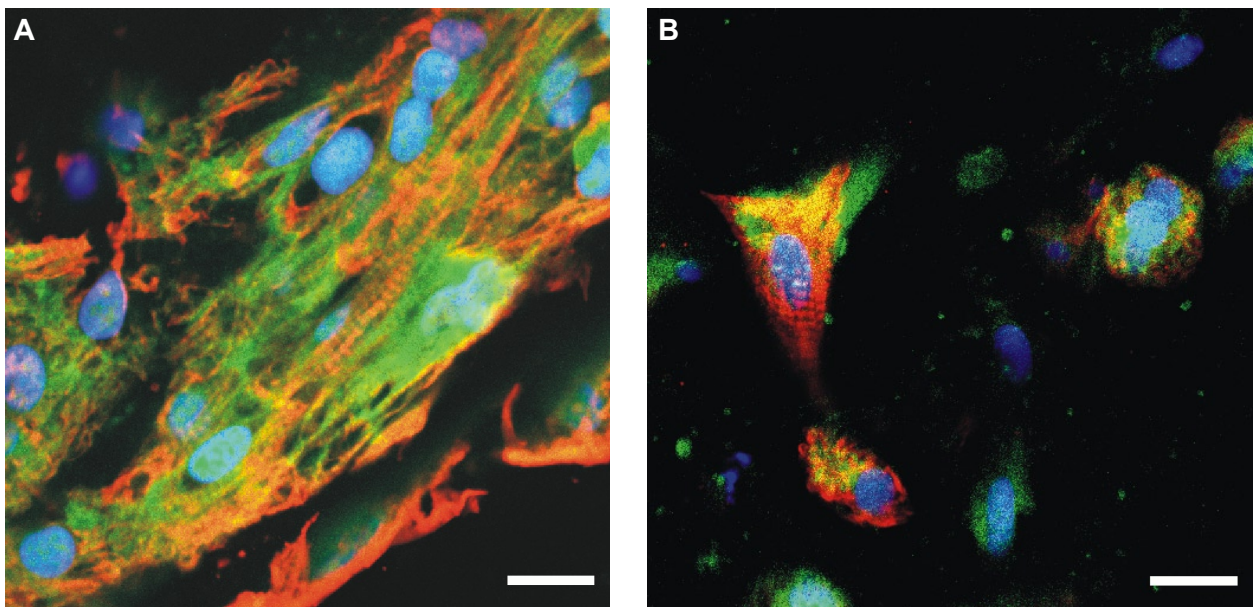


Abb. 31: Immunfluoreszenzfärbung eines Vibratomschnittes (100 µm) eines hES-Zell-EHTs ($1,5 \times 10^6$ Zellen, nach 7 Tagen statischer Dehnung). In einer konfokalen lasermikroskopischen Aufnahme von hES-Zell-EHTs aus in EBs vordifferenzierten, ubiquitär GFP-exprimierenden hES-Zellen ist die herzmuskelspezifische Querstreifung von α -Aktinin zu sehen. Blau: Draq, rot: α -Aktinin, grün: GFP. Maßstäbe: 20 µm.

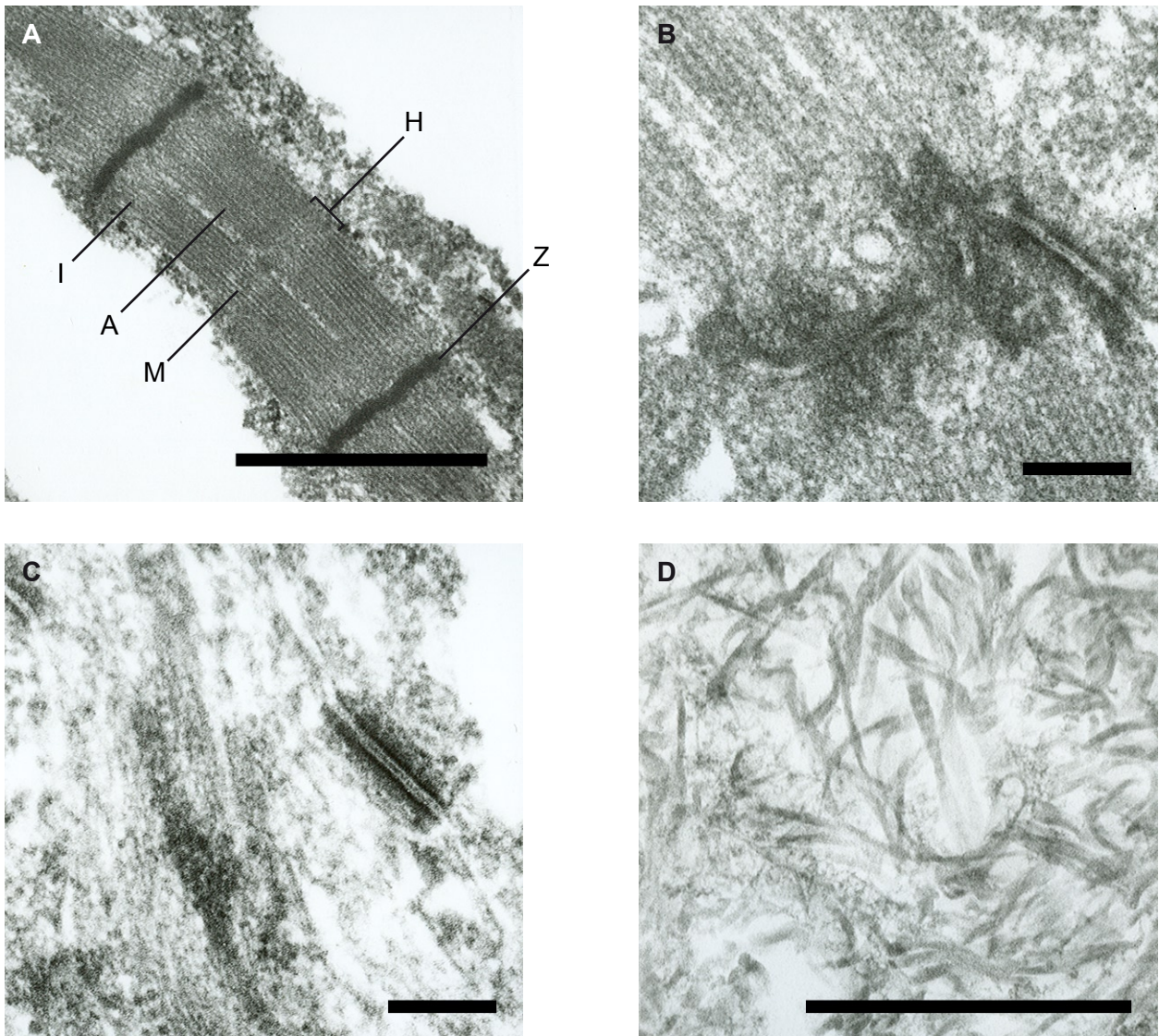


Abb. 32: Ultrastrukturanalyse von hES-Zell-EHTs. (A) Sarkomer mit klassischer Querstreifung (inkl. Z-, I-, A-, H-, M-Banden). (B) Zell-Zell-Kontakt zwischen Kardiomyozyten über eine *Fascia adherens* (C) Zell-Zell-Kontakt über eine *Gap Junction-/Desmosom-ähnliche* Struktur. (D) Quergestreifte Kollagenfibrillen (Pfeil) in der hES-Zell-EHT-Matrix. Maßstäbe: (A+D) 1 μm ; (B+C) 200 nm.

3.8 Implantation von hES-Zell-EHTs

hES-Zell-EHTs wurden auf Herzen immunsupprimierter Wistar-Ratten (n=7) genäht. Nach drei Wochen wurden die Herzen mit EHT-Implantat explantiert. Dabei waren die EHTs in allen Fällen bereits makroskopisch eindeutig erkennbar (Abb. 33A). Durch H&E-Färbungen (Abb. 33B) und immunhistochemische Markierungen von GFP (Abb. 33C) konnten die implantierten Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich ein Überleben von Kardiomyozyten sowie die Ausbildung von kompakten humanen Herzmuskelstrukturen (Abb. 33D).

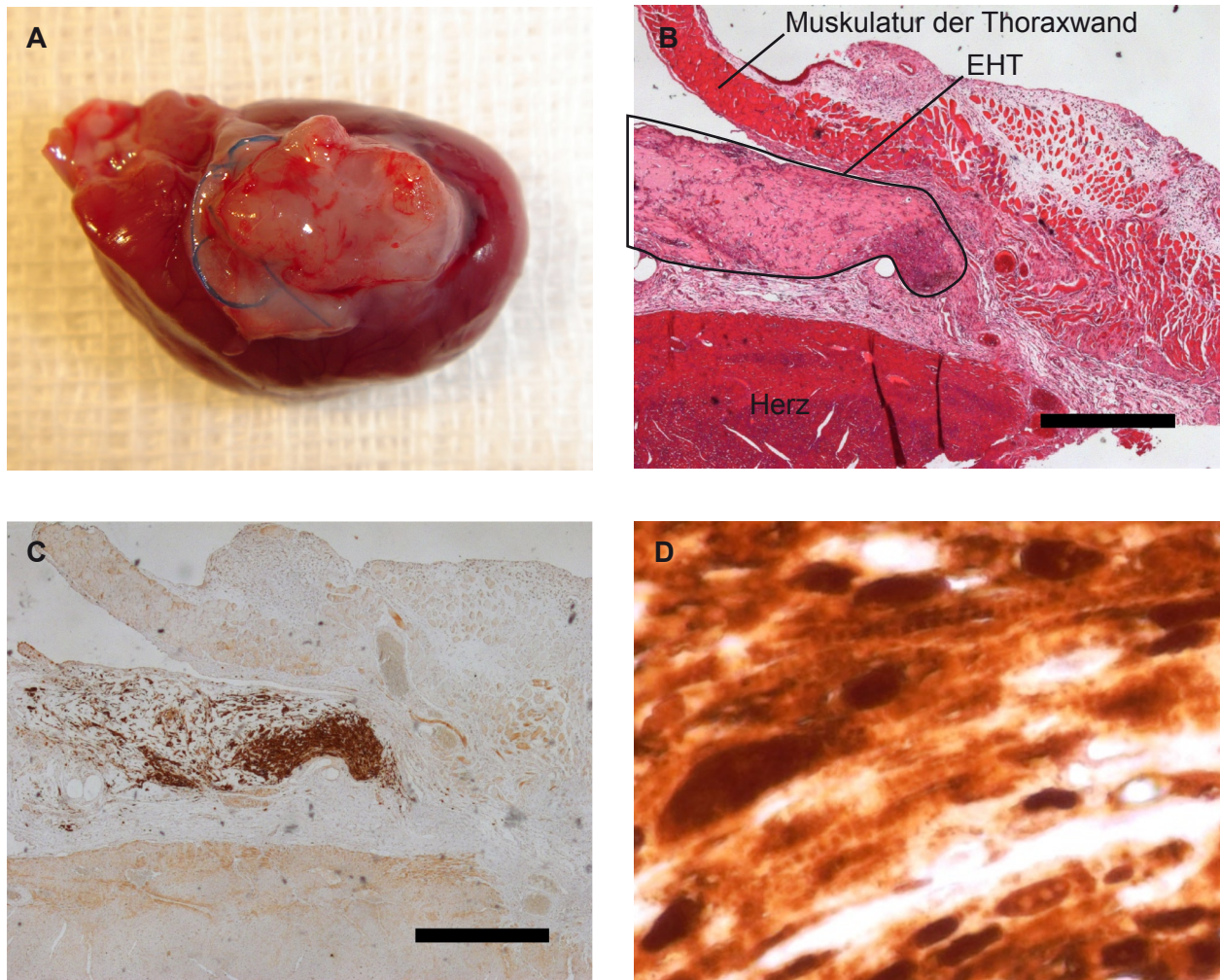


Abb. 33: Morphologische Untersuchungen eines hES-Zell-EHTs ($1,5 \times 10^6$ Zellen) drei Wochen nach Implantation auf ein gesundes Rattenherz. (A) Foto eines explantierten Rattenherzens mit aufgenähtem hES-Zell-EHT. (B) H&E-Färbung des Grenzbereiches zwischen Rattenherz und aufgenähtem hES-Zell-EHT. (C) Immunhistochemische Färbung mit Anti-GFP. (D) Vergrößerung aus C zur Darstellung von quergestreiften, GFP-positiven Muskelzellen. Maßstäbe: 500 μm .

