

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

Über Vaskularisierungsversuche von künstlichem Herzgewebe im Modell des bebrüteten Hühnereis

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von Marlene Kristin Bönstrup

Hamburg , 2009

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
10.01.2011**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:
Prof. Dr. med. Michael Amling

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:
PD Dr. Dr. med. Jörg-Matthias Pollok

1 Einleitung

1.1	<i>Tissue engineering</i>	1
1.1.1	Kardiales <i>tissue engineering</i>	1
1.1.2	Angiogenese und <i>tissue engineering</i>	8
1.2	EHT Vaskularisierung im nativen und implantierten Zustand	13
1.3	Chorioallantoismembran-Assay	
1.3.1	Chorioallantoismembran-Assay als Instrument der Angiogeneseforschung	16
1.3.2	Physiologie und Aufbau der Chorioallantoismembran	18
1.3.3	Gefäßwachstum in der Chorioallantoismembran	21
1.4	Thymosin β_4	24
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit	26

2 Material und Methoden

2.1	Tierhaltung	28
2.2	Zellpräparation	
2.2.1	Organentnahme	28
2.2.2	Enzymatischer Gewebeaufschluss	28
2.3	Herstellung und Optimierung von rekonstituiertem Herzgewebe (<i>Engineered Heart Tissue</i> ; EHT) der neonatalen Ratte	
2.3.1	Herstellung und Gehaltsbestimmung von Kollagen Typ I	30
2.3.2	Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	31
2.3.3	Herstellung der Gussformen	32
2.3.4	Herstellung von EHTs	
2.3.4.1	EHTs mit Kollagen-Hydrogelmatrix	35
2.3.4.2	EHTs mit Fibrin-Hydrogelmatrix	34
2.3.5	Kultivierung von EHTs	32
2.3.6	Mediumsupplementierung mit Thymosin β_4	36
2.3.7	Qualitätsprüfung mittels isometrischer Kontraktionskraft-Messungen	36
2.4	Chorioallantoismembran-Assay	
2.4.1	Präparation der Chorioallantoismembran	37
2.4.2	Inkubationsbedingungen und Videoüberwachung	39

2.4.3	EHT-Kultivierung auf der Chorioallantoismembran	41
2.4.3.1	Implantation des EHTs	41
2.4.3.2	Aufbau des Ringstretchers	41
2.4.3.3	Explantation des EHTs	42
2.4.4	Positivkontrolle der Induzierbarkeit von Gefäßwachstum auf der Chorioallantoismembran	42
2.5	Histologische Strukturanalysen	
2.5.1	Lichtmikroskopie	
2.5.1.1	Paraffineinbettung	43
2.5.1.2	Färbemethoden	44
2.5.2	Konfokale Lasermikroskopie	
2.5.2.1	Technik	46
2.5.2.2	Färbeprotokoll	47
2.6	Molekularbiologische Untersuchungen	49
2.6.1	RNA Isolation	49
2.6.2	RT-PCR (Reverse Transkription)	50
2.6.3	Primerdesign	52
2.6.4	Quantitative PCR (qPCR)	53
2.7	Sequenzvergleich von Wachstumsfaktoren unterschiedlicher Spezies	55
3	Ergebnisse	
3.1	Charakterisierung von nativen Kollagen-EHTs, Fibrin-EHTs und Thymosin β_4 -supplementierte Fibrin-EHTs	
3.1.1	Vergleich der Kontraktionskraft zwischen den EHT-Gruppen	56
3.1.2	Morphologische Charakterisierung	57
3.1.2.1	Lichtmikroskopie	58
3.1.2.2	Konfokale Lasermikroskopie	62
3.2	Strukturanalyse der Chorioallantoismembran	66
3.2.1	Lichtmikroskopie	66
3.2.2	Konfokale Lasermikroskopie	67
3.3	Positivkontrolle der Induzierbarkeit des Chorioallantoismembran Gefäßwachstums	
3.3.1	Fotoserie	69
3.3.2	Lichtmikroskopie	70
3.3.3	Konfokale Lasermikroskopie	70

3.4	EHT-Kultivierung auf der Chorioallantoismembran	71
3.4.1	Versuche zur Optimierung des EHT-Strukturerhalts	72
3.4.1.1	Mechanische Dehnung der EHTs	73
3.4.1.2	Bedeckung des EHTs mit verschiedenen Materialien	73
3.5	Morphologie der EHTs nach vier Tagen Inkubation auf der Chorioallantoismembran	
3.5.1	Fotoserie	76
3.5.2	Lichtmikroskopie	79
3.5.2.1	Kollagen-EHTs	79
3.5.2.2	Fibrin-EHTs	84
3.5.3	Konfokale Lasermikroskopie	
3.5.3.1	Kollagen-EHTs	88
3.5.3.2	Fibrin-EHTs	92
3.6	Veränderungen der Genexpression in EHTs	94
3.7	Sequenzvergleich von Wachstumsfaktoren unterschiedlicher Spezies	99
4	Diskussion	101
4.1	Kardiales <i>tissue engineering</i> mit verschiedenen Hydrogelmatrices	101
4.2	EHT-Vaskularisierungsversuche mittels des CAM-Assays	109
4.3	Der Einfluss von Thymosin β_4 auf Fibrin-EHTs	115
4.4	Chorioallantoismembran-Assay als Angiogenesemodell	119
4.5	Ausblick	121
5	Zusammenfassung	123
6	Abkürzungsverzeichnis	125
7	Literaturverzeichnis	126
8	Anhang	
8.1	Substanzen	132
8.2	Lösungen und Puffer	136
8.3	Hilfsmittel und Geräte	138
9	Danksagung	142
10	Lebenslauf	143
11	Eidstattliche Versicherung	143

1 Einleitung

1.1 *Tissue engineering*

Tissue engineering ist ein interdisziplinärer Forschungsbereich zwischen Ingenieurs- und Lebenswissenschaften, der sich mit der Konstruktion und Entwicklung von biologischen Ersatzgeweben beschäftigt, die einerseits Gewebefunktion wiederherstellen, erhalten oder verbessern sollen und andererseits als verbesserte *in vitro* Testsysteme zu nutzen sind.

1.1.1 *Kardiales tissue engineering*

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems gehören in westlichen Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen. In der Bundesrepublik verstarben im Jahr 2007 358.684 Personen an Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, das entspricht 43,36% aller Todesfälle (Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes von 2007, Tabelle 1). Dabei war bei 13,93% der Todesfälle Herzinsuffizienz die amtlich vermerkte Todesursache. Jedoch gehen noch weitere Herzkreislauferkrankungen mit einem Verlust von kontraktile Funktion einher, ohne dass diese als Herzinsuffizienz in die Statistik eingehen (z.B. Hypertensive Herzerkrankungen, chronisch ischämische Herzerkrankungen). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz nimmt mit dem Alter zu, so dass 13,8% aller über 65-Jährigen an Herzinsuffizienz leiden (Robert-Koch Institut, 13.08.2009).

Tabelle 1: Todesursachen in der Bundesrepublik im Jahre 2007.

Todesursachen 2007	Absolute Zahl	% aller Todesursachen
Krankheiten des Kreislaufsystems	358.684	43,36%
Bösartige Neubildungen	217.289	26,27%
Krankheiten des Atemsystems	57.956	7,01%
Folgen äußerer Ursachen, Verletzungen, Vergiftungen	30.650	3,71%
Krankheiten des Verdauungssystems	42.163	5,10%

modifiziert nach der Statistik des Statistischen Bundesamtes vom 10.09.2008

Herzinsuffizienz ist ein Syndrom, welches als gemeinsame Endstrecke verschiedener belastender Einflüsse auf das Herz verstanden werden kann, wie beispielsweise Ischämie (Myokardinfarkt, koronare Herzkrankheit, Aneurysmen), arterielle

Hypertonie, Herzklappenfehler oder Kardiomyopathien (infektiös, metabolisch, endokrin, hereditär). Durch Fortschritte bei der Therapie von Myokardinfarkt und arterieller Hypertonie konnte zwar ein längeres und symptomärmeres Überleben der Patienten erreicht werden, jedoch bedingt dieses oft eine Chronifizierung der Erkrankungen mit dem vermehrten Auftreten einer Herzinsuffizienz als Folge der Grunderkrankung. Das gemeinsame Merkmal ist ein Verlust an Kontraktilität des Herzmuskels, der dazu führt, dass die Auswurfleistung des Herzens den Sauerstoffbedarf der Peripherie in Ruhe oder unter Belastung nicht decken kann. Die Diagnose wird klinisch anhand der Symptome nächtliche Atemnot, erhöhter Venendruck und Halsvenenstauung, feuchte Rasselgeräusche, Herzvergrößerung und dritter Herzton, Knöchelödeme, Lebervergrößerung, nächtlicher Husten, Pleuraerguss, erniedrigte Vitalkapazität und Tachykardie gestellt. Dabei wird anhand der Ausprägung der Atemnot das Stadium nach der Klassifizierung der New York Heart Association bestimmt. Eine Herzinsuffizienz liegt jedoch auch dann vor, wenn der enddiastolische Druck im linken Ventrikel erhöht ist aufgrund des verminderten Blutauswurfes. An dieser Stelle beginnen die pathophysiologischen Mechanismen der Herzinsuffizienz, deren Symptome sich über einen *circulus vitiosus* stets verschärfen, solange nicht therapeutisch eingegriffen wird. Als makroskopische und hämodynamische Anpassungen an die verminderte Auswurfleistung und damit einhergehenden höheren intraventrikulären Drücke reagiert das Herz mit einer konzentrischen Hypertrophie. Denn nach dem LaPlace-Gesetz ist die Wandspannung $T = p \cdot r / 2d$, wobei p der intraventrikuläre Druck ist, r der Innenradius des Ventrikels und d die Herzwanddicke darstellen. Im dekompensierten Stadium kommt es dann zu einer Dilatation des Ventrikels, währenddessen die systolische Wandspannung und damit der Sauerstoffverbrauch exponentiell zunehmen. Mikroskopisch kommt es zu einer Hypertrophie sowie zu einem Untergang der Kardiomyozyten, einer Ersatzfibrose sowie einer charakteristischen Veränderung der Kardiomyozyten als Reaktion auf die stetige Belastung („zelluläres Remodelling“). Außerdem zeigt der erkrankte Myozyt eine verlängerte Repolarisation, welches einem erworbenen Long-QT-Syndrom gleichkommt. Weitere zelluläre Mechanismen wie eine veränderte Calcium-Hömoostase, vermehrte Expression fetaler Isoformen der kontraktilen Proteine sowie eine Desensitivierung des β -adrenergen Signalweges führen zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch auf Kosten von elektrischer Stabilität, diastolischer Funktion sowie der Reagibilität auf Catecholamine.

Verschiedene neurohumorale Anpassungsmechanismen werden aktiviert, um das verminderte Schlagvolumen auszugleichen, wie die chronische Sympathikusaktivierung, die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die Freisetzung von Vasopressin (ADH) sowie natriuretischer Peptide. Sie führen jedoch mit Ausnahme der letzteren eher zu einer Verschlimmerung der Symptomatik und sind daher als maladaptiv und nicht protektiv zu betrachten. Für die Therapie der Herzinsuffizienz stehen konservative und invasive Behandlungsmethoden zur Verfügung, mit denen eine Verbesserung der Prognose und der Lebensqualität der betroffenen Patienten erreicht werden kann (The CONSENSUS Trial Study Group 1987, The MERIT-HF Study Group 1999, The RALES-Study Group 1999). Sie setzen an der Inhibierung der neurohumoralen Kompensationsversuche des Körpers an und unterbrechen damit den *circulus vitiosus* (β -Adrenozeptoren-Blocker, Inhibitoren des Angiotensin-Konvertierenden-Enzyms, Angiotensin-Rezeptoren-Blocker bzw. Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten). Bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz, die konservativ nicht mehr zu beeinflussen ist, bleibt als *ultima ratio* häufig nur die Herztransplantation. Im Jahr 2008 wurden in Deutschland insgesamt 382 Herz- und Herz-Lungentransplantationen durchgeführt, die Anzahl der Neuanmeldungen lag bei etwa 750 (Deutsche Stiftung für Organtransplantation, 2009). Nach der Collaborative Transplant Study liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei etwa 67%. Die Anzahl der Herztransplantationen ist in den letzten Jahren leicht gesunken, was auf einen Mangel an Spenderorganen, eine veränderte Indikationsstellung zur Transplantation sowie der Entwicklung erfolgsversprechender Alternativen mit anderen Therapiekonzepten wie den Herzunterstützungssystemen („left ventricular assist devices“) zurückzuführen ist. Letztere werden als kurzfristige (Zentrifugal- oder Axialflusspumpe) oder langfristige (Novacor, HeartMate) Herzunterstützung eingesetzt. Je nach Indikation (u.a.: Myokarditis, akute dekompensierte Herzinsuffizienz, Überbrückung bis zur Transplantation, Vorliegen von Kontraindikationen gegen eine Transplantation, Transplantatabstoßung, Zustand nach einem schweren Myokardinfarkt ohne therapeutische Alternativen) werden die intrakorporalen Systeme für Tage, Jahre oder zur permanenten Unterstützung implantiert. Obwohl die Ein- und Zweijahres-Überlebensrate nach permanenter Implantation eines Herzunterstützungssystems geringer als nach einer Herztransplantation ist, ist sie dennoch höher als mit einer medikamentösen Therapie (REMATCH-Studie, 2001). Langfristig bestätigte sich diese Überlegenheit

jedoch nur in nach bestimmten Kriterien ausgesuchten Patientenkollektiven (Stevenson et al. 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass die Entlastung des linken Ventrikels zu einer Umkehr des „zellulären Remodellings“ im Sinne einer Regression der Hypertrophie und Fibrose (Bruckner et al. 2001), einer verbesserten Kardiomyozyten-Kontraktilität (Heerdt et al. 2000), einer Sensibilisierung der beta-adrenergen Reagibilität (Ogletree-Hughes et al. 2001) und einer Normalisierung der Calcium-Homöostase (Terracciano et al. 2003) führt. Eine wesentliche und dauerhafte Erholung des Herzens wird jedoch nur bei Patienten mit nicht-ischämischer, schwerer Cardiomyopathie und einer langen mechanischen sowie aggressiven medikamentösen Therapie erreicht (Birks et al. 2006).

Als regenerative Therapieverfahren der Herzinsuffizienz, deren Ziel ein Ausgleich des krankheitsbedingten Verlusts an Herzmuskelzellen ist, werden heute folgende Ansätze erprobt: Aktivierung des Zellzyklus in Herzmuskelzellen, Implantation von Zellen mit kardiogenem Entwicklungspotential sowie die Herstellung und Implantation von künstlichen Herzgeweben. Letztes ist der Bereich des kardialen *tissue engineering*. Kardiales *tissue engineering* steht vor vielen Herausforderungen:

- Der klinische Einsatz von künstlich hergestelltem Gewebe ist nur dann möglich, wenn die verwendeten Zellen humanem Ursprungs sind. Eine Xenotransplantation wäre aus funktionellen und immunologischen Gründen eine Sackgasse.
- Ersetzendes Gewebe hat eine Größe und kontraktile Funktion aufzuweisen, die das Empfängerherz bedeutsam unterstützen kann. Diese Eigenschaften, sowie das *in vivo*-Überleben hängen maßgeblich von der metabolischen Versorgung ab, die ab einer Größe von 100-200 µm nur durch Blutgefäße erreicht werden kann. Vaskularisierung ist eine notwendige Voraussetzung für die Herstellung und das Überleben von großen implantierten „Gewebeflicken“.
- Strukturelle und elektrische Integrität des Implantates in das Empfängermyokard ist nötig für den funktionellen Synergismus, ohne den eine systolische Kraftsteigerung und diastolische Relaxation zur Ventrikelfüllung nicht möglich sind.

- Postnatale Kardiomyozyten teilen sich, wenn überhaupt, nur sehr wenig. Die großmaßstäbliche Herstellung von künstlichem Herzgewebe benötigt deswegen redundante Zellquellen.

Zur Herstellung künstlicher Herzgewebe haben sich drei Konzepte etabliert: (1) Das klassische Verfahren basiert auf der Besiedelung von vorgeformten synthetischen oder biologischen Matrices mit Herzmuskelzellen (Carrier et al. 1999, Kofidis et al. 2002, Leor et al. 2000), (2) die Förderung einer spontanen myokardialen Rekonstitution in einem Hydrogel mit Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und Herzzellen (Eschenhagen et al. 1997, Eschenhagen and Zimmermann 2005, Zimmermann et al. 2000, Zimmermann et al. 2002a) und (3) die Bildung von Herzgewebe aus mehreren übereinander gelagerten Zellschichten (Shimizu et al. 2002, Shimizu et al. 2006).

Die in klassischen *tissue engineering*-Verfahren verwendeten Trägermaterialien bestehen i.d.R. aus biologisch resorbierbarem Material wie Natriumalginat, Calciumgluconat, Polymilchsäuren oder Polyglykolsäuren (Akins et al. 1999, Bursac et al. 1999, Carrier et al. 1999, Leor et al. 2000, Li et al. 2000). Die somit hergestellten Herzmuskelkonstrukte entwickeln jedoch nur geringe Kontraktionskräfte, was eventuell auf die Steifheit der verwendeten Matrices zurückzuführen ist. In Implantationsstudien erwiesen sich biologisch abbaubare Matrices als förderlich für die Integration des Implantats in das Empfängerherz. Jedoch konnte die therapeutische Bedeutung bisher nicht nachgewiesen werden (Leor et al. 2000). Durch Stapelung von Einzelschichtkulturen konnten dagegen Konstrukte mit einer guten kontraktile Funktion hergestellt werden (Shimizu et al. 2002), die im implantierten Zustand nachweislich elektrische Kontakte mit dem nativen Myokard ausbilden (Furuta et al. 2006).

Das von Eschenhagen und Zimmermann entwickelte Modell des *Engineered Heart Tissue* (EHT) zeichnet sich durch mehrere Eigenschaften besonders aus. EHTs werden aus Herzmuskelzellen neonataler Ratten, Kollagen Typ I, extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors (Matrigel) und serumhaltigem Medium in ringförmigen Gussformen generiert und zeigen strukturelle und funktionelle Eigenschaften von differenziertem Myokard (Zimmermann et al. 2002b). EHTs

können über einen Zeitraum von mindestens 4 Wochen stabil kultiviert werden und eignen sich daher für Langzeitstudien unter definierten Bedingungen (Eschenhagen et al. 1997, Zimmermann et al. 2000, Zimmermann et al. 2002a, Zimmermann et al. 2006). Die Generierung in ringförmigen Gussformen erlaubt die Messung kontraktile Parameter unter isometrischen Bedingungen in Standardorganbädern. Dabei zeigen EHTs physiologische Parameter wie den Frank-Starling-Mechanismus, eine positiv inotrope Reaktion nach Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration sowie herzmuskelspezifische Reaktionen nach pharmakologischen Interventionen mit Isoprenalin und Carbachol. Mehrere Herzmuskelringe können zu Transplantationszwecken zu einem Flicker zusammengefügt werden, denn sie neigen dazu, bei engem Kontakt zusammen zu wachsen. Implantiert auf ein infarziertes Rattenherz bleiben EHTs bis zu acht Wochen kontraktile, werden vaskularisiert und innerviert und verbessern somit die diastolische und systolische Funktion im Gegensatz zu Kontrolltieren (Zimmermann et al. 2006). Es gibt Hinweise auf eine fortschreitende Reifung der Herzmuskelzellen in EHTs, die auf Rattenherzen implantiert sind. Das Herz einer neonatalen Ratte hat ein Gewicht von ungefähr 30 mg und das einer adulten Ratte von 1000 mg, wobei dieser Unterschied durch Zunahme an Größe und nicht an Zahl der Herzmuskelzellen bedingt ist. Dies lässt vermuten, dass die ursprünglich leichten EHTs mit den eher dünnen und netzwerkartig angeordneten Zellen durch weitere Reifung die notwendige Größe eines Transplantats erreichen können.

Für *Tissue-engineering* Ansätze auf der Basis von biologisch abbaubaren Hydrogelen eignen sich sowohl Kollagen als auch Fibrin als Extrazellulärmatrix. Die Extrazellulärmatrix sollte i) den Zellen eine Verankerungsmöglichkeit bieten, damit sie nicht zu Boden sinken, sondern sich zu einem dreidimensionalen Netz strukturieren können; ii) rigide genug sein, um das Empfängergewebe zu unterstützen, ohne dabei prothetische Funktionen anzunehmen, die einen Umbau durch das Empfängergewebe unmöglich machen; iii) den Zellen ermöglichen, die EZM-Proteine abzubauen und durch eigen produzierte Produkte zu ersetzen, denn kein Hydrogel und keine synthetische Matrix wird die natürliche EZM exakt imitieren können.

EHTs wurden bisher auf Basis von Kollagen Typ I hergestellt, wobei das Kollagen aus Rattenschwänzen eigens isoliert wurde. Zellen, die in nativen Kollagenmatrixen resuspendiert werden, werden durch Adhäsionsmoleküle mit diesen verankert (Heino 2007). Kollagene bestehen aus Fibrillen mit einem Durchmesser von 50-200 nm (Brown and Phillips 2007), die untereinander quervernetzt sind und durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen zusammenhalten und zu einer hohen Wassereinlagerung neigen. Durch Ausübung von Zugkräften, wie sie durch Kontraktionen der Kardiomyozyten hervorgerufen werden, können Kollagenfibrillen orientiert werden. Aber auch die Kollagenfibrillen selbst können sich durch Kontraktionen längs orientieren. Dies wird bei EHTs in Form eines Kondensierungsprozesses beobachtet. Das ursprünglich flüssige Zell-Matrix-Rekonstitutionsgemisch geliert innerhalb der ersten Stunde unter Inkubationsbedingungen. Im Laufe der ersten vier Tage zieht sich das Zell-Matrix-Rekonstitutionsgemisch bis auf ein Bruchteil des Volumens zusammen. Da dies in zellfreien Kollagen-Gelen ausbleibt, kann man davon ausgehen, dass im Wesentlichen zellbedingte Abbauprozesse und Syntheseprozesse die Extrazellulärmatrix modellieren. In EHTs wurde eine 1.000 bis 10.000 fach erhöhte Expression von Matrix-Metallo-Proteasen beobachtet (Boy 2006).

Eine Alternative zur Generierung der EHTs in Kollagenmatrix stellt die Resuspension der Zellen in Fibrinogen dar, welches durch Zugabe von Thrombin innerhalb von Sekunden zu Fibrin polymerisiert wird und die Zellen so rasch in einer dreidimensionalen Form hält. Die Fibrinfasern werden durch im Serum enthaltenes Plasmin wieder gespalten, ein Prozess der durch Protease-Inhibitoren wie Aprotinin *in vitro* sehr gut gesteuert werden kann (Ye et al. 2000). In der Wundheilung zur Blutstillung sowie Abdichtung des Gewebes und in der Chirurgie als Kleber kommt Fibrin große Wichtigkeit zu. In *tissue engineering* Ansätzen wurde Fibrin schon häufig erfolgreich verwendet (Borges et al. 2004, Ye et al. 2000) und zeichnet sich durch viele Eigenschaften aus: i) Es ist kein Bestandteil der reifen extrazellulären Matrix, sondern spielt in Wundheilungsprozessen maßgeblich mit und ist somit Bestandteil der frühen EZM ii) als provisorische Matrix wird es von vielen von Zellen sezernierten Proteinen zersetzt (Matrix-Metalloproteasen, Plasminogen (Ahmed et al. 2007) und kann durch neue EZM-Moleküle- wie Kollagen- ersetzt werden; iii) Aprotinin, ein Protease-Inhibitor kann den fibrinolytischen Prozess verlangsamen

oder stoppen und leicht dem Medium hinzugefügt werden, um die im Serum enthaltenen Proteasen zu inhibieren; iv) Wachstumsfaktoren können fest in die Fibrinmatrix integriert werden und die Entfaltung der Zellen vorantreiben; v) Fibrin bietet den Zellen Adhäsionsmöglichkeiten; vi) für Transplantationszwecke ist es möglich, aus dem Empfängerserum Fibrinogen zu isolieren, um dies als Grundlage für die Generierung autologer Gewebekonstrukte zu nutzen.