4. Diskussion

Künstliche Herzgewebe eignen sich möglicherweise als *in vitro*-Modell zur pharmakologischen Substanzentwicklung und als Gewebeersatz *in vivo*. Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass künstliche Herzgewebe in Form von EHTs aus unreifen Herzzellen des Huhns und der Ratte sowie Kollagen und Matrigel hergestellt werden können [58, 59]. Kürzlich wurde ein entsprechendes Mausmodell etabliert [68]. Hierauf aufbauend sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Stammzell-EHT-Modell entwickelt werden. Dafür wurde zunächst eine transgene murine ES-Zell-Technik zur selektiven Aufreinigung von Kardiomyozyten in Anlehnung an eine Arbeit von Klug et al. [85] verwendet. Schließlich sollte auch die Anwendung von humanen ES-Zellen erprobt werden. Im Einzelnen stellten sich dabei folgende Fragen:

1. Können EHTs aus murinen ES-Zellen generiert werden?
2. Zeigen EHTs aus murinen ES-Zellen funktionelle und morphologische Eigenschaften von nativem Myokard?
3. Können EHTs aus humanen ES-Zellen generiert werden?
4. Zeigen EHTs aus humanen ES-Zellen funktionelle und morphologische Eigenschaften von nativem Myokard?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

1. Transgene mES-Zelllinien, die eine Selektion von differenzierten Kardiomyozyten ermöglichen, konnten in Anlehnung an ein Protokoll von Klug et al. [85] generiert werden.
2. EHTs konnten aus mES-Zellen hergestellt werden.
3. Für die EHT-Herstellung konnten undifferenzierte mES-Zellen der neu generierten selektionierbaren transgenen Zelllinien direkt eingesetzt werden.
4. mES-Zell-EHTs kontrahierten spontan und zeigten funktionelle Eigenschaften, die qualitativ denen des nativen Myokards entsprechen.
5. mES-Zell-EHTs konnten ohne Einschränkung ihrer Kontraktionskraft mindestens sechs Monate kultiviert werden.
6. mES-Zell-EHTs zeigten einige entscheidende morphologische Eigenschaften von nativem Myokard.
7. Eine Multi-Indikator-mES-Zelllinie konnte generiert werden, mit der die Entwicklung von mES-Zell-EHTs in Zukunft besser beschrieben werden soll.
8. EHTs konnten aus vordifferenzierten hES-Zellen hergestellt werden.
9. hES-Zell-EHTs zeigten qualitativ kontraktile Eigenschaften von nativem Myokard.
10. hES-Zell-EHTs zeigten wesentliche morphologische Eigenschaften von nativem Myokard.
11. hES-Zell-EHTs konnten auf gesunde Rattenherzen implantiert werden und überlebten für mindestens drei Wochen *in vivo*.

4.1 Kardiales *Tissue Engineering*

Zur Herstellung künstlicher Herzgewebe existieren verschiedene Vorgehensweisen: (1) Besiedelung von vorgeformten Matrices mit Herzmuskelzellen [50, 54-57], (2) Förderung einer spontanen myokardialen Rekonstitution in einem dreidimensionalen, weitestgehend unstrukturierten, kardiogenen Milieu [58-60] und (3) Stapelung von Einzelschichtkulturen [61]. Die für eine Myokardfunktion essentielle Entwicklung von systolischer Kontraktionskraft konnte bisher in *Artificial Myocardial Tissue* (AMT), generiert durch eine Besiedelung von Kollagenschwämmen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten [56], in EHTs aus Herzzellen embryonaler Hühnchen und neonataler Ratten [58-60] sowie in gestapelten Einzelschichtkulturen aus neonatalen Rattenkardiomyozyten [61] nachgewiesen werden. Die maximalen Kontraktionskräfte von AMTs betragen 0,02 mN [56], die der EHTs und der Kardiomyozyten-Stapel 2-4 mN [63]. Die geringere Kontraktionskraft von AMTs lässt sich vermutlich auf die Verwendung von vorgeformten, stabilen, und damit relativ steifen Matrices zurückführen. In dieser Kulturform wird anscheinend eine Ausbildung von dreidimensionalen, Kontraktionskraft-bildenden Einheiten erschwert, was sich in der Ausbildung von nur wenig differenzierten myokardialen Strukturen widerspiegelt [64]. Im Gegensatz dazu wird die spontane Ausbildung von Muskelstrukturen in EHTs durch die verwendete Kollagen/Matrigel-Matrix vermutlich wenig behindert. Bei der Stapelung von Einzelschichtkulturen ist der Matrixanteil zu vernachlässigen. Aus diesen Befunden lässt sich die Hypothese ableiten, dass Matrixkomponenten bei der Herstellung künstlicher Herzgewebe auf ein notwendiges Minimum reduziert werden sollten. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen unserer [92] sowie von anderen Arbeitsgruppen [93], dass Verfahren zur „biomimetischen“ *in vitro*-Konditionierung z.B durch Dehnung [53, 92] oder elektrische Stimulation [93] die Entwicklung von künstlichen Herzmuskelgeweben fördern.

Künstliche Herzgewebe werden in der Regel als myokardiales *in vitro*-Modell oder für den Gewebeersatz *in vivo* entwickelt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass EHTs aus Herzzellen embryonaler Hühnchen und neonataler Ratten Eigenschaften von nativem Myokard entwickeln [58-60]. Darüber hinaus konnte die Auswirkung transgener Manipulationen der β -adrenergen Signalkaskade z.B. durch die Überexpression des Phosphatase Inhibitor-1 in EHTs untersucht werden [94]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich EHTs prinzipiell für die Analyse „herzwirksamer“ Pharmaka sowie für die Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen in Herzmuskelzellen eignen könnten. Neben der *in vitro*-Anwendung konnte gezeigt werden, dass sich EHTs im Rattenmyokardinfarktmodell therapeutisch einsetzen lassen [53].

Bisher wurden EHTs aus primären Herzzellen generiert. Daraus ergeben sich folgende Nachteile: (1) Primäre Zellkulturen sind nur schlecht standardisierbar, (2) für die Gewinnung von Herzzellen müssen beträchtliche Mengen an Embryonen (Hühnchen) bzw. Neonaten (Ratten) getötet

werden, (3) eine „Humanisierung“ des EHT-Modells ist bei Anwendung von primären Zellen nicht möglich. Vor diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit, zunächst ein murines embryonales Stammzell-EHT-Modell zu entwickeln und darauf aufbauend die Anwendung humaner embryonaler Stammzellen zu erproben.

4.2 Embryonale Stammzellen zur Herstellung von EHTs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig künstliche Herzgewebe aus ES-Zellen der Maus und des Menschen hergestellt. ES-Zellen sind *in vitro* nahezu unbegrenzt proliferationsfähig (Fähigkeit zur Selbsterneuerung) und können in alle Zellen, die sich aus den drei Keimblättern entwickeln, differenzieren (Pluripotenz) [78, 79, 81, 82, 95, 96]. Aufgrund dieser Eigenschaften stellen ES-Zellen prinzipiell eine unlimitierte Zellquelle für alle somatischen Zellen, inklusive Kardiomyozyten, dar. Ob sich diese Zellen allerdings zur Herstellung von EHTs eignen würden, war zu Beginn dieser Arbeit unklar. Während die Pluripotenz von ES-Zellen auf der einen Seite eine wichtige Voraussetzung für eine Anwendung im Bereich des myokardialen *Tissue Engineerings* darstellt, ist die damit einhergehende Differenzierung in nicht-myokardiale Zellen ein wesentliches Problem. Unter basalen Bedingungen bestehen sogenannte Embryoidkörperkulturen nur aus etwa 5-10% Herzmuskelzellen [79]. Daher ist eine Aufreinigung der Herzmuskelzellen für eine Anwendung im myokardialen *Tissue Engineering* zwingend erforderlich. Dieses könnte entweder durch Selektion der Herzmuskelzellen oder durch Erhöhung der myokardialen Differenzierungseffizienz erfolgen. Während es bisher keine einheitliche Datenlage zur Induktion der kardialen Differenzierung gibt [80], haben Klug et al. [85] ein Verfahren zur Positivselektion von aus embryonalen Stammzellen differenzierten Herzmuskelzellen entwickelt. Dabei wurde ein selektionierbarer Marker als Transgen stabil in das Genom von ES-Zellen integriert. Es handelte sich hierbei um eine Antibiotikaresistenz (Neomycin-Resistenz; NeoR), deren Expression unter der Kontrolle des Herzmuskelzell-spezifischen α MHC-Promotors stand [85]. Dieser Ansatz wurde auch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit verwendet. Alternativ ist die Anwendung von anderen Resistenzgenen (z.B. Puromycin-Resistenz [97]) und die Anwendung von fluoreszierenden Reportergenen (z.B. eGFP [98]) beschrieben worden. Auch die Aufreinigung über Percoll-Gradienten-Zentrifugationsverfahren ist möglich [99, 100]. Dass sich per Zentrifugationsverfahren aufgereinigte Herzmuskelzellen grundsätzlich zur Herstellung von EHT eignen, konnte zwischenzeitlich von Guo et al. [99] gezeigt werden. Auch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte bestätigt werden, dass EHTs mit aus Embryoidkörperkulturen abgeleiteten Herzmuskelzellen hergestellt werden können. Es zeigte sich jedoch auch, dass die Anwendung von zunächst differenzierten und dann selektionierten Kardiomyozyten ein äußerst aufwendiges Verfahren darstellt, mit dem EHTs kaum in einem größeren Maßstab herstellbar wären. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, das die Verwendung von undifferenzierten ES-Zellen in EHTs erlaubt. Dabei wurde

zunächst auf die gewonnenen Erfahrungen zur Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten in Standard-Embryoidkörperkulturen zurückgegriffen. Im EHT kam es in einem ähnlichen Zeitfenster wie in der Adhäsionskultur zu einer kardialen Differenzierung. Unter optimierten Bedingungen waren 19 Tage nach EHT-Herstellung aus undifferenzierten mES-Zellen, d.h. nach 3 Kulturtagen in Gussformen und 16 Kulturtagen auf Dehnvorrichtungen, kontrahierende Areale sichtbar. Diese wurden zunächst nur in sich ausbildenden Embryoidkörpern in EHTs identifiziert. Durch G418-Selektion zum Zeitpunkt einer bereits ausgeprägten Embryoidkörperentwicklung in EHTs war es nun möglich, Nichtkardiomyozyten abzutöten. Dieses führte in 12-20 Tagen zur Ausbildung von synchron kontrahierenden EHTs. Dass es in EHTs überhaupt zu einer sonst für die Adhäsionskultur typischen Ausbildung von Embryoidkörpern mit Herzmuskelzellen kam, war zunächst überraschend. Die sich daraus ableitende Hypothese, dass das EHT-Modell einen eigenen kardialen Differenzierungsreiz darstellt, muss in Folgeuntersuchungen geklärt werden.