Beide Hydrogele bieten den populierenden Zellen die Möglichkeit, an ein repetitives Motiv der Fibrillen zu binden, die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) (Ruoslahti and Pierschbacher 1987). Diese Tripeptid kommt in vielen Proteinen vor (Fibronectin, Vitronectin, Osteopontin, Kollagene, Thrombospondin, Fibrinogen, und von Willebrand Faktor) und bindet an Integrine der Zelloberfläche. Es bietet Zellen nicht nur Verankerung, sondern auch ein Signal zur Migrationsführung, zur Ausdehnung, Polarisierung und Positionierung.

1.1.2 Angiogenese und tissue engineering

Eine Herausforderung der *tissue engineering*-Forschung ist die Bildung von dicken Geweben in ausreichender Größe, die in ihrer Kompaktheit dem nativen menschlichen Gewebe ähneln. Ein Gewebe benötigt zum Überleben Sauerstoff, Nährstoffe und die Möglichkeit, Abfallprodukte zu eliminieren. Eine Einbindung des Gewebes in den Gesamtorganismus ist aber auch zur biochemischen, endokrinen Kommunikation nötig (Nguyen and D'Amore 2001). Durch Weit- oder Engstellung von Gefäßen reguliert der Organismus auch Temperatur und Druck, ein Regulationsmechanismus, in den implantiertes Gewebe eingegliedert werden muss. Dieser Anspruch fordert unumgänglich die Ausstattung des artifiziellen Gewebes mit Blutgefäßen. Per Diffusion können bei metabolisch hochaktiven Geweben wie dem Myokard maximal 100 µm des Gewebes mit Nährstoffen sowie Sauerstoff versorgt werden (Frerich et al. 2001). Aus diesem Grund ist *tissue engineering* von Geweben mit wenig Sauerstoffbedarf, wie Knorpel, oder von dünnen Geweben, wie der Harnblase, bisher am weitesten fortgeschritten und in die klinische Anwendung überführt worden (Hodges and Atala 2007). Um die Translation eines in vitro erfolgreichen *tissue engineering* Ansatzes in die Transplantationsmedizin voranzutreiben, muss ein Weg gefunden werden, um das Gewebe an die Blutbahn des Empfängers anzuschließen, sei es durch Einwachsen von

Empfängerblutgefäßen in das künstliche Gewebe oder das Anschließen von präexistierenden Gefäßen des Implantats an die Empfängerzirkulation.

Die Vaskularisierung von künstlichem Gewebe kann über zwei Prozesse erfolgen: Angiogenese und Vaskulogenese. Ersteres involviert die parakrine Stimulation der in dem Empfängergewebe dem Implantat nah liegenden Endothelzellen zur Migration in das Biomaterial, indem sie einen entsprechenden Phänotyp ausbilden, Basalmembranen und extrazelluläre Matrix abbauen, wandern, sich teilen und dadurch neue Kapillarwände ausbilden, einschließlich der neuen Basalmembran (Ko et al. 2007). Als Stimulatoren ist ein Spektrum von Faktoren bekannt, welches je nach Gewebeart und Entwicklungsstufe variiert. Protagonisten sind die Faktoren aus der Gruppe des *Vascular endothelial growth factor (VEGF) A-D*, vor allem *VEGF-A* und deren Rezeptoren, den *VEGF-Receptors 1-3* (Karamysheva 2008), das Angiopoietin-/Tie-System mit den vier Angiopoietinen, die an die Rezeptortyrosinkinasen TIE1 und TIE2 binden (Thurston 2003) und die *Fibroblast-growth-factors (FGF) 1-23* mit deren Rezeptoren *FGF-Receptors 1-4* (Presta et al. 2005). Neben diesen wesentlichen Steuerern der Angiogenese wächst das Spektrum an bekannten Angiogenesefaktoren stetig (Folkman et al. 2008, Risau 1997). Angiogenese spielt während der embryonalen Entwicklung eine große Rolle, aber auch im adulten Organismus im Rahmen der Wundheilung und von krankhaften Prozessen. Vaskulogenese hingegen involviert die Differenzierung von mesodermalen Stammzellen zu Angioblasten, welche durch Zellkontakte Tubuli ausbilden, polarisieren und die Primordialgefäßwand formen. Perizyten und glattmuskuläre Zellen werden angezogen und in den Aufbau der Gefäßwand integriert. Der Vaskulogeneseprozess ist eng vergesellschaftet mit der Blutbildung aus Mesodermzellen die zu Hämangioblasten differenzieren (Ko et al. 2007). Vaskulogenese findet hauptsächlich während der Embryonalentwicklung statt. Es gibt aber auch Hinweise auf postnatale Vaskulogenese durch CD34-positive Angioblasten in der adulten Zirkulation, die an Orte der Neovaskularisierung rekrutiert werden können (Numaguchi et al. 2006). Beide Mechanismen sind durch das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren in unterschiedlichen Geweben hochkomplex und nicht vollständig verstanden. Die bereits bekannten Mechanismen werden jedoch durch Ansätze zur Lösung des Vaskularisierungsproblems von

künstlichen Geweben implementiert. Diese lassen sich in folgende methodische Gruppen unterteilen:

- Kultivierung von Zellen in synthetischen Polymergerüsten mit vorgeformten Mikrokanälen, die das Zellwachstum steuern und als Matrix zur Vaskularisierung dienen (Britland et al. 1996);
- Integration von angiogenetischen Stimuli in das Grundgerüst (Ehrbar et al. 2004);
- Förderung der Produktion von angiogenetischen Faktoren durch die transplantierten Zellen;
- Kokultur von gewebsspezifischen Zellen mit Endothelzellen, endothelialen Progenitorzellen, Perizyten, glattmuskulären Zellen und/oder Fibroblasten (Levenberg et al. 2005).

Die Ansätze unterscheiden sich dabei konzeptionell. Der eine Ansatz beinhaltet die Präformation eines Gefäßnetzes in vitro, der andere die Anregung der Einsprossung von Gefäßen des Empfängerorganismus nach der Implantation. Beide Konzepte werden im Folgenden genauer beschrieben und anhand bisheriger in vitro und/oder in vivo Untersuchungen evaluiert.

Integration von angiogenetischen Stimuli in das Grundgerüst

Die Integration von angiogenetischen Stimuli in ein Polymergrundgerüst, um das Einwachsen von Empfängerblutgefäßen zu beschleunigen, ist ein vielseitig erprobter Ansatz. Der zu Grunde liegende Gedanke ist, dass die Faktoren in die Umgebung des Biomaterials diffundieren und den Empfängerorganismus zur Bildung von Gefäßen im implantierten Gewebe anregen. Umliegende Endothelzellen werden parakrin zur Angiogenese stimuliert. Durch systemische Wirkung der Faktoren ist die Induktion von knochenmarkstämmigen, zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen zur Ausbildung von Gefäßen im Implantat durch Vaskulogenese ebenfalls denkbar. Von gegenüberliegenden Seiten des Implantats einwachsende Kapillaren würden sich in der Mitte treffen und ein zusammenhängendes Gefäß bilden.

Die Tatsache, dass physiologische Angiogenese durch ein komplexes Spiel zwischen Zellen und deren Umgebung geschieht, führt zu dem Ansatz, Polymergrundgerüste zu entwickeln, die einerseits bioreagibel (d.h. modellierbar

durch Proteasen oder Endoglycosidasen) und bioaktiv sind (d.h. Migrationsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine enthalten). Andererseits sollen diese Polymergrundgerüste auch zur Anwendung im Menschen geeignet sein. Als Beispiel für diese Herangehensweise ist die Verwendung von enzymatisch derivatisiertem Fibrin anzuführen: Fibrinogen polymerisiert unter der Wirkung von Thrombin zu einem Polymer, welches injizierbar ist und keine Zytotoxizität aufweist. Es kann jedoch durch Enzyme zersetzt werden und dadurch die Zellinfiltration ermöglichen. (Ehrbar et al. 2007) haben eine Methode entwickelt, um angiogenetische Stimuli als rekombinante Peptide während der Koagulation von Fibrinogen zu Fibrin unter der enzymatischen Aktivität des Koagulationsfaktors Transglutaminase XIIIa in das Fibrin Maschenwerk zu integrieren (Ehrbar et al. 2007) . Diese funktionalisierten Fibrinmatrices zeigten auf der Chorioallantoismembran (im Folgenden mit CAM abgekürzt) sowie im Mausmodell angiogenetische Aktivität (Ehrbar et al. 2004). Die Weiterentwicklung dieses Ansatzes zielt auf die Entwicklung von Extrazellulärmatrices ab, die durch inkorporierte Faktoren nicht nur die umgebenden Zellen zur Migration anregen, sondern auch die transplantierten Zellen zu vermehrter Produktion von Angiogenesefaktoren stimulieren. Auch ist es möglich, Angiogenesefaktoren kovalent an eine Matrix zu koppeln, welche diese reguliert und nach zellulärer Aktivität und Bedarf abgibt (Zisch et al. 2003). Dieser Prozess kostet jedoch Zeit, während das künstliche Gewebe der Ischämie ausgesetzt ist.

Da die Migration von Endothelzellen und deren Modellierung zu einem Blutgefäßsystem umso mehr Zeit kostet, je dicker und zeldichter das Gewebe ist, während derer die implantierten Zellen der Ischämie ausgesetzt sind, scheint es unumgänglich, ab einer bestimmten Größe das künstliche Gewebe schon vor der Implantation mit einem vaskulären System auszustatten.

Kokulturen von gewebsspezifischen Zellen zusammen mit vasogenen Zellen

Die Prävascularisierung von Geweben *in vitro* durch Zugabe von Endothelzellen bzw. deren Progenitorzellen stellt eine vielfach erprobte Alternative zu dem obigen Ansatz dar. Die Idee ist, dass einwachsende Endothelzellen Anschluss finden an die bereits bestehenden Gefäße und somit die Vaskularisierung erheblich beschleunigen. Die vasogenen Zellen im Implantat produzieren außerdem Wachstumsfaktoren, welche angiogenetische Prozesse im Empfängergewebe reizen (Levenberg et al. 2005).

Endothelzellen zeigen die Eigenschaft, in bestimmten dreidimensionalen Polymergerüsten, Verbindungen zu einander auszubilden bis hin zu tubulären Strukturen und mikrovaskulären Netzwerken (Sieminski et al. 2004). Als Polymergerüste haben sich biologisch abbaubare Hydrogele wie Gelatine, Fibrin, Kollagen, Fibronectin, und Matrigel-Matrices als geeignet erwiesen, um unterschiedliche Endothelzelllinien wie HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*), HDMEC (*human dermal microvascular endothelial cells*) oder differenzierte murine Stammzellen (McCloskey et al. 2006) zur Ausbildung eines mikrovaskulären Netzwerkes zu unterstützen. *In vivo* gehen diese kultivierten Endothelzellstrukturen jedoch schnell in Apoptose (Nomi et al. 2002). Zur funktionellen Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen aus endothelialen Progenitorzellen scheint die Beifügung von glattmuskulären Zellen oder deren mikrovaskulären Korrelaten, Perizyten, förderlich (Wu et al. 2004). Ein beispielhafter Ansatz wurde von Borges et al. (2006) entwickelt. Die 3D-Kultur von primären humanen Präadipozyten in einem 3 cm³ großen Fibringrundgerüst führt auf der CAM zur Ausbildung eines perfundierten mikrovaskulären Netzwerkes. Die Vaskularisierung kann signifikant erhöht werden durch i) vorhergehende Transfektion der Präadipozyten mit einem VEGF-Vektor (Torio-Padron et al. 2005) oder ii) Beimengung von HDMVEC (Human dermal microvascular endothelial cells) zu den Präadipozyten, wobei die perfundierten Gefäße auch durch humane Zellen begrenzt werden (Borges et al. 2003a). Die Prävaskularisierung von Skelletmuskelkonstrukten durch Multikulturen wurde auch von Levenberg et al. (2005) als wesentlich für den Struktur- und Vitalitätserhalt des implantierten Gewebes erkannt. Kokulturen von Myoblasten und Endothelzellen in porigen, biologisch abbaubaren Polymergerüsten bildeten *in vitro* spontan Gefäßstrukturen aus, die durch die Zugabe von embryonalen Fibroblasten vermehrt gebildet und in ihrer Struktur gestärkt wurden. Die Kokulturimplantate überlebten eine Implantation in die abdominale Muskelwand von SCID-Mäusen signifikant besser als die nicht-prävaskularisierten Kontrollgewebe (Levenberg et al. 2005).

EHT Modell

Das EHT-Modell stellt eine Sonderform der Kokultur dar, denn die Zellpräparation spiegelt weitgehend die zelluläre Zusammensetzung eines neonatalen Rattenherzens wider. EHTs bestehen zu 47 % aus Kardiomyozyten, 49 % aus

Fibroblasten, zu 3-4 % aus glatten Muskelzellen und 2-3 % aus Endothelzellen (Naito et al. 2006). Die Zellvielfalt scheint eine wichtige Rolle zu spielen für die organotypische Differenzierung der EHTs sowie deren Kraftentwicklung (Zimmermann et al. 2002a). Die spontane *in vitro* Ausbildung von primitiven Kapillaren geschieht durch CD31-positive, differenzierte Endothelzellen; möglicherweise auch durch CD34-positive endotheliale Progenitorzellen und CD14-positive Monozyten, die beide das Potential zur Differenzierung zu Endothelzellen besitzen. Dies schien in vorherigen Studien zwar keine bedeutende Rolle bei der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung *in vitro* zu spielen, jedoch das Einwachsen von Empfängergefäßen und darauffolgende Perfusion des Gewebes zu erleichtern (Eschenhagen and Zimmermann 2005).

Ob ein konstruiertes Gewebe aufgrund seiner Beschaffenheit einem Gefäßsystem die Möglichkeit bietet, dieses zu penetrieren, in ihm ein Netz aus Kapillaren, Arteriolen, Venolen bis hin zu weitlumigen und dickwandigen Arterien und Venen auszubilden und inwieweit es selbst ein Stimulus dazu darstellt, muss anhand von Zwischenstufen zwischen der *in vitro* Analyse des präexistierenden Gefäßnetzes und der Implantation in einen Säugetierorganismus untersucht werden. Ein solches Modellsystem sollte reproduzierbar, einfach und kostengünstig sein, sowie die Möglichkeit bieten, den Prozess der Neovaskularisation möglichst gut zu beobachten. In diesen Hinsichten zeichnet sich der CAM-Assay aus.

1.2 EHT Vaskularisierung im nativen und implantierten Zustand

Der Vaskularisierungsgrad, den ein Gewebe benötigt um, ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden, hängt davon ab, wie zell dicht das Gewebe ist und wie stoffwechselaktiv die Zellen sind. Herzwewebe gehört offensichtlich in die Gruppe mit dem höchsten Bedarf an Blutversorgung. In einem adulten Herzen sind ungefähr 2.400 bis 3.300 Kapillaren/mm² zu finden. Obwohl die Muskelstränge in EHTs nicht die Kompaktheit eines nativen Herzens erreichen, sind in EHTs mehrfach und auf verschiedene Art und Weise kapilläre Strukturen gefunden worden, die auf das Vorhandensein von Endothelzellen im Rekonstitutionsmix zurückzuführen sind.

In zwölf Tage alten EHTs lassen sich vernetzte Endothelzellen mittels CD31-Antikörper nachweisen. EHTs werden *in vitro* nicht perfundiert, daher ist es

unwahrscheinlich, dass diese Strukturen ein Lumen besitzen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen jedoch Endothelzellassoziationen, die ein Lumen bilden (Zimmermann et al. 2002b), siehe Abbildung 1. Vier Wochen nach Implantation auf infarzierte Rattenherzen werden EHTs aber perfundiert, wie das Vorhandensein von Erythrozyten in Blutgefäßen im Explantat beweist. Dies wurde im Rahmen einer Studie gezeigt, in der EHTs nach 12 Tagen *in vitro* Kultur auf das Herz einer immunsupprimierten Ratte implantiert wurden (Zimmermann et al. 2006). Vier Wochen nach der Implantation wurde ein hoher Grad an Vaskularisierung gefunden. In Abbildung 2 ist ein Gefäß gezeigt, welches Erythrozyten führt, die durch DIC (*Differential Interference Contrast*) visualisiert werden. Rechts sind Endothelzellaggregationen gezeigt, die einen gefärbten Kern tragen. Dies zeigt, dass die Gefäßzellen zumindest zum Teil von Spenderseite stammen, da die EHTs vor der Implantation mit DAPI angefärbt wurden.

In wie weit die Vaskularisierung der implantierten EHTs jedoch bestimmt wird durch die Fusion des präexistierenden Gefäßnetzes mit den invadierenden Gefäßen oder in wie weit Spenderendothelzellen rekrutiert werden für den Aufbau von Gefäßen im EHT, blieb bislang unklar.

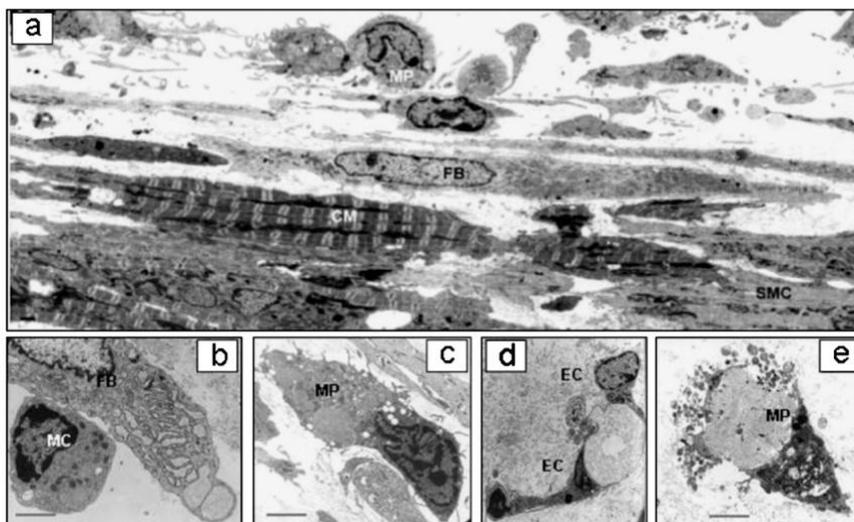


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von nativen EHTs

(Zimmermann et al. 2002)

Die äußere EHT-Schicht (a) wird durch längs-orientierte Fibroblasten gebildet (FB) und glatten Muskelzellen (SMC). Verschiedene nicht kardiomyozytäre Zelltypen wie Monozyten (MC, b), Makrophagen (MP, c, e) und lumenbildende Endothelzellen (EC, d). Maßstabsbalken: 1 µm.

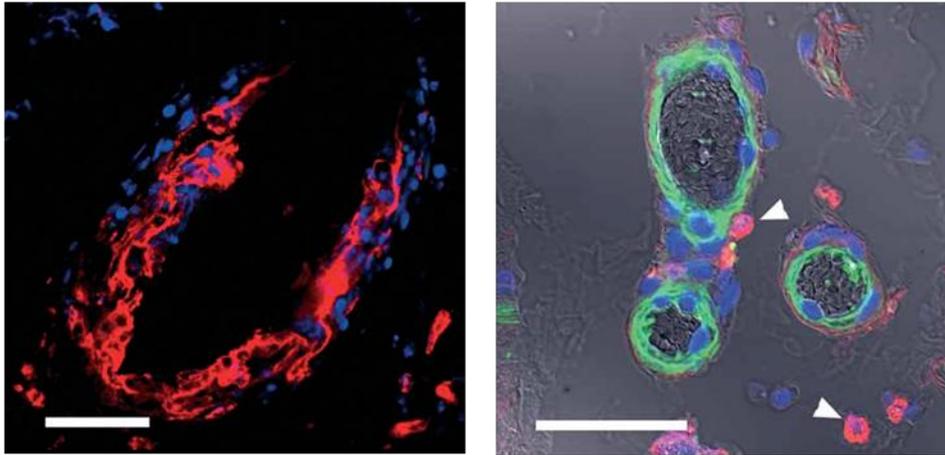


Abbildung 2: Gefäße in EHT-Explantaten

(Zimmermann et al. 2006)

EHT-Explantate vier Wochen nach Implantation zeigten Gefäßformation, die DAPI-positive Kerne enthalten (links, in rot sind Endothelzellen mit Lektin und Zellkerne mit DAPI angefärbt). Das Vorhandensein von Erythrozyten (rechts, visualisiert durch DIC) in Blutgefäßen deutet auf die Perfusion von Gefäßen in EHTs hin. Rechts sind Aktinfilamente mit Phalloidin markiert (grün) und Makrophagen, die sich in enger Nachbarschaft zu den Gefäßen befinden sind in rot markiert (anti-ED2, Makrophagen Oberflächenantigen). Maßstabsbalken: 50 µm

1.3 Chorioallantoismembran-Assay

1.3.1 Chorioallantoismembran-Assay als Instrument der Angiogeneseforschung

Schon Anfang des 20. Jahrhunderts erschienen die ersten Veröffentlichungen zur Erforschung der embryonalen Entwicklung von Wirbeltieren anhand des bebrüteten Hühnereis (Schauinsland 1903). Seitdem hat sich die Anwendung des bebrüteten Hühnereis als Modellsystem weit verbreitet: Als teratologisches Modell wurde anhand des Hühnerei-Tests 1962 die Wirkung von Thalidomid bestätigt (Kemper 1963), 1973 beschrieb Judah Folkman die Effekte des VEGFs auf die Gefäßentwicklung der CAM. Die CAM wird als ein *in vivo* Testsystem zur Untersuchung von einer Vielzahl von Effekten genutzt:

- Wirkung angiogenetischer und antiangiogenetischer Faktoren (Ribatti et al. 1996)
- Teratogenität
- Vasoproliferative Potenz von Tumorzellen (Hagedorn et al. 2005)
- Mechanismen der Angiogenese (Djonov et al. 2000)

- Implantation von Gewebekonstrukten auf die CAM (Borges et al. 2004)

Unterstützt durch das CAM-Modell wurden einige Meilensteine der Angiogenese-Forschung der letzten Jahrzehnte erreicht: Esch et al. zeigten 1985 die angiogenetische Wirksamkeit von dem gerade erst charakterisiertem *basic FGF* anhand des CAM-Modells. Darauffolgend wurden viele weitere Angiogenesefaktoren charakterisiert. Ihr Potential wurde überwiegend auf der CAM untersucht, so dass dies als die klassische Anwendung des CAM-Modells betrachtet werden kann.