Um die Differenzierungsprozesse der eingesetzten ES-Zellen in EHTs besser analysieren zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere transgene ES-Zelllinie entwickelt. Dazu wurde zunächst ein Expressionskonstrukt generiert, das neben der Neomycin-Resistenz auch für ein fluoreszierendes Indikatorprotein (eGFP) und eine kernlokalisierte β -Galaktosidase (nLacZ) kodiert. Auch hier wurde die Transgenexpression unter die Kontrolle des Herzmuskel-spezifischen α MHC-Promotors gestellt. Die einzelnen Reporter wurden über *internal ribosomal entry sites* (IRES-Elemente aus dem Encephalomyokarditisvirus) verbunden, so dass es prinzipiell zu einer gleichzeitigen Expression aller drei Transgene kommen müsste. Im Einzelnen sollten die gewählten Transgene eine Beobachtung der Muskelrekonstitution im Lebendpräparat ermöglichen (eGFP) und darüber hinaus, z.B. bei einer Anwendung als Gewebeimplantat *in vivo*, eine eindeutige Abgrenzung implantierter transgener Herzmuskelzellen (blaue Zellkerne) vom nativen Myokard erlauben. Die Abgrenzung ist grundsätzlich auch über die GFP-Fluoreszenz möglich. Allerdings ist davon auszugehen, dass ein β -Galaktosidase-Nachweis eine höhere Sensitivität und auch Spezifität insbesondere in Geweben mit einem hohen Grad an Autofluoreszenz besitzt. Neben der Markierung zur eindeutigen Identifikation von Kardiomyozyten in histologischen Präparaten sollte die GFP-Fluoreszenz eine Aufreinigung per FACS und die β -Galaktosidase eine Analyse der Zellteilungsaktivität in Herzmuskelzellen auch in Mischkulturen ermöglichen [101]. ES-Zell-EHTs aus der neu etablierten Indikatorzelllinie wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht generiert. In Zukunft soll das Multiindikatormodell jedoch dazu dienen, (1) die Herstellung von ES-Zell-EHTs weiter zu optimieren und (2) Faktoren zu identifizieren, die eine Ausbildungen von Herzmuskelgewebe (*de novo* oder durch Induktion von hypertrophem Wachstum) fördern oder gegensätzliche Effekte (Herzmuskelwachstumshemmung oder Kardiotoxizität) hervorrufen.

Neben der Anwendung transgener muriner ES-Zellen zur Herstellung von EHTs wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren zur Herstellung von EHTs aus humanen ES-Zellen entwickelt. In diesem Modell standen transgene Verfahren nicht zur Verfügung, so dass auf eine manuelle Anreicherung von Herzmuskelzellen zurückgegriffen wurde. Dieses setzt die Bereitstellung großer Mengen undifferenzierter humaner embryonaler Stammzellen sowie eine gezielte Differenzierung mit anschließender manueller Dissektion kontrahierender Embryoidkörper voraus. Entsprechende Voraussetzungen bestanden in Hamburg nicht. Erst durch eine Kooperation mit der Firma Embryonic Stem Cell International (ESI) aus Singapur, wurde eine Bereitstellung der benötigten humanen Embryoidkörper (ca. 1000 Stück) mit einem Kardiomyozytenanteil von 5-20%, sowie die anschließende Herstellung von humanen EHTs möglich.

Zusammenfassend weisen die Untersuchungen dieser Arbeit darauf hin, dass EHTs vermutlich aus jeder unreifen Kardiomyozytenpopulation hergestellt werden können. Der entscheidende Punkt scheint lediglich die Bereitstellung von großen Herzmuskelzellkollektiven zu sein. Vor diesem Hintergrund sind Bioreaktorverfahren mit der Möglichkeit zur Bereitstellung von vielen Millionen Kardiomyozyten sowie Verfahren zur gezielten Induktion einer kardialen Differenzierung von großer Bedeutung und sollen zukünftig als Grundlage für eine Herstellung von EHTs aus murinen aber auch humanen ES-Zellen erprobt werden [102-104].

4.3 Eigenschaften von ES-Zell-EHTs

Das Ziel bei der Herstellung künstlicher Herzgewebe ist die Entwicklung von Gewebekonstrukten mit einer adäquaten kontraktile Funktion sowie einer differenzierten Muskelstruktur. Die im Rahmen dieser Studie entwickelten murinen und humanen EHTs zeigten in der Tat sowohl funktionelle als auch morphologische Eigenschaften von nativem Myokard. Zugleich war aber auch deutlich, dass sich ES-Zell-EHTs nicht in allen Punkten mit nativem Herzgewebe vergleichen lassen. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten murinen und humanen ES-Zell-EHTs kontrahierten spontan und kohärent. Bei Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration wie auch β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin zeigte sich ein für Herzmuskelgewebe typischer positiv inotroper Effekt. In humanen ES-Zell-EHTs wurde darüber hinaus ein für β -adrenerger Stimulation typischer positiv lusitroper sowie positiv chronotroper Effekt nachgewiesen. Bei gleichzeitiger Blockade der Phosphodiesterase mit IBMX konnte die Spontanfrequenz von humanen ES-Zell-EHTs weiter gesteigert werden. Neben diesen typischen Antworten auf pharmakologische Interventionen, war jedoch deutlich, dass EHTs sehr sensitiv auf Änderungen der extrazellulären Calciumkonzentration ansprachen ($EC_{50} \sim 0,4-0,8$ mM). Eine ähnlich hohe Sensitivität wurde bereits im EHT-Modell der Ratte und der Maus beobachtet [60, 68]. Grundsätzlich deutet dieser Befund auf eine unphysiologische bzw. unreife Calciumhomöostase in EHTs hin. Gründe für

diesen Unterschied zu nativem Herzgewebe könnten eine gesteigerte Funktion sarkolemmaler Calciumtransporter (z.B. Natrium-Calcium-Austauscher), eine verminderte Calciumspeicher- und Freisetzungskapazität des sarkoplasmatischen Retikulums und/oder Unterschiede in der Calciumsensitivität der Myofibrillen sein. Dass die kontraktile Funktion von unreifem Herzgewebe wesentlich von sarkolemmalem Calcium-In- und Efflux abhängt, ist u.a. anderem von Vornanen et al. [105] beschrieben worden. In weiterführenden Analysen zur Rolle Calcium- und auch Natriumtransportierender Systeme in ES-Zell-EHTs soll dieser Befund weiter untersucht werden.

Weiterhin zeigten die durchgeführten Kontraktionsexperimente deutlich, dass die absolute Kontraktionskraft von ES-Zell-EHTs im Vergleich zu nativem Herzgewebe suboptimal war. Rattenpapillarmuskeln können Kontraktionskraft von bis zu 56 mN/mm² entwickeln [106]. Dagegen zeigten murine und humane ES-Zell-EHTs maximale Kontraktionskräfte von 0.2 mN. Optimierte EHTs aus Herzmuskelzellen der Ratte entwickeln Kontraktionskräfte von >5 mN (unpublizierte Daten der eigenen Arbeitsgruppe). Diese Diskrepanz hat vermutlich folgende Gründe: (1) Herzmuskelzellen in ES-Zell-EHTs sind nicht terminal differenziert, (2) die Sarkomermenge pro Kardiomyozyte in ES-Zell-EHTs ist suboptimal, (3) die Ausrichtung der Muskelzellen in ES-Zell-EHTs ist nicht immer streng isotrop, (4) das Calciumspeicher- und Freisetzungsvermögen ist vermutlich nicht voll ausgebildet, (5) EHTs setzen sich zum größten Teil aus Matrix und nur wenigen Herzmuskelzellen zusammen (<30% des EHT-Durchmessers besteht aus Kardiomyozyten). Es ist davon auszugehen, dass eine Optimierung dieser Parameter zu einer Erhöhung der Kraftentwicklung führen würde.

Neben funktionellen wurden ebenfalls morphologische Eigenschaften der mES- und hES-Zell-EHTs im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dabei zeigte sich eine dichte Zellbesiedlung der EHT-Oberflächen sowie die Ausbildung von Zellansammlungen innerhalb der EHTs. Dies deutet darauf hin, dass auch in zentralen EHT-Bereichen eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet ist. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in EHTs aus neonatalen Rattenkardiomyozyten gemacht [60]. Wie bereits angesprochen, zeigte sich bei morphologischen Untersuchungen trotz eines hohen individuellen Reifegrades von Einzelzellen, dass ein nur geringer Anteil der EHT-Fläche tatsächlich Herzmuskelzellen enthielt. Der hohe Reifegrad von Einzelzellen (u.a. häufiger elektronenmikroskopischer Nachweis von M-Banden in gut ausgebildeten Sarkomeren) spricht aber wiederum für die Hypothese, dass das EHT-Millieu die Reifung von Kardiomyozyten unterstützt. Für die Anwendung als pharmakologisches *in vitro*-Modell erscheint die Etablierung eines terminal differenzierten Gewebes von großer Bedeutung. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die Reifung von Kardiomyozyten *in vitro* kaum schneller voran schreiten kann, als unter physiologischen Bedingungen *in vivo*. Ob dieser Argumentation zur Folge eine längere Kulturdauer zu einem höheren Reifegrad führt, bleibt zu überprüfen. Zusätzlich ist davon

auszugehen, dass mechanische [53, 92] sowie elektrische [93] Konditionierungen oder auch eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren [60, 107], wie bereits im Rattenmodell nachgewiesen, auch in ES-Zell-EHTs eine Differenzierung von Herzmuskelzellen fördern würden. Für eine Anwendung als Ersatzgewebe *in vivo* erscheint die Herstellung von terminal differenziertem Gewebe dagegen nicht unbedingt erforderlich. Dies könnte vielmehr nachteilig sein, da davon auszugehen ist, dass „reife“ Gewebe einen höheren metabolischen bzw. Sauerstoff-Bedarf aufweisen und damit nach Implantation *in vivo* durch Ausbleiben einer sofortigen Durchblutung unter den bestehenden hypoxischen Belastungen Schaden nehmen würden. „Unreife“, Hypoxie-resistentere Gewebekonstrukte hätten hier vermutlich einen Überlebensvorteil.

4.4 Bedeutung von Nichtkardiomyozyten bei der Herstellung von ES-Zell-EHTs

Die Differenzierung von unreifen Vorläuferzellen zu funktionellen Kardiomyozyten und deren Reifung scheint im Embryo durch Botenstoffe aus anderen Geweben beeinflusst zu werden [108-110]. Auch im EHT-Modell der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass Nichtkardiomyozyten bei der Ausbildung kontraktile Herzmuskelgewebe eine wichtige Rolle spielen [107]. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete transgene Konzept basiert auf der Anwendung eines Selektionsmarkers (Neomycin-Resistenz) unter der Kontrolle des Herzmuskel-spezifischen α MHC-Promotors. Dadurch können prinzipiell alle Nichtkardiomyozyten in Herzzellmischkulturen abgetötet werden. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass selbst Zellen, die eine Neomycin-Resistenz exprimieren, bei einer höheren G418 Konzentration abgetötet werden können [111]. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass eine zu frühe oder zu starke Selektion von Nichtkardiomyozyten die Ausbildung von funktionsfähigen EHTs verhinderte. Bei einem Selektionsbeginn vor Kulturtag 9 war die α MHC-Promotoraktivität vermutlich nicht ausreichend, so dass es zum generellen Abtöten nahezu aller Zellen kam. Auf der anderen Seite drohte bei einem zu späten Selektionstart eine Überwucherung der Gewebekonstrukte mit Nichtkardiomyozyten. Bei einer Anwendung von $>400 \mu\text{g/ml}$ G418 könnte der Selektionsschutz durch die Neomycin-Resistenz nicht ausreichend gewesen sein. Schließlich wurde der Selektionsbeginn auf Kulturtag 11 terminiert. Zugleich wurden maximal $200 \mu\text{g/ml}$ G418 und eine einmalige Verabreichung pro Woche als Selektionsbedingungen gewählt. Dadurch sollte eine zu schnelle bzw. eine komplette Abtötung von Nichtkardiomyozyten verhindert werden. Es ist davon auszugehen, dass Nichtkardiomyozyten im Rahmen der Herstellung von EHTs aus ES-Zellen gerade zu Beginn der Kultur für die nötige Geweberetraktion/Gewebestruktur verantwortlich waren. Passend dazu zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen aus ES-Zell-EHTs, dass es zu einer massiven Neubildung von Kollagen im Kulturverlauf, vermutlich durch Nichtkardiomyozyten, kam. Dass die G418-Selektion dennoch zu einer Kontrolle von ungewolltem Wachstum geführt hat, wurde deutlich, als es in Langzeitkulturen (183 Tage) nach Weglassen von G418 in nur 4 Tagen zu einem kompletten Funktionsverlust in einem von 2 EHTs bei gleichzeitigem

Auftreten von nicht näher charakterisierten Gewebewucherungen bei beiden EHTs kam. Die Rolle von Nichtkardiomyozyten für die Ausbildung von Herzmuskelgewebe *in vitro* soll in Zukunft unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit generierten Indikatorzelllinie (α MHC-NIGIL) sowie von G418-resistenten Nichtkardiomyozyten aus entsprechenden transgenen Modellen (ubiquitäre Expression einer Neomycin-Resistenz) weiter untersucht werden.

4.5 Implantation von EHTs

EHTs können im Rattenmodell zur partiellen Reparatur von infarziertem Herzgewebe verwendet werden [53]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Überleben von hES-Zell-EHTs nach Implantation auf gesunde Rattenherzen überprüft. Nach drei Wochen konnten die implantierten humanen Zellen durch die ubiquitäre Expression von GFP eindeutig nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich auch ein Erhalt der bereits *in vitro* beobachteten myokardialen Strukturen. Alle Implantationsexperimente dieser Arbeit fanden unter Immunsuppression statt. Die Arbeitsgruppe um Drukker konnte zeigen, dass ES-Zellen keine MHC II- und nur geringe Mengen an MHC I-Antigen exprimieren [112]. Bei einer Verwendung von undifferenzierten ES-Zellen sollte die Abstoßung eines Implantats daher geringer ausfallen. Dieses ist jedoch bei der Verwendung von künstlichem Herzgewebe aus embryonalen Stammzellen nicht zu erwarten, da EHTs zum größten Teil aus differenzierten und damit immunkompetenten Zellen bestehen. Darüber hinaus wurden EHTs aus diversen stark immunogenen Materialien wie Matrigel und tierischen Seren hergestellt, die bei einer Implantation in das gewählte Rattenmodell unabhängig von den Zellen eine Immunreaktion hervorrufen können. Dass diese immunogenen EHT-Bestandteile nicht einfach ausgewaschen werden können, wurde bereits in früheren Untersuchungen beobachtet [52]. Ob sich vor diesem Hintergrund Verfahren zur Toleranzinduktion anwenden lassen, bleibt abzuwarten [113].

Da sich ES-Zellen ungehemmt teilen können, besteht bei einer *in vivo*-Anwendung immer die Gefahr der Tumor- bzw. Teratombildung. Daher muss bei einer *in vivo* anwendbaren Stammzelltechnologie immer das Zellwachstum kontrollierbar sein. Eine Mischpopulation von Kardiomyozyten mit noch unreifen, pluripotenten ES-Zellen könnte nach Implantation zur Bildung von unerwünschtem Fremdgewebe oder auch von Tumoren aus differenzierten Zellen (Teratomen) und insbesondere unkontrolliert proliferierenden, undifferenzierten Zellen (Teratokarzinomen [114]) führen [82, 96, 115]. Bei der Implantation von hES-Zell-EHTs konnte in den hier dargestellten ersten morphologischen Untersuchungen keine Tumorbildung festgestellt werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass vordifferenzierte Zellen eingesetzt wurden, die kein tumorigenes Potential mehr besaßen. Detaillierte Untersuchungen hinsichtlich unkontrollierten Wachstums sind für die Zukunft vorgesehen.

Wie erwartet kam es bei der EHT-Herstellung aus undifferenzierten mES-Zellen zur Bildung embryoidkörperartiger Strukturen. Diese konnten während einer 20tägigen G418-Selektion (200 µg/ml) scheinbar beseitigt werden. Nach Beendigung der Selektion wurde die Entstehung der Embryoidkörper allerdings erneut beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass das eingesetzte G418 nicht alle potentiell tumorigenen Zellen abgetötet hat. Ein entsprechendes Wiederauftreten wurde auch nach einer 6-monatigen Kulturphase in Anwesenheit von G418 beobachtet. Eine mögliche Kontrolle tumorigenen Wachstums kann vermutlich durch eine Anwendung von Substanzen, die zu einem Verlust pluripotenter Zelleigenschaften im Sinne einer Prädifferenzierung führen (u.a. Retinsäure [116]), erfolgen. Alternativ werden Negativselektionsverfahren entwickelt, die z.B. durch eine pharmakologische Aktivierung von Suizidgenen zu einer gezielten Abtötung tumorigener Zellen führen könnten. Ob sich ES-Zell-EHTs tatsächlich auch therapeutisch einsetzen lassen, muss in tierexperimentellen Folgeuntersuchungen geklärt werden.

4.6 Alternativen zu ES-Zellen

Die Anwendung von humanen ES-Zellen für experimentelle wie auch therapeutische Zwecke ist in Deutschland vor allem aus ethischen Erwägungen umstritten, da für die Herstellung embryonaler Stammzelllinien Embryonen, in der Regel aus dem Blastozystenstadium, zerstört werden müssen. Kürzlich konnten jedoch Alternativverfahren entwickelt werden, die eine Herstellung von murinen [117] wie auch humanen [118] ES-Zelllinien aus einzelnen Blastomeren unter Erhalt des Embryos ermöglichen sollen. Weitere Alternativen sind sogenannte primordiale Keimzellen (*Embryonic Germline Cells*: EG-Zellen), isoliert aus Vorläuferzellen von Keimzellen aus Embryonen oder frühen Föten [119, 120]. Murine EG-Zellen verhielten sich ähnlich wie ES-Zellen hinsichtlich eines unbegrenzten Proliferationspotentials und der Pluripotenz [121], die Vermehrungs- und Differenzierungsfähigkeit der humanen EG-Zellen scheint jedoch begrenzt zu sein, sodass diese Zellquelle fraglich erscheint. Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von patienteneigenen Zellen ist der Kerntransfer (somatische Kerntransfertechnik; „Therapeutisches Klonen“). Hier kann durch den Transfer eines somatischen Zellkerns in eine entkernte Eizelle der Zellkern der Körperzelle durch bisher ungeklärte Mechanismen reprogrammiert werden. So gewonnene ES-Zellen unterscheiden sich nur durch das mitochondriale Genom von der somatischen Spenderzelle. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass kein Unterschied zwischen den durch Kerntransfer gewonnenen und den durch Befruchtung entstandenen mES-Zellen besteht [122]. Bei der klinischen Anwendung dieser Zellen wären deutlich weniger immunologische Unverträglichkeitsreaktionen zu erwarten. Trotz der Erfolge im Tiermodell ist es bisher nicht gelungen, patienteneigene hES-Zelllinien herzustellen. Neben der Reprogrammierung eines ganzen Kerns ist es aber einer japanischen Arbeitsgruppe kürzlich gelungen, pluripotente Zellen aus Fibroblasten durch Zugabe definierter Faktoren herzustellen [123]. So könnte in Zukunft möglicherweise auf die Verwendung

von Oozyten vollständig verzichtet werden. Ob sich eines dieser Verfahren zur Herstellung von autologen humanen Gewebekonstrukten eignen wird, bleibt abzuwarten. Ebenso ist unklar, ob sich residente Stammzellen in ausreichender Zahl aus dem Herzen erwachsener Individuen [13] bzw. multipotente kardiogene Stammzellen aus anderen Organsystemen, wie z.B. dem Hoden [121], isolieren und für myokardiale Gewebekonstruktionsansätze verwenden lassen.

4.7 Ausblick

Die vorgelegte Arbeit zeigt erstmalig, dass transgene undifferenzierte murine ES-Zellen und aus nativen humanen ES-Zellen vordifferenzierte Zellen zur Herstellung von Kontraktionskraft-generierendem künstlichen Herzgewebe verwendet werden können. Die murine ES-Zell-EHT-Technologie zeigt eine Möglichkeit zur Herstellung von EHTs in einem großen Maßstab auf. Ein entsprechendes Verfahren soll zukünftig auch im humanen Modell erprobt werden. Durch die Entwicklung eines neuen transgenen Dreifach-Indikator-Modells soll zukünftig die Herstellung von ES-Zell-EHTs weiter optimiert und zugleich standardisiert werden. Ob sich ES-Zell-EHTs schließlich als valides humanes *in vitro*-Modell zur pharmakologischen Substanzentwicklung eignen und/oder eine therapeutische Anwendung finden, bleibt zu klären.

5. Zusammenfassung

Hintergrund: Künstliche Herzmuskelgewebe (*Engineered Heart Tissue*; EHT) eignen sich prinzipiell als *in vitro*-Modell zur Testung von herzwirksamen Substanzen, zur Identifikation neuer Therapieziele (Target-Validierung) oder auch zur Gewebeersatztherapie *in vivo*. Bisher wurden EHTs lediglich aus Kardiomyozyten embryonaler Hühnchen, neonataler Ratten und neonataler Mäuse hergestellt. Primäre Herzmuskelzellkulturen sind schlecht standardisierbar und können aus menschlichem Herzgewebe nur schwer etabliert werden. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) können in undifferenzierter Form unbegrenzt vermehrt und prinzipiell in alle Zelltypen, inklusive Herzmuskelzellen, differenziert werden. ES-Zellen sind im Mausmodell gut etabliert. Menschliche ES-Zellen stehen seit Kurzem ebenfalls zur Verfügung und zeigen ein vergleichbares Differenzierungs- und Wachstumspotential. Ziel dieser Arbeit war es daher, zunächst die prinzipielle Anwendbarkeit von murinen ES-Zellen zur Herstellung von EHTs zu überprüfen. Folgeuntersuchungen sollten sich dann auf die Entwicklung eines humanen ES-Zell-Modells fokussieren.

Methoden: Zunächst wurden im Rahmen dieser Dissertationsarbeit murine und humane embryonale Stammzellkulturen im Institut für Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf etabliert. Zur Gewinnung aufgereinigter Herzmuskelzellpopulationen aus murinen ES-Zellen wurde ein bereits etabliertes transgenes Verfahren verwendet. Dafür wurde eine Antibiotikaresistenz (Neomycin) unter Kontrolle eines Herzmuskelzell-spezifischen Promotors stabil in ES-Zellen eingebracht. Zusätzlich wurde ein neues transgenes Modell entwickelt, das neben der Neomycinresistenz ebenfalls Herzmuskelzell-spezifisch ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP) sowie eine kernlokalisierte β -Galaktosidase (nLacZ) exprimiert. Zur Herstellung humaner EHTs wurden transgen GFP-exprimierende ES-Zellen (hES3-ENVY) verwendet. Murine ES-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung oder auch undifferenziert für die EHT-Herstellung eingesetzt. Humane EHTs wurden ausschließlich aus vordifferenzierten Embryoidkörpern hergestellt. Grundsätzlich wurden EHTs aus ES-Zellen (undifferenziert und vordifferenziert), Kollagen Typ I, Matrigel und serumhaltigem Kulturmedium generiert. Nach einer 3-tägigen Kondensierungsphase, gefolgt von einer Konditionierungsphase unter mechanischer Dehnung (murine EHTs: 28 Tage Dehnung, davon 8 Tage ohne und 20 Tage mit G418-Selektion, humane EHTs: 7-21 Tage) wurden isometrische Kontraktionsmessungen, Kontraktionsfrequenzanalysen sowie umfangreiche morphologische Untersuchungen mittels Lichtmikroskopie, konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie und Elektronenmikroskopie durchgeführt. Schließlich wurde im humanen EHT-Modell auch die *in vivo*-Anwendung als Gewebeimplantatmaterial überprüft.