Der CAM-Assay ist eines unter vielen Angiogenesemodellen. Alternativen stellen der „*corneal micropocket assay*“, „*rodent mesentery angiogenesis assay*“, „*sponge implant assay*“ oder „*matrigel plug assay*“ dar (Norrby 2006). In vielerlei Hinsichten zeichnet sich der CAM-Assay gegenüber diesen besonders aus:

- Befruchtete Eier sind preiswert erhältlich und lassen sich ohne großen Aufwand bebrüten.
- Wie die Säugerplazenta ist die CAM nicht innerviert und die Schmerzwahrnehmung des Embryos erfolgt frühestens nach elf Tagen Bebrütung (Gesamtbrutzeit 21 Tage).
- Versuche mit bebrüteten Hühnereiern werden in Deutschland nicht als Tierversuche angesehen und bedürfen deshalb keiner Genehmigung.
- Das zelluläre Immunsystem entwickelt sich erst in einer späteren embryonalen Phase: Am achten Tag fängt die Produktion von lymphoiden Zellen in Dottersack und Milz an, in der Bursa fabricius können diese ab dem elften Tag nachgewiesen werden (Leene et al. 1973)

Der Anwendung stehen jedoch einige Limitationen im Weg: Die CAM hat die Eigenschaft allzu störanfällig zu sein, jede kleine Irritation kann zu einer inflammatorischen Reaktion führen, welche als angiogenetischer Reiz der Testsubstanz missinterpretiert werden kann. Auch die Visualisierung von kleinsten Gefäßentwicklungen kann schwer sein, da die CAM Endothelzellen bis zum Tag 12 einen hohen mitotischen Index zeigen und eine physiologische Gefäßentwicklung schwer von einer exogen induzierten zu unterscheiden ist. Außerdem spielen

biologische Schwankungen bei der Experimentdurchführung eine große Rolle und erschweren die Auswertung.

Die Eignung des CAM-Modells zur Untersuchung von Vaskularisierung bzw. Revaskularisierung von natürlichen und artifiziellen Geweben wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Die Implantation von dreidimensionalen Konstrukten aus Präadipozyten in einer Fibrinmatrix (Borges et al. 2003b) auf die CAM zeigt eine Vaskularisierung nach acht Tagen und die vorherige Transfektion dieser Zellen mit einem VEGF-165 kodierenden Vektors erhöht die Vaskularisierung (Torio-Padron et al. 2005). 1975 untersuchten Ausprunk und Folkman die Vaskularisierung oder Revaskularisierung von neoplastischem, embryonalem und adultem Gewebe. Sie fanden heraus, dass im neoplastischen Gewebe die eigenen Gefäßstrukturen innerhalb von zwei Tagen degenerieren und das Gewebe am dritten Tag revaskularisiert ist. Im embryonalen Gewebe unterschiedlicher Organsysteme hingegen finden die sprießenden CAM-Gefäße am ersten und zweiten Tag Anschluss an das bestehende Gefäßsystem. Nur das adulte Gewebe wird nicht vom CAM-Gefäßsystem vaskularisiert. Im Gegenteil, die mitgebrachten Gefäße degenerieren innerhalb weniger Tage. Zentral zeigt das implantierte Gewebe Zeichen von Zelltod, während die Zellen und Bindegewebe der CAM das Gewebe invadieren, schließlich zersetzen und phagozytieren. Der Anwendung des CAM-Modells als Testsystem zur Vaskularisierung von künstlich hergestelltem Gewebe stehen also spezielle Limitationen entgegen. Die angiogenetische Potenz der Gewebekonstrukte hängt von dem Differenzierungsgrad und der Herkunft der implantierten Gewebe stark ab.

1.3.2 Physiologie und Aufbau der CAM

Die CAM entwickelt sich am vierten Tag der Bebrütung durch die Fusion von Chorion und Allantois. Seitdem dient sie bis zum 21. Tag der Bebrütung, dem Tag an dem das Küken schlüpft, als Gasaustauschfläche, ähnlich der Säugerplazenta oder den Lungen in der Postfetalzeit, ist aber auch für den Kalziumtransport von der Schale in den Embryo verantwortlich. Desweiteren ist die CAM ein Sammelbecken für stickstoffhaltige Endabbauprodukte, welche durch den Embryo produziert werden (Bellairs and Osmond 2005).

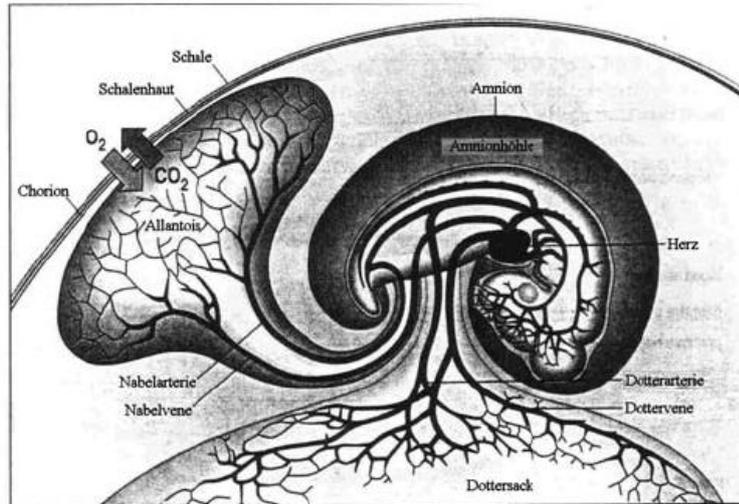


Abbildung 3: Die extraembryonalen Strukturen und Zirkulationen im Hühnerembryo.

(Patten 1953)

Über die Dottersackarterie gelangt das Blut zum Eidotter und versorgt den Embryo über die Dottersackvene mit Nährstoffen. Die Nabelarterie transportiert die Stoffwechselabfälle zur Allantois und die Nabelvene bringt oxygeniertes Blut zum Embryo zurück. Die flüssigkeitsgefüllte Amnionhöhle dient als Schutzkammer für den Embryo.

Entstehung aus den drei Keimblättern

In den ersten Tagen der Bebrütung bildet sich das Chorion aus, welches fortwährend ab der ersten Inkubationswoche Kontakt zur Schalenhaut hat. Die Embryoanlage wird von außen durch das extraembryonale Ektoderm und die Somatopleura umfasst. Diese wachsen um das Embryo herum, bis sie in der dorsalen Mittellinie zusammenstoßen und unter Bildung der Amnionnaht verschmelzen. Diese verschwindet rasch wieder, und die beiden Schichten der Amnionfalten bilden das Amnion und Chorion. Ersteres umfasst den Keimling von innen, letzteres von außen. Jede dieser Schichten besteht aus ektodermalem Epithel und Stützgewebe, welches das extraembryonale Zölom auskleidet. In der Gegend des Nabels bildet sich nach 48 Stunden eine sackförmige Ausstülpung des Enddarmes, die Allantois. Diese stößt in das vom Chorion umgebene extraembryonale Zölom vor, bis es zwischen dem 4. und 5. Bebrütungstag das Chorion erreicht. Als Derivat des embryonalen Darmes besteht sie aus einem Epithel, das wie die Dottersackwand von mesodermalem Stützgewebe überzogen ist. Die CAM besteht demnach aus drei Schichten: dem Ektoderm (Chorion), Mesoderm (verschmolzenes somatisches Mesoderm vom Chorion und splanchnisches Mesoderm der Allantois) und dem Endoderm der Allantois (Bellairs and Osmond 2005). Die CAM wird von einem dichten Netzwerk

von Lymphgefäßen drainiert (Oh et al. 1997), und wie die Säugerplazenta ist das extraembryonale Gefäßsystem der CAM nicht innerviert (Kunzi-Rapp et al. 1999).

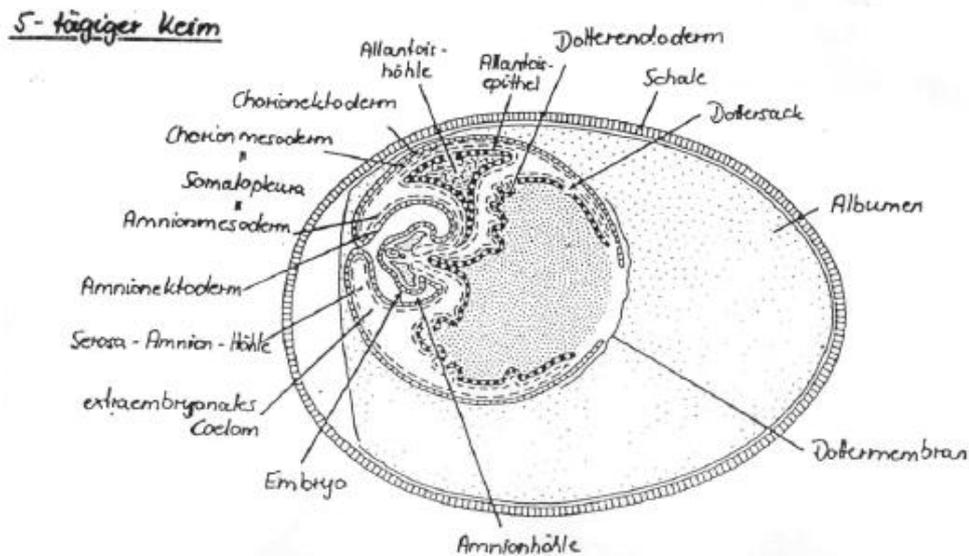


Abbildung 4: Längsschnitt durch ein fünf Tage altes Hühnerembryo

Aufbau und Fluss des Blutsystems

Im intakten Ei breiten sich die CAM und ihre Gefäße über die Oberfläche des Dottersackes aus und bedecken ihn am sechsten oder siebten Tag komplett (Fuchs and Lindenbaum 1988). Das reichliche Gefäßsystem, welches sich in der Mesodermischiicht entwickelt, wird durch die paarigen Allantoisarterien und einer Allantoisvene versorgt (Bellairs and Osmond 2005). Vor der Ausbildung der CAM heißen diese Gefäße Nabelarterie und –vene und versorgen die Allantois. Sie bringen Stoffwechselprodukte und CO₂ in die CAM. Die Nährstoffversorgung geschieht nicht über das Gefäßsystem der CAM, sondern über die Dotterarterie und –vene aus dem Dottersack. Der Gefäßbaum der CAM kann in zwei horizontale Schichten geteilt werden. Die äußerste Schicht besteht aus einem feinen kapillären Netzwerk, die tiefere enthält die größeren Gefäße. Dazwischen liegen die prä- und postkapillären Gefäße, welche in schräger oder senkrechter Lage zum oberflächigen kapillären Netzwerk aufsteigen und für die arterielle Versorgung sowie die venöse Drainage desselben verantwortlich sind. Das kapilläre Netzwerk ist die oberflächennächste Schicht der extraembryonalen Gefäße und erscheint in die CAM eingebettet, während die tiefer liegenden größeren Gefäße frei beweglich sind (Fuchs and Lindenbaum 1988, eigene Beobachtung), siehe Abbildung 5.

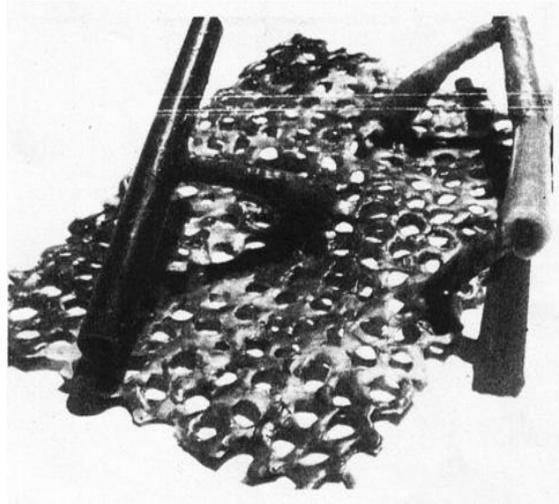


Abbildung 5: fotografiertes Wachsmodell der CAM

Ansicht von unten (Fuchs and Lindenbaum 1988)

Die äußerste Schicht besteht aus einem feinen kapillären Netzwerk, die tiefere enthält die größeren Gefäße. Dazwischen liegen die prä- und postkapillären Gefäße, welche in schräger oder senkrechter Lage zum oberflächigen kapillären Netzwerk aufsteigen und für die arterielle Versorgung sowie die venöse Drainage desselben verantwortlich sind.