Ergebnisse: Es wurden 17 stabil transformierte murine ES-Zelllinien (herzmuskelspezifisch exprimierte Neomycinresistenz; Identifikation mittels *Southern Blotting*, funktionelle Charakterisierung durch herzmuskelspezifische Antibiotikaselektion) und 8 murine ES-Zelllinien mit stabiler Integration des im Rahmen dieser Arbeit klonierten multicistronischen Indikatorplasmids (Identifikation mittels *Southern Blotting*, funktionelle Charakterisierung durch herzmuskelspezifische Antibiotikaselektion, GFP- und LacZ-Signal) generiert. EHTs aus undifferenzierten selektionierbaren murinen und vordifferenzierten humanen ES-Zellen entwickelten spontane synchrone Kontraktionen, zeigten maximale Kontraktionskräfte von ~0,5 mN sowie einen positiv inotropen Effekt auf Calcium und Isoprenalin. Humane ES-Zell-EHTs zeigten zusätzlich einen positiv lusitropen Effekt von Isoprenalin sowie einen positiv chronotropen Effekt von Isoprenalin und 3-Isobutyl-1-methylxanthin. Eine Kultur der murinen ES-Zell-EHTs über 6 Monate führte zu keiner Einschränkung der Kontraktionskraft. Histologische Untersuchungen zeigten, dass sich die Zellen sowohl innerhalb als auch an der Oberfläche der EHTs verteilen. Kardiomyozyten in EHTs zeigten einen relativ hohen Differenzierungsgrad (charakteristische Querstreifung bei α -Aktinin-Färbung; Z-, I-, A-, H- und M-Banden in elektronenmikroskopischen Untersuchungen). Dabei war das Ausmaß der Differenzierung von der Integration der Herzmuskelzellen in komplexen Muskelbündeln (hoher Differenzierungsgrad) abhängig. Einzelne in EHTs liegende Herzmuskelzellen zeigten dagegen in der Regel ein weniger reifes Entwicklungsmuster. Abschließend wurden humane EHTs in immunsupprimierte Ratten implantiert. Dabei zeigte sich, dass humane ES-Zell-EHTs mindestens 3 Wochen *in vivo* überleben und ihre Muskelstruktur erhalten.

Schlussfolgerung: Aus ES-Zellen der Maus und des Menschen können EHTs generiert werden. Trotz einiger Anzeichen kardialer Unreife zeigen diese wichtige funktionelle und morphologische Eigenschaften von nativem Myokard. ES-Zell-EHTs sind möglicherweise als *in vitro*-Modell und langfristig zum kardialen Gewebeersatz *in vivo* geeignet.

6. Summary

Background: Artificial cardiac tissue (*Engineered Heart Tissue*; EHT) can principally be used both as an *in vitro* model for substance screening, development of new therapies (target validation) and for replacement therapy *in vivo*. EHTs have been generated from cardiomyocytes of embryonic chicken, neonatal rats and mice. Primary heart muscle cell cultures can hardly be standardized and are difficult to establish from human heart. Undifferentiated embryonic stem cells (ES-cells) can be propagated unlimitedly and differentiate in all kind of cell types, including cardiomyocytes. Mouse ES-cells are well established. Recently human ES-cells became available and show a comparable differentiation and proliferation potential. The aim of this study was to evaluate whether mouse ES-cells can be used to generate EHTs and, in a second step, to transfer these experiences to human ES-cells.

Methods: During this dissertation mouse and human ES-cell cultures have been established in the Institute of Pharmacology at the University Hospital Hamburg-Eppendorf. A transgenic strategy was used to yield pure cardiomyocyte populations from mice ES-cells. For this purpose an antibiotic resistance (neomycin) was inserted in ES-cells under the control of a heart muscle-specific promoter. Additionally a new plasmid was constructed, which in addition to the resistance to neomycin, a green-fluorescent protein (GFP) as well as β -galactosidase (nLacZ) with a nuclear localized signal are driven by a heart muscle-specific promoter to visualize differentiating cardiac myocytes. For human EHT generation GFP-expressing ES-cells (hES3-ENVY) were used. Mouse ES-cells were used in various states of differentiation or undifferentiated for the EHT production. Human EHTs were exclusively produced from pre-differentiated embryoid bodies. Basically EHTs were generated from ES-cells or their derivatives, collagen type 1, Matrigel and serum-containing culture medium in circular casting molds. After condensation for three days the EHTs were transferred to a static stretching device and cultured for 28 days (murine EHTs; 8 days without and 20 days with neomycin-analogue G418) or 7-21 days (human EHTs). Force of contraction and spontaneous beating rate were measured under physiological conditions (37 °C, Tyrode's solution) in thermostatted organ baths. Tissue and cell development were determined on fixed specimens by light, confocal laserscanning and electron microscopy. A first series of human EHTs was transplanted on hearts of immune-suppressed rats to evaluate survival, development and potential teratoma formation *in vivo*.

Results: 17 stable transgenic murine ES-cell lines were identified by southern blotting and cardiomyocyte-specific resistance to G418. 8 murine ES-cell lines were established, stably integrating the multicistronic plasmid which was identified by southern blotting. These lines

exhibited a cardiac myocyte-specific antibiotic resistance to G418 as well as a specific GFP- and LacZ-signal. EHTs from undifferentiated selectable mouse and pre-differentiated human ES-cells developed spontaneous synchronous contractions and showed maximum contractile forces of ~0.5 mN as well as a positive inotropic effect on calcium and isoprenaline. Human ES-cell-EHTs also showed a positive lusitropic response to isoprenaline and 3-isobutyl-1-methylxanthin. Cultivation of mouse EHTs for 6 months did not reduce force of contraction. Cells were distributed both at the EHT surface and within the EHTs. Cardiomyocytes in the EHTs showed characteristic cross striation by α -actinin staining and Z-, I-, A-, H- and some of them M-bands in electron microscopy, indicating relatively high differentiation. The degree of differentiation depended on the integration of the cardiomyocytes in complex muscle bundles (high differentiation status) in contrast to single cardiomyocytes. Human EHTs implanted on rat hearts showed GFP and actinin-positive cells with cross striation, indicating 3 weeks survival *in vivo* and maintenance of muscle structures.

Conclusions: EHTs can be generated from murine and human ES-cells. Despite evidence of cardiac immaturity these EHTs show important functional and morphological properties of native myocardium. ES-cell-EHTs might be useful as an *in vitro* model and, in the long-run, for cardiac replacement therapy *in vivo*.

7. Literatur

- [1] Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E (2005) [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 94:488-509.
- [2] Oberpriller JO, Oberpriller JC (1974) Response of the adult newt ventricle to injury. *J Exp Zool* 187:249-53.
- [3] Poss KD, Nechiporuk A, Stringer KF, Lee C, Keating MT (2004) Germ cell aneuploidy in zebrafish with mutations in the mitotic checkpoint gene *mps1*. *Genes Dev* 18:1527-32.
- [4] Pasumarthi KB, Field LJ (2002) Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res* 90:1044-54.
- [5] Dowell JD, Field LJ, Pasumarthi KB (2003) Cell cycle regulation to repair the infarcted myocardium. *Heart Fail Rev* 8:293-303.
- [6] Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD (2005) Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115:572-83.
- [7] Murry CE, Field LJ, Menasche P (2005) Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 112:3174-83.
- [8] Eschenhagen T, Zimmermann WH (2005) Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 97:1220-31.
- [9] Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T (2006) Heart muscle engineering: An update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res* 71:419-429.
- [10] Soonpaa MH, Field LJ (1998) Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83:15-26.
- [11] Anversa P, Kajstura J (1998) Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 83:1-14.
- [12] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M,

- Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114:763-76.
- [13] Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433:647-53.
- [14] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12313-8.
- [15] Field LJ (1988) Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science* 239:1029-33.
- [16] Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, Soonpaa MH, Field LJ (2005) Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 96:110-8.
- [17] Claycomb WC, Lanson NA, Jr., Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ, Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2979-84.
- [18] Chaudhry HW, Dashoush NH, Tang H, Zhang L, Wang X, Wu EX, Wolgemuth DJ (2004) Cyclin A2 mediates cardiomyocyte mitosis in the postmitotic myocardium. *J Biol Chem* 279:35858-66.
- [19] Liao HS, Kang PM, Nagashima H, Yamasaki N, Usheva A, Ding B, Lorell BH, Izumo S (2001) Cardiac-specific overexpression of cyclin-dependent kinase 2 increases smaller mononuclear cardiomyocytes. *Circ Res* 88:443-50.
- [20] Tamamori-Adachi M, Ito H, Sumrejkanchanakij P, Adachi S, Hiroe M, Shimizu M, Kawauchi J, Sunamori M, Marumo F, Kitajima S, Ikeda MA (2003) Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation. *Circ Res* 92:e12-9.
- [21] Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD (2001) Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy,

- and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10308-13.
- [22] Xiao G, Mao S, Baumgarten G, Serrano J, Jordan MC, Roos KP, Fishbein MC, MacLellan WR (2001) Inducible activation of c-Myc in adult myocardium in vivo provokes cardiac myocyte hypertrophy and reactivation of DNA synthesis. *Circ Res* 89:1122-9.
- [23] Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT (2005) p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19:1175-87.
- [24] Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A, Carpentier A (2005) Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 13:287-96.
- [25] Ott HC, Davis BH, Taylor DA (2005) Cell therapy for heart failure--muscle, bone marrow, blood, and cardiac-derived stem cells. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 17:348-60.
- [26] Pallante BA, Edelberg JM (2006) Cell sources for cardiac regeneration--which cells and why. *Am Heart Hosp J* 4:95-7.
- [27] Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, Rappaport L, Schwartz K, Menasche P (2000) Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:1169-75.
- [28] Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ (1993) Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 92:1548-54.
- [29] Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279-80.
- [30] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickle DA (1999) Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 31:513-22.
- [31] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-5.

- [32] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361:45-6.
- [33] Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 106:1913-8.
- [34] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10344-9.
- [35] Jia ZQ, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Merante F, Rao V, Li G, Li RK (1997) Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. *Transplant Proc* 29:2093-4.
- [36] Hagege AA, Carrion C, Menasche P, Vilquin JT, Duboc D, Marolleau JP, Desnos M, Bruneval P (2003) Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 361:491-2.
- [37] Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D (2003) Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41:1078-83.
- [38] Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, Kurpisz M (2004) Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 148:531-7.
- [39] Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D, Bountiukos M, Onderwater EE, Lee CH, Maat AP, Serruys PW (2003) Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 42:2063-9.
- [40] Gnecci M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE,

- Ingwall JS, Dzau VJ (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med* 11:367-8.
- [41] Hagege AA, Vilquin JT, Bruneval P, Menasche P (2001) Regeneration of the myocardium: a new role in the treatment of ischemic heart disease? *Hypertension* 38:1413-5.
- [42] Menasche P (2005) Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis* 16:105-10.
- [43] Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S (2003) Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7808-11.
- [44] Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT, Alheritiere A, Peyrard S, Duboc D, Abergel E, Messas E, Mousseaux E, Schwartz K, Desnos M, Menasche P (2006) Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 114:1108-13.
- [45] Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 106:3009-17.
- [46] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K (2005) Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 39:150-8.
- [47] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355:1210-21.
- [48] Wollert KC, Drexler H (2005) Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 96:151-63.
- [49] Muller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, Laird PW, Kedes L (2002) Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult

- myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 34:107-16.
- [50] Leor J, Aboulaflia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, Granot Y, Cohen S (2000) Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation* 102:III56-61.
- [51] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Choi A, Yau TM (1999) Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 100:II63-9.
- [52] Zimmermann WH, Didie 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:I151-7.
- [53] Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12:452-8.
- [54] Bursac N, Papadaki M, Cohen RJ, Schoen FJ, Eisenberg SR, Carrier R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (1999) Cardiac muscle tissue engineering: toward an in vitro model for electrophysiological studies. *Am J Physiol* 277:H433-44.
- [55] Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (1999) Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64:580-9.
- [56] Kofidis T, Akhyari P, Boublik J, Theodorou P, Martin U, Ruhparwar A, Fischer S, Eschenhagen T, Kubis HP, Kraft T, Leyh R, Haverich A (2002) In vitro engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg* 124:63-9.
- [57] Li RK, Yau TM, Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A, Jia ZQ (2000) Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:368-75.
- [58] Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb J* 11:683-94.

- [59] Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68:106-14.
- [60] Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90:223-30.
- [61] Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M, Okano T (2002) Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90:e40.
- [62] Akins RE, Boyce RA, Madonna ML, Schroedl NA, Gonda SR, McLaughlin TA, Hartzell CR (1999) Cardiac organogenesis in vitro: reestablishment of three-dimensional tissue architecture by dissociated neonatal rat ventricular cells. *Tissue Eng* 5:103-18.
- [63] Zimmermann WH, Eschenhagen T (2003) Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart Fail Rev* 8:259-69.
- [64] Zimmermann WH, Melnychenko I, Eschenhagen T (2004) Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 25:1639-47.
- [65] Etzion S, Kedes LH, Kloner RA, Leor J (2001) Myocardial regeneration: present and future trends. *Am J Cardiovasc Drugs* 1:233-44.
- [66] Shimizu T, Sekine H, Yang J, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Kobayashi E, Okano T (2006) Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *Faseb J* 20:708-10.
- [67] Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, Shimizu T, Kira S, Hayakawa K, Nishiyama N, Tanimoto K, Hagiwara Y, Satoh T, Fukuda K, Okano T, Ogawa S (2006) Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, in vivo. *Circ Res* 98:705-12.
- [68] Armbrüster I (2007) Entwicklung von einem murinen künstlichen Herzmuskelmodell. *Med. Dissertation. Universität Hamburg.*

- [69] Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288:1660-3.
- [70] Malouf NN, Coleman WB, Grisham JW, Lininger RA, Madden VJ, Sproul M, Anderson PA (2001) Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol* 158:1929-35.
- [71] Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, De Maria R, Boratto R, Jaffredo T, Broccoli V, Bianco P, Cossu G (2002) The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development* 129:2773-83.
- [72] Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M (2001) Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2:172-80.
- [73] Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Schwartz RJ, Entman ML, Schneider MD (2004) Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1015:182-9.
- [74] Fukuda K (2003) Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Hum Cell* 16:83-94.
- [75] Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6.
- [76] Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ (1983) Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 73:249-61.
- [77] Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45.
- [78] He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003) Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93:32-9.

- [79] Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108:407-14.
- [80] Wobus AM, Boheler KR (2005) Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85:635-78.
- [81] 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* 48:173-82.
- [82] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7.
- [83] Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R, Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-40.
- [84] Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91:501-8.
- [85] Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 98:216-24.
- [86] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
- [87] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688-90.
- [88] Ramirez-Solis R, Rivera-Perez J, Wallace JD, Wims M, Zheng H, Bradley A (1992) Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal Biochem*

- 201:331-5.
- [89] Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2:185-90.
- [90] Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8424-8.
- [91] Costa M, Dottori M, Ng E, Hawes SM, Sourris K, Jamshidi P, Pera MF, Elefanty AG, Stanley EG (2005) The hESC line Envy expresses high levels of GFP in all differentiated progeny. *Nat Methods* 2:259-60.
- [92] Fink C, Ergun S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Faseb J* 14:669-79.
- [93] 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 U S A* 101:18129-34.
- [94] El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T (2003) Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *Faseb J* 17:437-9.
- [95] Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227:271-8.
- [96] Thomson JA, Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 38:133-65.
- [97] Kolosov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK (2006) Engraftment of

- engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 203:2315-27.
- [98] Huber I, Itzhaki I, Caspi O, Arbel G, Tzukerman M, Gepstein A, Habib M, Yankelson L, Kehat I, Gepstein L (2007) Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *Faseb J*.
- [99] Guo XM, Zhao YS, Chang HX, Wang CY, E LL, Zhang XA, Duan CM, Dong LZ, Jiang H, Li J, Song Y, Yang XJ (2006) Creation of engineered cardiac tissue in vitro from mouse embryonic stem cells. *Circulation* 113:2229-37.
- [100] Xu C, Police S, Hassanipour M, Gold JD (2006) Cardiac bodies: a novel culture method for enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 15:631-9.
- [101] Soonpaa MH, Field LJ (1997) Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *Am J Physiol* 272:H220-6.
- [102] Bauwens C, Yin T, Dang S, Peerani R, Zandstra PW (2005) Development of a perfusion fed bioreactor for embryonic stem cell-derived cardiomyocyte generation: oxygen-mediated enhancement of cardiomyocyte output. *Biotechnol Bioeng* 90:452-61.
- [103] Kattman SJ, Huber TL, Keller GM (2006) Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 11:723-32.
- [104] Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, Field LJ, Lehmann J, Zweigerdt R (2005) Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng* 92:920-33.
- [105] Vornanen M (1996) Excitation-contraction coupling of the developing rat heart. *Mol Cell Biochem* 163-164:5-11.
- [106] Hasenfuss G, Mulieri LA, Blanchard EM, Holubarsch C, Leavitt BJ, Ittleman F, Alpert NR (1991) Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium. Comparison with animal species. *Circ Res* 68:836-46.

- [107] Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114:172-8.
- [108] Antin PB, Taylor RG, Yatskievych T (1994) Precardiac mesoderm is specified during gastrulation in quail. *Dev Dyn* 200:144-54.
- [109] Eghbali M (1992) Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 2:183-9.
- [110] Lough J, Sugi Y (2000) Endoderm and heart development. *Dev Dyn* 217:327-42.
- [111] Tucker KL, Wang Y, Dausman J, Jaenisch R (1997) A transgenic mouse strain expressing four drug-selectable marker genes. *Nucleic Acids Res* 25:3745-6.
- [112] Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N (2002) Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9864-9.
- [113] Fandrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B (2002) Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 8:171-8.
- [114] Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS (2005) Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* 33:1526-30.
- [115] Damjanov I (1993) Teratocarcinoma: neoplastic lessons about normal embryogenesis. *Int J Dev Biol* 37:39-46.
- [116] Rohwedel J, Guan K, Wobus AM (1999) Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165:190-202.
- [117] Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, Meisner L, Lanza R (2006) Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439:216-9.

-
- [118] Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R (2006) Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444:481-5.
- [119] Shambloott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, Cheng L, Gearhart JD (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:113-8.
- [120] Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13726-31.
- [121] Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440:1199-203.
- [122] Brambrink T, Hochedlinger K, Bell G, Jaenisch R (2006) ES cells derived from cloned and fertilized blastocysts are transcriptionally and functionally indistinguishable. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:933-8.
- [123] Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.

8. Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	Aqua bidestilata
BSA	bovines Serumalbumin
° C	Grad Celsius
CEE	<i>chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
EB	<i>Embryoid body</i> ; Embryoidkörper
EC ₅₀	Konzentration bei halbmaximaler Wirkung
ED	<i>embryonic day</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i>
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
hES-Zellen	humane embryonale Stammzellen
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
Hz	Hertz (1 Hz=60/min)
HygroR	Hygromycinresistenz
Iso	Isoprenalin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
Lmax	EHT-Dehnung bei maximaler Kontraktionskraft
Lo	EHT ohne Vordehnung
M	Mol/Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol/l	Mikromol/l
µm	Mikrometer
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> (murine embryonale Fibroblasten)
mES-Zellen	murine embryonale Stammzellen

mg	Milligramm
α MHC	<i>αMyosin Heavy Chain</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/l	Millimol/l
mN	Millinewton (1 mN=100 g cm/s ² =100 Dyn)
ms	Millisekunden
N	mol/l H ₂ O
n	Anzahl
NeoR	Neomycinresistenz
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
P/S	Penicillin/Streptomycin
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunden
SEM	Standardfehler
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TT	<i>twitch tension</i> ; Kontraktionskraft
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

9. Lebenslauf

Name: Christina Rogge

Geboren am: 02.01.1979

Geburtsort: Bad Pyrmont

Eltern: Hubert Rogge
Astrid Rogge

Schule: Grundschule Bad Pyrmont-Hagen 1985-89
Städtisches Gymnasium Barntrop 1989-98

Studium: Pharmazie an der TU Braunschweig 1998-2002

1. Staatsexamen 08/2000

2. Staatsexamen 11/2002

3. Staatsexamen 12/2003

Dissertation am Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung für Pharmakologie
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf seit Jan.
2004

Aufbaustudium Molekularbiologie am Zentrum für Molekulare
Neurobiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf 10/2004-
11/2006

10. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

1. Originalarbeiten

Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, **Rogge C**, Tiburcy M, Eschenhagen T. (2006) Heart muscle engineering: An update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res.* 2006 Aug 1;71(3):419-29

Rogge C, Kehat I, Didié M, Biermann D, Graichen R, Xu XQ, Colman A, Davidson B, Zweigerdt R, Wettwer E, Ravens U, Simon R, Sauter G, Hilpert A, Neuhuber WL, Gepstein A, Gepstein L, Eschenhagen T, Zimmermann W-H (2007) Engineering of Force Generating Human Heart Tissue for Substance Screening and Cardiac Repair Applications. *Nat. Biotechnol.* submitted

2. Vorträge und Poster mit publiziertem *Abstract*:

Zimmermann W.-H, Boy O, **Rogge C**, Kehat I, Gepstein L, Eschenhagen T (2005) Three-Dimensional Culture induces Differentiation of Neonatal Rat and Human Embryonic Cardiomyocytes (46. Jahrestagung der DGPT Mainz)

Rogge C, Didié M, Naito H, Hermans-Borgmeyer I, Wobus AM, Field LJ, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2005) Generation of Engineered Heart Tissue from Embryonic Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *Circulation* 112:II-17

Rogge C, Didié M, Hermans-Borgmeyer I, Wobus A, Field LJ, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2006) Herstellung von künstlichem Herzgewebe aus embryonalen Stammzellen (72. Jahrestagung DGK Mannheim)

Zimmermann W.-H, Melnychenko I, Didié M, Naito H, **Rogge C**, Eschenhagen T (2006) Application of Cardiac Tissue Engineering in Cardiac Regeneration (Lebao Hannover)

Rogge C, Didié M, Field LJ, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2006) Herstellung von künstlichen Herzgeweben aus embryonalen Stammzellen. *Clin Res Cardiol* 95: Suppl 5, P1235

Rogge C, Behr H, Didié M, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2007) Construction and Characterisation of Engineered Heart Tissue from Murine Embryonic Stem Cells (Dutch-German Joint Meeting Würzburg)

Rogge C, Behr H, Didié M, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2007) Generation of Engineered Heart Tissue from Murine Embryonic Stem Cells (48. Jahrestagung der DGPT Mainz)

Zimmermann W-H, Didié M, **Rogge C**, Eschenhagen T (2007) Tissue Engineered for Myocardial Repair (LDDR Genf)

Zimmermann W-H, Christalla P, Didié M, Döker S, Melnychenko I, Naito H, **Rogge C**, Tiburcy M, Eschenhagen T (2007) Cardiac Repair with Tissue Engineered Myokardium (RTERMIS Toronto)

Zimmermann W-H, Christalla P, Didié M, Döker S, Melnychenko I, Naito H, **Rogge C**, Tiburcy M, Eschenhagen T (2007) Cardiac Repair with Tissue Engineered Myokardium (SPCE TC meeting Coimbra)

3. Auszeichnung:

2005 Preis der 2. Hamburger Studententagung zur Medizin- und Biotechnologie 2005.
Titel des Vortrags: „Herstellung von künstlichem Herzgewebe aus embryonalen Stammzellen

4. Studienaufenthalte:

11-12/2005 Cardiovascular Research Group, Technion, Haifa, Israel (Leiter: Prof. L. Gepstein)

11. Erklärung

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

Entwicklung und Charakterisierung eines neuen *in vitro*-Herzmuskelmodells aus embryonalen Stammzellen

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen und der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth für den Fachbereich Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, den

.....

Christina Rogge

12. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion wie auch von wissenschaftlichen Beiträgen.

Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth danke ich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für den Fachbereich Chemie.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann für das Überlassen meines Promotionsthemas und für die Betreuung meiner Arbeit.

Frau PD Dr. rer. nat. Irm Hermans-Borgmeyer und Frau Prof. Dr. rer. nat. Anna Wobus danke ich für die freundliche und kompetente Unterstützung bei der murinen Stammzellkultur.

Frau Dr. rer. nat. Amira Gepstein und Herrn Dr. med. Itzak Kehat danke ich für die Möglichkeit, die humane Stammzellkultur zu erlernen.

Frau Andrea Hilpert, Frau Inge Zimmermann und Herrn Prof. Dr. med. Winfried Neuhuber danke ich für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie. Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon danke ich für die Immunhistochemie der humanen ES-Zell-EHTs.

Herrn Dr. rer. nat. Robert Zweigerdt und der Firma ES Cell International danke ich für die Bereitstellung der vordifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die kollegiale Zusammenarbeit. Besonders danke ich Stephan Döker, Hanna Behr, Dr. Olaf Friese, Dr. Michael Didié, Daniel Biermann, Peter Christalla, Niklas Schofer, Monika Nose und Kaveh Mahmoudi für ihre freundschaftliche und fachliche Unterstützung.

Mein aufrichtigster Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben, indem sie mir jederzeit emotional und finanziell zur Seite standen.