Blutzellen während der Inkubationszeit

Die Blutbildung findet zu unterschiedlichen Zeitpunkten an unterschiedlichen extra- und intraembryonalen Orten statt: intraembryonal in verschiedenen Organen wie z.B. der Milz und Bursa Fabricius und extraembryonal im Dottersack. Das Blutbild setzt sich aus Erythrozyten, nicht-granulierten (Lymphozyten und Monozyten) sowie granulierten Leukozyten (basophile, eosinophile und neutrophile) und Thrombozyten zusammen. In Vögeln wie in Reptilien sind die roten Blutkörperchen kernhaltig und haben eine ovale Form. Die ersten entstehenden roten Blutzellen bilden eine primitive Zelllinie, welche degeneriert und durch die definitive Zelllinie ersetzt wird. Ab dem fünften Tag der Bebrütung dominiert die definitive Linie, am zwölften Tag ist hauptsächlich der 7-10,3 µm lange und breite, runde und kernhaltige Proerythrozyt vertreten (Engel 1895).

1.3.3 Gefäßwachstum in der CAM

Die Entstehung des Blutgefäßsystems im bebrüteten Hühnerei beginnt durch Vaskulogenese im Dottersack. Aus dem splanchnopleuralen Mesoderm entstehen unter dem Einfluss mesoderminduzierender Faktoren der FGF-Familie Blutinseln aus Hämangioblasten. Die Zellen im Zentrum der Blutinseln differenzieren zu hämatopoetischen Stammzellen, während die peripheren Inselzellen zu

endothelialen Vorläuferzellen, Angioblasten, werden. Die Differenzierung von Angioblasten wird vor allem von Wachstumsfaktoren wie VEGF, dem VEGF-Rezeptor-2 sowie FGF beeinflusst (Carmeliet et al. 1996, Ferrara 1996). Diese enge räumliche Nachbarschaft sowie die Expression einer Anzahl von Antigenen, wie z.B. den VEGF-Rezeptor KDR/flk-1, den Angiopoietinrezeptor tie-2 und CD34 weisen auf die Existenz einer gemeinsamen Vorläuferzelle hin (Choi 1998, Hatzopoulos et al. 1998). Durch Wachstum und Fusion der Blutzellen, abhängig vom Sauerstoffgehalt der Gewebe, Scherkräften und angiogenetischen Faktoren, wird ein vaskulärer Plexus gebildet, der auch zur Bildung größerer Blutgefäße führt. Gefäßwachstum durch Vaskulogenese findet an unterschiedlichen Orten auch intraembryonal statt. Die Ausweitung und Verästelung des primitiven vaskulären Plexus geschieht durch Angiogenese. Dabei sind zwei Mechanismen beschrieben: Angiogenese durch Aussprossung und Angiogenese durch Intussusceptives mikrovaskuläres Wachstum (IMG). Es wurde gezeigt, dass die Angiogenese in der CAM in 3 Phasen abläuft: In einer frühen Phase von Tag fünf bis sieben geschieht der Großteil des kapillären Wachstums durch Aussprossen. In einer Zwischenphase von Tag 8 bis 12 gewinnt das IMG die Oberhand und an den Tagen 13 und 14 expandiert die CAM-Struktur nur noch mit geringem Anstieg an Komplexität.

Dieses erst seit relativ kurzer Zeit beschriebene Gefäßwachstum durch IMG geschieht in vier Phasen, deren Ergebnis die Zweiteilung einer tubulären Struktur ist. In Phase I bilden opponierende Kapillarwände eine Kontaktzone. Diese wird in Phase II so reorganisiert, dass sich die Zellen aufteilen und eine Lücke im Endothel entsteht, die von intraluminal wie eine Säule wirkt. Diese Lücke bzw. Säule wird in Phase III aufgefüllt durch invadierende Zellen, die die extrazelluläre Matrix ablegen. Die letzte Phase besteht aus der Vergrößerung dieser Lücke. Durch gerichtete Bildung dieser Säulen entlang eines Gefäßes wird dieses Gefäß zweigeteilt. Die anschließende Formierung sogenannter „*feeding vessels*“ gibt dem Geflecht eine hierarchische Struktur (Djonov et al. 2003).

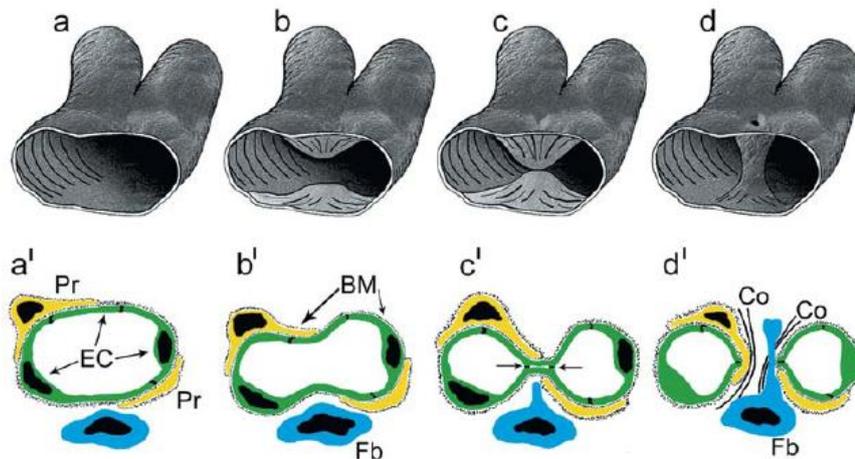


Abbildung 6: Schematische Darstellung des IMG

(Djonov et al. 2003)

EC: Endothelzelle, Pr: Pericyt, BM: Basalmembran, Co: Kollagen.

A: Gefäß aus Endothelzelle, Perizyten und angrenzenden Fibroblasten

B: Phase I: opponierende Kapillarwände bilden eine Kontaktzone

C: Phase II: Reorganisation, so dass sich die Zellen aufteilen und eine Lücke im Endothel entsteht, die von intraluminal wie eine Säule wirkt.

D: Phase III: Auffüllung durch invadierende Zellen, die extrazelluläre Matrix ablegen. Die letzte Phase besteht aus der Vergrößerung dieser Lücke.

IMG ist für Organe, die ein möglichst schnelles Gefäßwachstum verlangen, von besonderer Bedeutung. Im Gegensatz zur Aussprossung ist es energetisch und metabolisch viel ökonomischer. Eine exzessive Endothelzellproliferation ist nicht erforderlich, denn die Vergrößerung des Netzwerkes geschieht hauptsächlich durch Verdünnung des Endothels. Die Basalmembran muss nicht zersetzt werden, um danach wieder aufgebaut zu werden. Durch IMG nimmt die Fläche der CAM rasant zu, von 6 cm² an Tag 6 auf 65 cm² an Tag 14 (Djonov et al. 2000). Der Proliferationsindex der Endothelzellen, gemessen durch Thymidin-Markierung, liegt bei 23% bis Tag 10. Am elften Tag, während das IMG dominiert, fällt er ab auf 2% (Ribatti et al. 2006).

Die Testung von angiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren wurde durch die stetige Entwicklung des CAM-Modells und der Erforschung der CAM verbessert. Der Zeitrahmen der Testung spielt eine große Rolle: Zwischen Bebrütungstag 5-12 kann die Beschleunigung oder Verlangsamung der konstanten embryonalen Angiogenese beobachtet werden. Die sogenannte de novo Angiogenese, also die Initialisierung einer angiogenetischen Reaktion in einem Gewebe ohne

physiologisches Gefäßwachstum, hingegen erst ab Bebrütungstag zwölf. Die Angiogenese durch Aussprossung wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert wie Angiopoetine, Plättchenfaktor (PDGF), FGF und VEGF. Letzterer sowie eine Reihe anderer Faktoren wird durch den Transkriptionsfaktor „*Hypoxia-induced-factor*“ induziert, der je nach Sauerstoffgehalt des Gewebes seine Aktivität einstellt. Die Angiogenese durch Aussprossung ist maßgeblich durch Sauerstoffkonzentrationen und metabolische Ansprüche gesteuert. Für die Regulation des IMG werden mechanische Reize in der Literatur als ausschlaggebend beschrieben. So wird durch die Abklemmung eines großen CAM-Gefäßes kurz nach einer Aufgabelung IMG in Regionen um das Geschwistergefäß initiiert und innerhalb von Minuten entstehen die ersten Säulen. Die Scherkraft ist abhängig vom Gefäßdurchmesser. Wenn sich eine Säule in der Mitte eines Gefäßlumens ausbildet, kann diese Scherkraft enorm gesenkt werden, was Konsequenzen für den Blutfluss der nachgeschalteten Gefäßsegmente hat. Diese mechanische Spannung wird von Endothelzellen mittels Molekülen wie PECAM/CD31 erkannt, und die folgende Mechanotransduktion führt zur Transkription verschiedener Faktoren wie endothelialen Stickstoffmonoxids, Adhäsionsmolekülen oder angiogenetischen Faktoren, welche die Annäherung zweier entgegengesetzter Kapillarwände induzieren können. Erst durch die Mechanotransduktion wird ein ähnliches Faktorenspektrum aktiviert, welches auch die Aussprossung reguliert. IMG scheint jedoch maßgeblich durch hämodynamische Parameter reguliert zu sein (Djonov et al. 2000).

1.4 Thymosin β_4

Entdeckt wurde Thymosin β_4 (im Folgenden mit Tb4 abgekürzt) als ein Bestandteil der „Fraktion 5“ des Proteinextraktes vom Kälberthymus. Aufgrund dieser Herkunft wurden alle Proteine der „Fraktion 5“ Thymosine genannt. Sie galten als Immunantwort-modulierende Thymushormone, hierunter das 43 Aminosäuren lange Polypeptid Tb4. Einige der Polypeptide aus dem Thymusproteinextrakt wurden auf ihre biologische Aktivität untersucht, worauf sich herausstellte, dass es sich nicht um spezielle Thymushormone handelte, sondern sich eine biologische Funktionsvielfalt dahinter verbirgt.

Tb4 hat eine hochkonservierte Struktur, befindet sich in hohen Konzentrationen (bis zu 0,4 mM) in vielen Geweben und Blutzellen und macht bis zu 1% der gesamten

Proteinbiosynthese aus (Hannappel and Leibold 1985). Diese Eigenschaften wiesen auf eine allgemeinere Funktion als ein intrazelluläres Strukturelement hin. Inzwischen ist Tb4 als ein G-Aktin bindendes Protein bekannt, welches die Aktinpolymerisation mit reguliert, indem es monomeres Aktin bindet und dem Pool des polymerisierbaren Aktins entzieht. Die Aktin-Dynamik hängt maßgeblich von der Verfügbarkeit von Aktinmonomeren und deren Polymerisationsstellen ab, beide bindet Tb4 und hält sie somit bereit. Als solches spielt es bei Migrationsprozessen (Endothelzellen) sowie der Leukozytendiapedese eine wichtige Rolle. Im Zellkern kommen Aktin-ähnliche Proteine (*Actin related proteins - Arps*) sowie Aktin-bindende Proteine vor, u.a. Tb4 (Huff et al. 2004). Das zahlreiche Vorkommen dieser Zytoskelettproteine im Nukleus impliziert deren Rolle bei der Kernstrukturierung, sowie der DNA-Replikation und Transkription (Olave et al. 2002). Über die regulierten sowie die regulierenden Faktoren von Tb4 ist bislang nicht viel bekannt. Jedoch sollen Proteasen, Laminin-5 sowie zahlreiche inflammatorische Zytokine und Chemokine von Tb4 reguliert werden. Glukokortikoide stimulieren Monozyten dazu, die oxidierte Form von Tb4 (Tb4 Sulfoxid) zu produzieren, welches *in vitro* die Neutrophilenchemotaxis hemmt und *in vivo* anti-inflammatorisch wirkt (siehe unten; (Young et al. 1999).