13. Anhang**Tabellen:****Kapitel 3.1.2 Einfluss von MEF und LIF auf die mES-Zell-Differenzierung (Abb. 12)**Zellzahlbestimmung

Kulturbedingungen:	+MEF; -LIF	-MEF; -LIF
Mittelwert (x10 ⁶)	0,65	0,19
SEM	0,04	0,01
n	6	6

Kulturbedingungen:	+ESGRO [®] LIF; +MEF					
LIF-Konzentration [ng/ml]	0,1	0,3	1	3	10	30
Mittelwert (x10 ⁶)	0,86	1,92	4,00	4,40	9,76	9,82
SEM	0,02	0,04	0,05	0,15	0,25	0,26
n	3	3	3	3	3	3

Kulturbedingungen:	+hergestelltes LIF; +MEF					
LIF-Konzentration [ng/ml]	0,1	0,3	1	3	10	30
Mittelwert (x10 ⁶)	0,89	1,61	4,27	4,03	8,89	8,28
SEM	0,03	0,17	0,27	0,03	0,49	0,63
n	3	3	3	3	3	3

Kulturbedingungen:	+hergestelltes LIF; -MEF					
LIF-Konzentration [ng/ml]	0,1	0,3	1	3	10	30
Mittelwert (x10 ⁶)	0,19	0,30	2,55	3,41	5,67	5,13
SEM	0,06	0,01	0,06	0,29	0,15	0,03
n	3	3	3	3	3	3

Kapitel 3.1.4 Auswahl einer optimalen mES-Zelllinie (Abb. 14)Kontraktile EBs verschiedener Zelllinien im Zeitverlauf

	Kontrahierende EBs (%)				
	8	9	10	11	12
Kulturtag	8	9	10	11	12
Mittelwert A6	14,4	42,7	43,8	55,1	65,2
SEM	2,4	7,6	6,6	5,1	5,8
n	3	3	3	3	3
Mittelwert A8	0	2,5	5,0	10,6	17,9
SEM	0	1,3	2,6	2,4	4,1
n	3	3	3	3	3
Mittelwert A9	5,8	12,7	14,3	21,4	26,9
SEM	3,0	4,7	5,2	6,9	5,3
n	3	3	3	3	3

3.2.4 Etablierung optimaler Selektionsbedingungen (Abb. 16B)Kontraktionskraftmessung bei 2,4 mM Calcium

Kulturbedingungen:									
Eingesetzte Zellzahl (x10 ⁶)	1	1,5	2	1	1,5	2	1	1,5	2
Selektionsbeginn (Kulturtag)	9	9	9	11	11	11	13	13	13
Mittelwert (mN)	0	0,17	0,15	0,18	0,17	0,12	0,11	0,09	0,09
SEM	0	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,02	0,02	0,02
n	0	7	6	7	7	3	4	6	7

3.2.5 Vergleich der kontraktiven Funktion von EHTs aus unterschiedlichen mES-Zelllinien (Abb. 18)

Kontraktionskraftmessung bei 2,4 mM Calcium

Zelllinie	A6	A8	A9
Mittelwert (mN)	0,18	0,15	0,13
SEM	0,04	0,04	0,04
n	5	5	5

3.2.6 Langzeitkulturen von mES-Zell-EHTs (Abb. 19)

Kontraktionskraftmessung bei 2,4 mM Calcium

Kulturtag	31	38	188
Mittelwert (mN)	0,13	0,14	0,17
SEM	0,07	0,04	0,05
n	3	4	3

3.3.1.1 Isometrische Kontraktionsexperimente mit mES-Zell-EHTs (Abb. 21)

Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Calcium

Calciumkonzentration (mM)	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Mittelwert (mN)	0,06	0,14	0,19	0,22	0,24
SEM	0,02	0,05	0,06	0,07	0,08
n	8	8	8	8	8

Effekt von Isoprenalin bei 0,4 mM Calcium

Isoprenalin (μM)	-	1
Mittelwert (mN)	0,06	0,09
SEM	0,01	0,01
n	14	14

3.4 RNA/DNA-Analyse von mES-Zell-EHTs (Abb. 24)DNA-Gehalt pro EHT unter verschiedenen Kulturbedingungen

Kulturbedingung	Z	RM	T3	T11	K	T31
Mittelwert	14,1	13,9	17,3	25,9	14,8	13,2
SEM	0,02	0,05	0,22	0,42	0,03	0,08
n	7	7	7	7	7	7

RNA-Gehalt pro EHT unter verschiedenen Kulturbedingungen

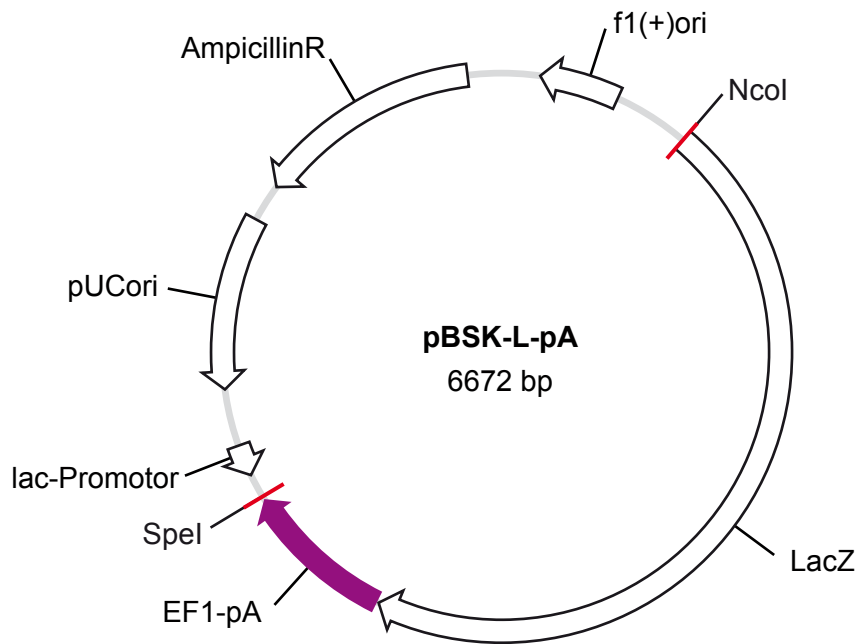
Kulturbedingung	Z	RM	T3	T11	K	T31
Mittelwert	5,7	5,9	22,9	31,9	8,7	5,9
SEM	0,08	0,38	0,29	2,30	0,42	0,43
n	7	7	7	7	7	7

RNA/DNA-Quotient pro EHT unter verschiedenen Kulturbedingungen

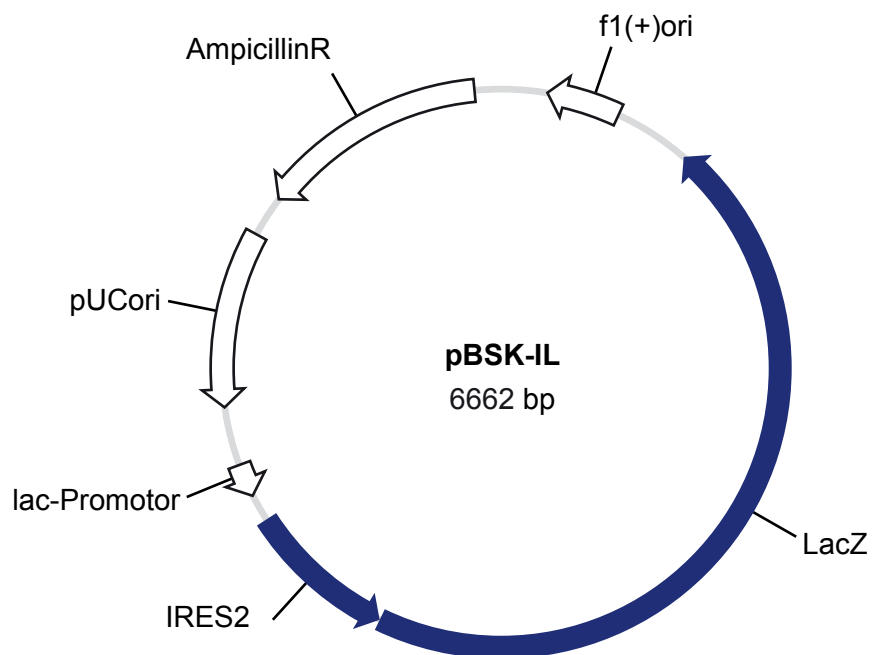
Kulturbedingung	Z	RM	T3	T11	K	T31
Mittelwert	0,4	0,4	1,3	1,3	0,6	0,4
SEM	0,01	0,07	0,06	0,2	0,07	0,08
n	7	7	7	7	7	7

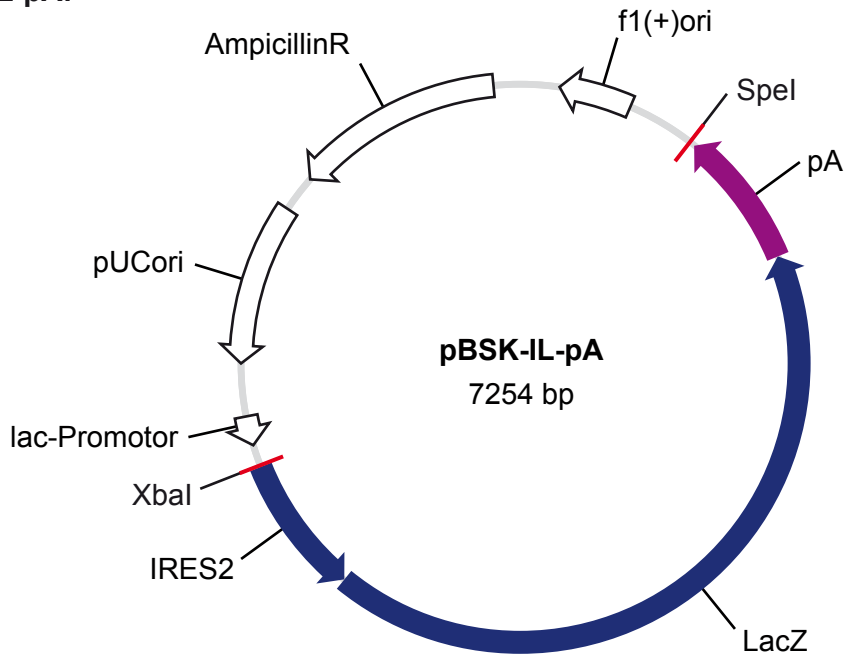
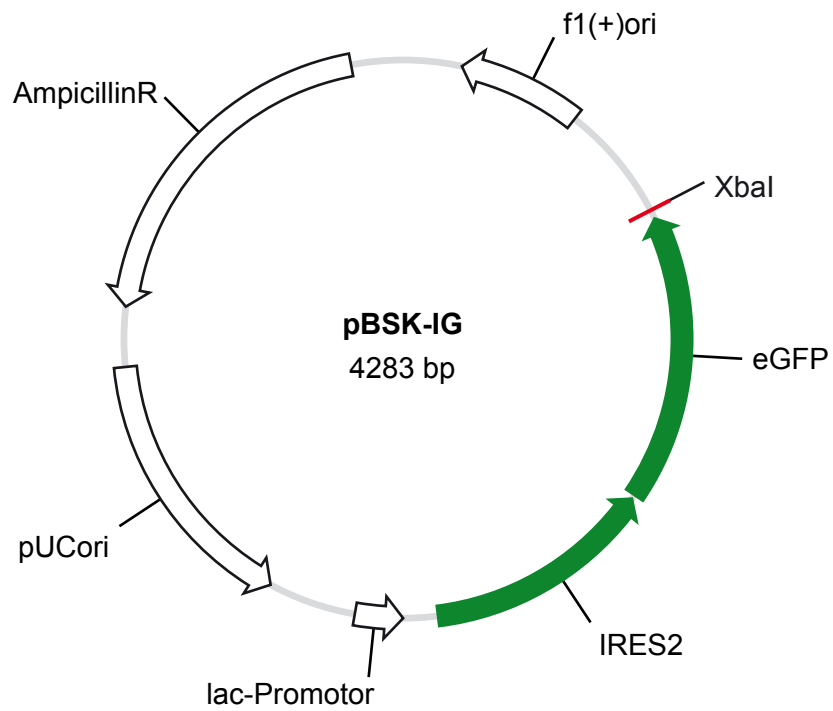
3.5.1 Klonierung eines Multi-Indikator-Expressionskonstruktes