Neben diesen bemerkenswerten intrazellulären Funktionen von Tb4 scheint das kleine, 5 kDa schwere, saure Protein auch extrazellulär an mehreren Schauplätzen involviert zu sein. Die gute Wasserlöslichkeit führt dazu, dass es schnell im Blutvolumen verteilt wird, sobald es aus Zellen austritt. In hohen Konzentrationen kommt es in Thrombozyten vor, die dieses bei Aktivierung abgeben. Im Gerinnungsgeschehen werden Fibrinmonomere durch den Faktor XIIIa (Transglutaminase) unter Mithilfe von Tb4 zu Fibrin-Polymeren zusammengelagert. Vielfach wurde die anti-inflammatorische Wirkung von Tb4 in Studien beobachtet (Goldstein et al. 2005). Die lokale Anwendung des Proteins an Entzündungsherden, wie beispielsweise einem septischem Schock oder Hornhautverletzungen, senkt die Zahl der Entzündungszellen und inflammatorischen Chemo- und Zytokine (Badamchian et al. 2001, Sosne et al. 2001). In chronischen Wunden kommt beim Menschen Tb4 in einer Konzentration von 13 µg/ml im Wundwasser vor. Die Erklärung, dass das Protein aus lysierten Zellen, Thrombozyten und Leukozyten angeschwemmt wird, ist naheliegend. Vor Ort beschleunigt Tb4 die Wundheilung: Vermehrte Angiogenese, Migration von Keratinozyten, vermehrte Matrix-

Metalloproteasen-Produktion, Kollagendeposition und Wundkontraktion wurden von Malinda et al. (1999) im „verwundete-Ratte-Modell“ beobachtet. Auch in Hypoxie-bedingten Gewebeschäden wie Schlaganfall oder Herzinfarkt kann Tb4 eine verbesserte und schnellere Heilung herbeiführen, indem es die Kardiomyozyten vor Zelltod schützt und die Narbenbildung vermindert. Als Mechanismen wurde dafür von Bock-Marquette et al. (2004) die Hochregulation eines Signalweges postuliert, des *Particularly Interesting New Cys-His protein (PINCH)-Integrin-linked kinase (ILK)-Akt (Protein Kinase B)*-Weges. Dabei formt Tb4 einen Komplex mit PINCH und ILK, was zur Aktivierung von Akt führt, die als „Überlebenskinase“ gilt. Ein anderer kardioprotektiver Wirkmechanismus wurde von Smart et al. (2007a) beschrieben, der die von Tb4 parakrin vermittelte Stimulation epikardialer Zellen zur Migration und Differenzierung zu Endothel- und glatten Muskelzellen umfasst. Dabei bilden diese ein Koronargefäßnetz, welches das Überleben der Herzmuskelzellen verbessert. Bisher ist kein Tb4-Rezeptor an der Zelloberfläche bekannt. Diese Mechanismen sowie zahlreiche andere sprechen für ein noch weiter gefächertes Funktionsgebiet des Thymosins, unter anderem als Transkriptionsfaktor. Zusammenfassend kann Tb4 als ein Protein von physiologisch großer Bedeutung und vielversprechenden Einsatzmöglichkeiten in der Therapie von chronischen Wunden, Hornhautverletzungen und Ischämie-bedingten Gewebeschäden gelten.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

EHTs können als Gewebeersatz zu Implantationszwecken eingesetzt werden (Zimmermann et al. 2006). Eines der größten Hindernisse dieser Anwendung ist der Bedarf eines perfundierten Gefäßnetzes in dem Implantat (Eschenhagen and Zimmermann 2005). An der Lösung dieses Problems setzt die vorliegende Arbeit an. Einerseits wurden in nativen EHTs mittels CD31 Immunfluoreszenzfärbungen Endothelzellstränge gefunden, die sich zu einem Netz arrangiert haben. Andererseits enthalten EHT-Präparate, die auf Rattenherzen implantiert waren, perfundierte Gefäße (Zimmermann et al. 2006). Dies führt zu der Frage, ob die einwachsenden Gefäße Anschluss an diese präexistierenden Endothelzellstränge im EHT finden oder ein unabhängiges Netz bilden.

Da die CAM als ein offenes *in vivo* Angiogenese-Modell die direkte Beobachtung des Gefäßwachstums ermöglicht, war das Ziel dieser Arbeit, EHTs auf die CAM zu

implantieren. Die Offenheit dieses Systems stellt aus diesem Grund einen Vorteil gegenüber inneren Transplantationen dar. Anschließende Struktur- und Genexpressionsanalysen des EHTs geben Aufschluss über Gefäßeinsprossungen von der CAM in das EHT sowie das Expressionsniveau von Angiogenese-bezogenen Faktoren. Die Beobachtung der EHT-Entwicklung auf der Gefäßhaut sollte mit einer Zeitraffer-Videoaufnahme aufgenommen werden.

Die oben genannten kardioprotektiven und Angiogenese-fördernden Effekte von Tb4 suggerierten die Testung von Tb4-vermittelten Effekten auf die Kontraktionskraft und Struktur von EHTs sowie die Entwicklung von Tb4-behandelten EHTs auf der CAM.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit lässt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Untersuchung des präexistierenden Gefäßnetzes in EHTs
2. Vergleich von Kollagen und Fibrin als extrazelluläre Matrices auf die EHT-Struktur, Kontraktionskraft und Genexpression
3. Untersuchung des Effektes von Tb4 auf die EHT-Struktur, Kontraktionskraft und Genexpression
4. Etablierung des CAM Assays
5. Strukturelle Charakterisierung der CAM
6. Positivtestung der Induzierbarkeit von gerichtetem Gefäßwachstum in der CAM
7. Entwicklung eines Modells zur EHT-Kultivierung auf der CAM
8. Morphologische Analyse von EHTs nach Kultivierung auf der CAM mittels Paraffin-Histologie und Immunfluoreszenzfärbungen
9. Expressionsanalysen von angiogenetischen Faktoren, kardialen Markern und Endothelzellmarkern in den EHTs vor und nach Inkubation auf der CAM

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Männliche und weibliche Wistar-Ratten aus Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff®) und Leitungswasser gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neugeborene (1.-3. Tag nach Geburt) Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #238).

2.2 Zellpräparation

2.2.1 Organentnahme

Die Tiere wurden dekapitiert und sternotomiert. Nach Spreizung der Thoraxwand wurde das Herz mit dem Gefäßstiel komplett entnommen und umgehend in eine Schale mit sterilem, eisgekühltem kalzium- und bikarbonatfreiem Hanks Puffer mit [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure], kurz HEPES (CBFHH) überführt.

2.2.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss

Nach der Entnahme der Herzen erfolgten die Zellpräparation, Herstellung der EHTs und die anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) wurde vor jeder Präparation autoklaviert.

Nach Säuberung der Herzen und Abtrennung des Gefäßstiels sowie der Vorhöfe wurden die Herzen in der Mitte zweigeteilt und in eine neue Kulturschale mit steriler, eisgekühlter CBFHH-Lösung transferiert. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen in einem Gesamtvolumen von ca. 2 ml CBFHH mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von kleiner als 1 mm^3 zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der zerkleinerten Gewebstücke in ein 50 ml Sammelgefäß. Nach weiterem dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH und Verwerfen des jeweiligen Überstandes wurde anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit

Trypsin/DNase nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) durchgeführt.

Der Beginn des Verdau erfolgte durch Zugabe von 7 ml (bei etwa 30 Herzen) Trypsin-Arbeitslösung für 10 Minuten. Die Inkubation der Gewebestücke mit der Trypsin-Arbeitslösung erfolgte jeweils bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min). Nach der Sedimentation der Gewebestücke wurde der trübe Überstand verworfen. Die Gewebestücke wurden in 7 ml Trypsin-Arbeitslösung resuspendiert und bis zur Trübung der Suspension, jedoch maximal 90 Sekunden, inkubiert und sedimentiert. Danach wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml Sammelgefäß, das 5 ml aktives fetales Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung des Trypsins enthielt, überführt und auf Eis gelagert. Nach den ersten Verdauerschritten kann das Abpipettieren von Überstand jedoch schwer sein, ohne dabei Gewebestücke mitzunehmen. Durch die systematische Anwendung von DNase wurde die Viskosität der Lösung vermindert und ein komplettes Abpipettieren des Überstandes möglich. Dazu wurden die Gewebestücke mit 6 ml DNase-Arbeitslösung inkubiert und trituriert (25-30x; weitlumige Pipette). Der Überstand wurde anschließend ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Dieser Wechsel von Protein/DNA-Verdau und reinem DNA-Verdau wurde unter langsamer Reduktion der Arbeitslösungsvolumina durchgeführt. Dabei wurde bei jedem Wechsel des Sammelgefäßes die Arbeitslösungsmenge um 0,5 ml reduziert, bis die Mindestmenge von 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung) erreicht wurde. Die Dauer der weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung richtete sich nach der Trübung des Überstandes. Die Trübung des Überstandes trat abhängig von der jeweiligen Trypsin-Charge nach unterschiedlich langer Inkubationszeit ein. Da dies ein kritischer Punkt ist und eine zu starke Trübung auf einen Überverdau hindeutet, sollte genau auf Trübung geachtet werden. In den ersten 15-20 Inkubationsschritten trat die Trübung nach wenigen Sekunden ein, später erst nach wenigen Minuten. Der Verdau wurde durchgeführt, bis die Gewebestücke nahezu vollständig aufgelöst waren. Der komplette Verdau dauerte im Mittel vier Stunden. Sobald ein Sammelgefäß vollständig gefüllt war, wurde es unmittelbar in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Der klare Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in

den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gelagert.

Sobald alle Sammelgefäße gefüllt, zentrifugiert und die pelletierten Zellen in NKM resuspendiert waren, wurden die Zellsuspensionen in einem sterilen 50 ml Sammelgefäß gepoolt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml NKM gespült und auch diese Volumina zusammen mit der Zellsuspension gepoolt. Das Sammelvolumen wurde schließlich mit DNase-Stammlösung versetzt (0,8% des Gesamtvolumens) und 25-30x mit einer weitlumigen Pipette trituriert. Die Wirkung der DNase entfaltet sich besser, wenn man das Sammelgefäß für 2 min bei 37°C in einem Wärmeschrank inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4°C) des Sammelgefäßes und nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml NKM aufgenommen und resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann durch ein mit NKM vorgespültes Zellsieb (Maschengröße 100 µm) filtriert und das Sammelgefäß sowie das Zellsieb mit jeweils 2 ml NKM gespült. Nach einer 1:20 Verdünnung der Zellen und Färbung mit Trypanblau (150 µl Trypanblau, 800 µl NKM, 50 µl Zellsuspension) wurde die Anzahl der vitalen, ungefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dann direkt für die Herstellung von EHTs verwendet.

2.3 Herstellung und Optimierung von rekonstituiertem Herzgewebe (*Engineered Heart Tissue*; EHT) von neonatalen Rattenherzen

2.3.1 Herstellung und Gehaltsbestimmung von Kollagen Typ I

Sechs Schwänze ausgewachsener Wistar-Ratten wurden von den Kadavern abgetrennt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Vor der Kollagenpräparation wurden die Rattenschwänze aufgetaut und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die Durchführung der gesamten Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Inzision in der Längsachse des Schwanzes wurde die Haut mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette entfernt. Danach konnten die bindegewebigen, Kollagen-Typ-I-Fasern enthaltenden Sehnen, die den Wirbelknochen aufliegen, an der Schwanzbasis beginnend mit einer Pinzette abgezogen werden. Die Sehnenfäden wurden in einer Schale mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gesammelt. Nach Überführung und gleichmäßiger Verteilung der Kollagen-haltigen

Sehnenfäden in 500 ml Glasgefäße erfolgte die Zugabe von jeweils 300 ml Essigsäure (0,1% in *Aqua ad iniectabilia*). Unter kontinuierlichem Rühren bei 4°C über mehrere Tage wurden die Sehnenfäden fast vollständig aufgelöst und anschließend in Zentrifugengefäße überführt. Nach Zentrifugation (20.000 g, 2 h, 4°C) zur Abtrennung von nicht gelösten Geweberesten wurde der Kollagen-haltige Überstand gesammelt. Durch die langsame Zugabe einer eisgekühlten NaCl-Lösung (25%) wurde die Salzkonzentration in der Suspension unter ständigem Rühren auf 4% angehoben und damit das Kollagen ausgefällt. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde die Suspension erneut zentrifugiert (20.000 g, 30 min, 4°C). Die Überstände wurden anschließend verworfen und die Pellets in jeweils 250 ml kalter Essigsäure (0,1%) aufgenommen. Die Lösung der Pellets erfolgte durch Rühren über Nacht bei 4°C. Durch zweimalige Dialyse gegen Essigsäure (0,1%) wurde der NaCl-Gehalt in der Kollagensuspension reduziert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Lösen des Kollagens in 0,003% SDS bei 95°C und anschließender photometrischer Bestimmung nach der Methode von Bradford (1976).