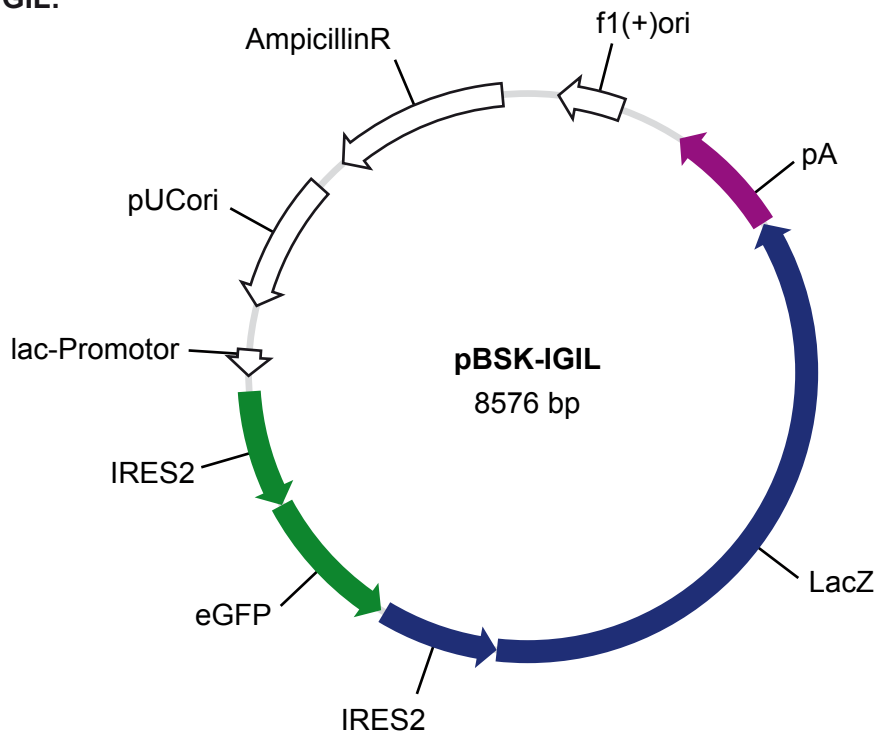
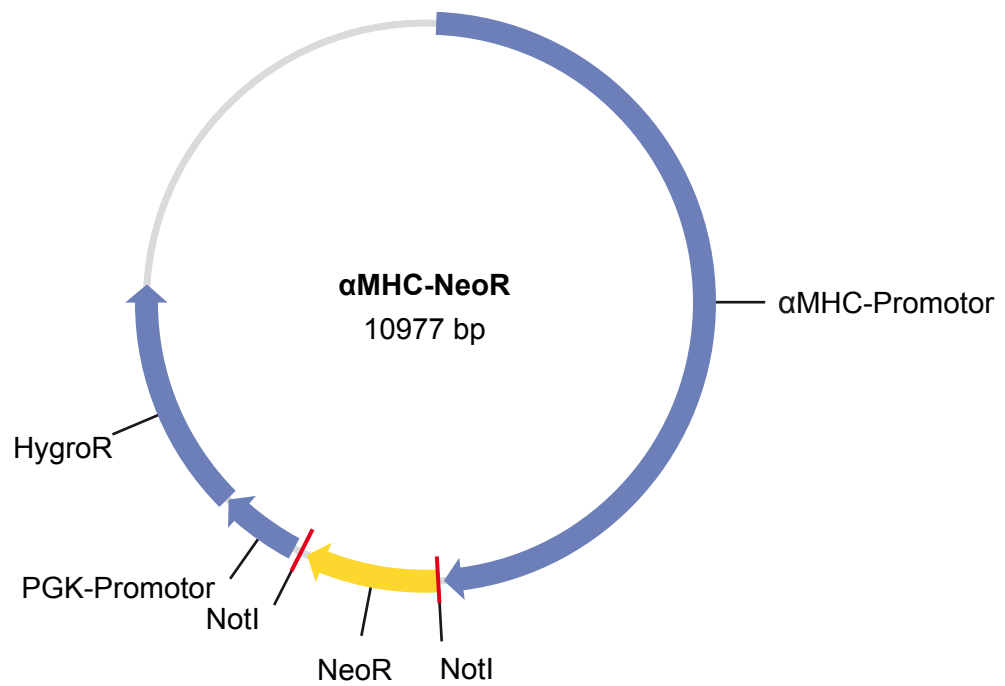
pBSK-L-pA:

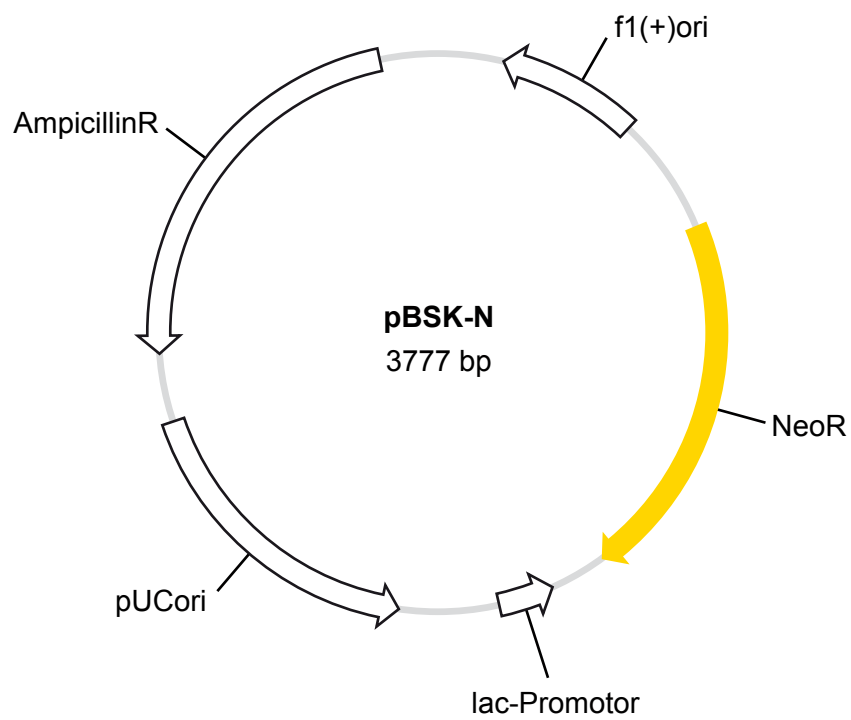
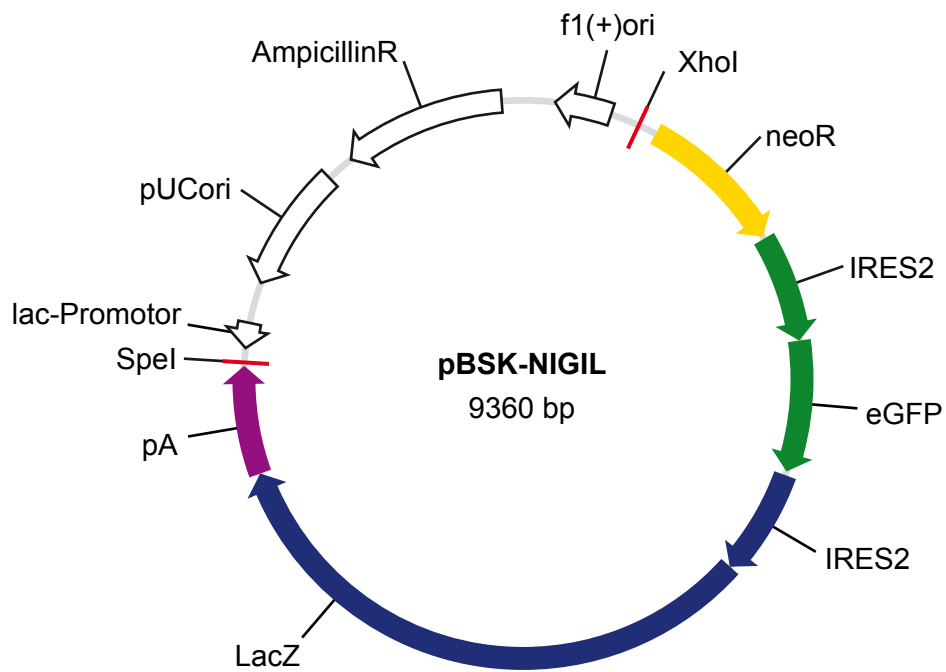


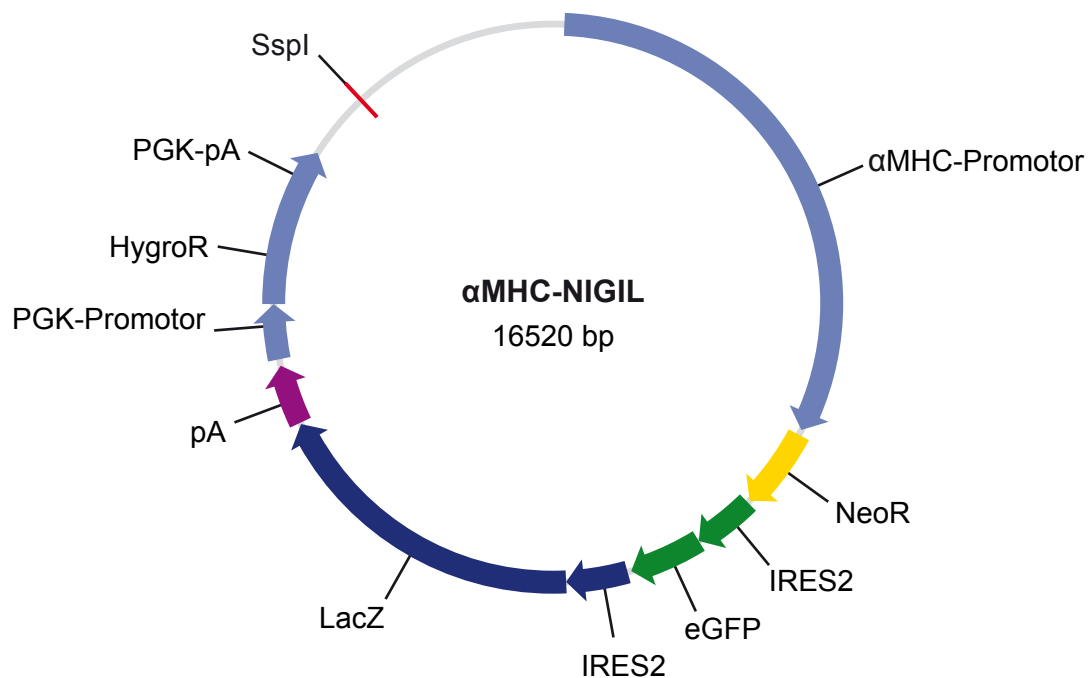
pBSK-IL:



pBSK-IL-pA:**pBSK-IG:**

pBSK-IGIL: **α MHC-NeoR:**

pBSK-N:**pBSK-NIGIL:**

α MHC-NIGIL:**3.7.1 Isometrische Kontraktionsexperimente mit hES-Zell-EHTs (Abb. 29)**Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Calcium

Calciumkonzentration (mM)	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8
Mittelwert (mN)	0,06	0,08	0,13	0,17	0,19	0,19	0,20	0,20
SEM	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
n	5	5	5	5	5	5	5	5

Effekt von Isoprenalin bei 0,4 mM Calcium

Isoprenalin (μ M)	-	1
Mittelwert (mN)	0,055	0,083
SEM	0,01	0,004
n	4	4

3.7.2 Frequenzmessung an hES-Zell-EHTs (Abb. 30)

Messbedingung	Tyrode	Isoprenalin (1 μ M)	IBMX (100 μ M)
Mittelwert (Hz)	0,7	1,3	1,8
SEM	0,09	0,1	0,06
n	3	3	3