2.3.2 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

120 angebrütete Eier (7.-9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Schalen wurden am stumpfen Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und die Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen. Nach Dekapitation wurden Köpfe und Körper in einer 500 ml Flaschen mit 300 ml eisgekühltem CBFHH + 4% Penicillin/Streptomycin gesammelt. Dies wurde auf 600 ml mit CBFHH aufgefüllt und homogenisiert (Polytron® Homogenisator; 6 x 15 sec bei Stufe 11). Nach Verteilung der Embryonen auf insgesamt 4 konische Reaktionsgefäße (150 ml) wurden diese zentrifugiert (60 g, 15 min, 4°C). Nach Abnehmen und Sammeln der Überstände wurden die Pellets gepoolt, mit CBFHH auf 300 ml aufgefüllt und erneut homogenisiert (6 x 15 sec bei Stufe 11, 3 x 5 sec bei Stufe 20). Nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4°C) und Poolen aller Überstände wurde der Hühnerembryonenextrakt in Aliquots à 14 ml bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Präparation mit 120 angebrüteten Eiern ergab durchschnittlich 500-600 ml Hühnerembryonenextrakt. Zum Ausschluss von mikrobieller Kontamination wurde eine Probe vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE untersucht.

2.3.3 Herstellung der Gussformen

Glaskulturschalen (\varnothing 6 cm) wurden mit Aceton gereinigt und entfettet. Silikonschläuche (\varnothing 3,5 mm) wurden mit Silikonkleber gefüllt und auf eine Länge von ca. 2 cm zugeschnitten. Je zwei dieser Silikondochte wurden auf den Boden der Glaskulturschalen geklebt. Nach dem Aushärten wurde die Höhe der Silikondochte auf etwa 80% der Schalenhöhe gekürzt. Anschließend wurden Teflonscheiben (\varnothing 16 mm, Höhe 5 mm) mit einem zentralen Loch (\varnothing 3,5 mm) mit Silikonfett eingerieben und als Platzhalter über die Dochte gestülpt. Die Glaskulturschalen wurden anschließend bis zu ca. 1/3 ihrer Höhe mit Silikon ausgegossen. Nach Aushärten des Silikons (Dauer ca. 2 Wochen) wurden die Teflonscheiben vorsichtig entfernt und die Gussformen intensiv ausgekocht. Vor der Verwendung als Gussform wurden hohle Teflonzylinder (Außendurchmesser 8 mm, Innendurchmesser 3,5 mm, Höhe 1,7 cm) auf die Silikondochte gesteckt, so dass 2 ringförmige Mulden (Außendurchmesser 16 mm, Innendurchmesser 8 mm) mit einem Fassungsvermögen von je $\sim 750 \mu\text{l}$ entstanden. Gussformen und Teflonzylinder wurden vor Gebrauch ausgekocht, zusammengesteckt autoklaviert und bis zu ihrer weiteren Verwendung steril gelagert. Abbildung 7 zeigt die schematische Darstellung einer Kulturschale.

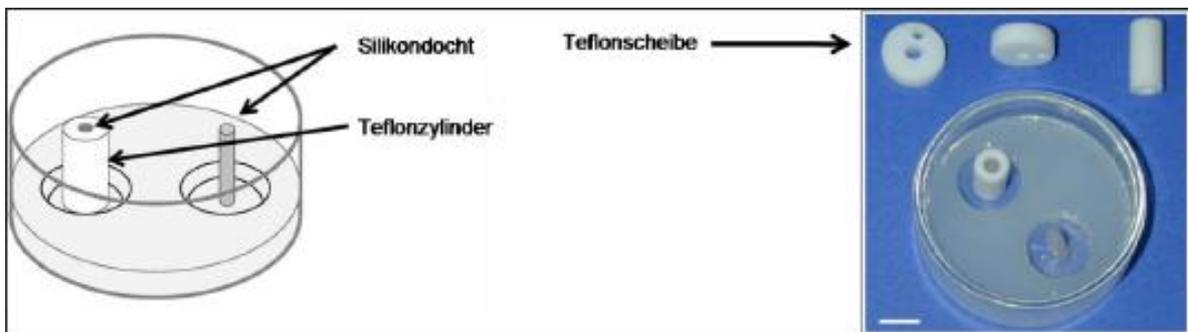


Abbildung 7: Schemazeichnung und Zusammensetzung einer Gussform
Skalierungsbalken 10 mm

2.3.4 Herstellung von EHTs

2.3.4.1 EHTs mit Kollagen-Hydrogelmatrix

Zur Herstellung der EHTs wurde zunächst die Zellsuspension aus dem enzymatischen Gewebeaufschluss auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt, indem entweder ein definiertes Volumen NKM zugegeben, oder nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4°C) Überstand abgenommen wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des eingesetzten Kollagen/Matrigel-Gemisch zu verhindern. Die Zugabe der Bestandteile erfolgte immer in der gleichen Reihenfolge. Die gewünschte Menge Kollagen Typ I wurde vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem, mit Serum supplementierten DMEM (2x EHT-Medium) vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemisches wurde mit NaOH (0,1 mol/l, 170 µl pro 780 µl Kollagen) neutralisiert. Die Zugabe von Matrigel erfolgte anschließend, vor der Vermengung mit der volumenangepassten Zellsuspension. Nach behutsamer Vermengung des Kollagen-Zell-Gemisches, wurde je 900 µl zügig in die autoklavierten Gussformen pipettiert. Durch das geringere Fassungsvermögen der Gussformen (ca. 750 µl) ergab sich ein Überschuß von 150 µl, der sich durch die Oberflächenspannung leicht konvex aufwölbte. Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert, um eine leichte Aushärtung des Kollagen-Zell-Gemisches zu erreichen. Nachfolgend wurde jede Kulturschale mit je 2 EHTs vorsichtig mit 6 ml EHT Medium überschichtet (siehe Abb. 8).

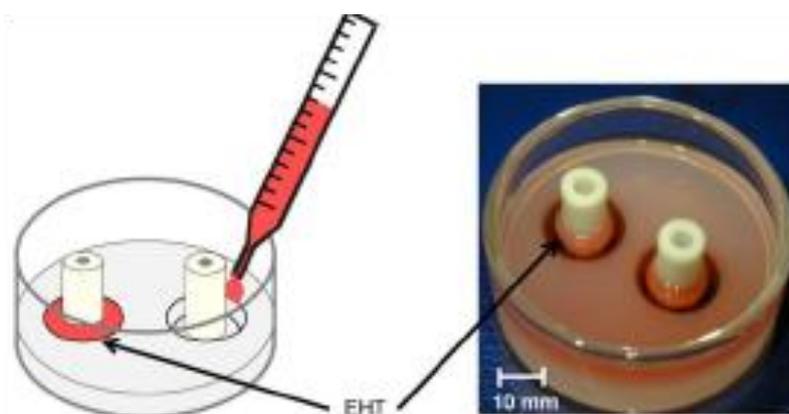


Abbildung 8: Gießprozess an Tag null und Fotografie einer Gussform mit Kollagen-EHTs am sechsten Kulturtag

Kollagen (4,2 mg/ml)	847 µl	→ 0,8 mg/EHT
2x EHT Medium	1031 µl	

NaOH (0,1 mol/l)	184 µl	
Extrazelluläre Matrix	400 µl	→ 10%
Zellsuspension ($6,50 \cdot 10^6$ Zellen/ml)	1538 µl	→ $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/EHT

Das eingesetzte Volumen des Kollagens wurde dem Gehalt der jeweiligen Charge so angepasst, dass 0,8 mg pro EHT eingesetzt wurden. Das Volumen des Mediums und die NaOH-Mengen wurden dementsprechend angepasst. Die Zellkonzentration wurde so eingestellt, dass 900 µl der EHT-Mischung $2,5 \cdot 10^6$ Zellen enthielten. Aufgrund der Viskosität der Mischung musste ein Pipettierverlust von 100 µl pro EHT einkalkuliert werden. Deshalb wurden mit einem Ansatz von 4 ml 4 EHTs mit einem Volumen von jeweils 900 µl hergestellt.

2.3.4.2 EHTs mit Fibrin-Hydrogel

Die Herstellung der Fibrin-EHTs wurde ähnlich durchgeführt wie die der Kollagenhaltigen EHTs. Die Ansätze unterschieden sich in folgenden Punkten: i) für Fibrin-EHTs wurde die 1,5x Menge an Zellen eingesetzt, also $3,7 \cdot 10^6$ Zellen pro EHT. ii) Anstelle von Kollagen war Fibrin der Hauptmatrixbestandteil. Dieses wurde in Form von Fibrinogen hinzugegeben und durch Thrombin gespalten. iii) Dadurch entfiel der Neutralisierungsschritt mit NaOH. iv) Die im Gegensatz zum Kollagen geringere Menge Fibrinogen und Thrombin wird mit NKM ersetzt. v) Die Pipettierreihenfolge wurde den Zusätzen entsprechend angepasst. Zunächst wurde die Zellkonzentration durch Zugabe von NKM oder durch Zentrifugation (60g, 15 min, 4°C) eingestellt und mit zweifach konzentriertem, mit Serum supplementierten DMEM (2x EHT-Medium) und Matrigel versetzt. Mit Aprotinin versetztes Fibrinogen (200 mg/ml Fibrinogen + 20 µg Aprotinin) wurde hinzugefügt und durch Kippen des Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension vermischt, bis die Flüssigkeit homogen war. Dabei ließ sich die richtige Menge Fibrinogen am besten pipettieren, wenn die Substanz handwarm und wenig viskös war. Thrombin wurde zuletzt hinzugefügt, um vorzeitiges Gerinnen des Ansatzes zu verhindern. Nach wiederholtem Triturieren des Fibrinogen-Thrombin-Zell-Gemisches wurde je 900 µl zügig in die autoklavierten Gussformen pipettiert. Schnelles Arbeiten war wichtig, damit die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin nicht vor dem Gießen geschieht. Die Kulturschalen wurden genau wie die Kollagen-EHTs für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert und anschließend mit 6 ml EHT-Medium überschichtet, welches 200 µg Aprotinin enthielt.

Dieses verhindert eine Spaltung des Fibrins durch im EHT-Medium vorkommendes Plasmin.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier Fibrin-EHTs

Zellsuspension ($6,50 \cdot 10^6$ Zellen/ml)	2277 μ l	→ $3,7 \cdot 10^6$ Zellen/EHT
Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM)	791 μ l	
2x EHT Medium	224 μ l	
Extrazelluläre Matrix	400 μ l	→ 10%
Fibrinogen (200mg/ml+20 μ g Aprotinin)	102 μ l	→ 5,1 mg/EHT
Thrombin (100U/ml)	120 μ l	→ 3 U/EHT

Aufgrund der Viskosität der Mischung musste ebenfalls ein Pipettierverlust von 100 μ l pro EHT einkalkuliert werden. Deshalb wurden mit einem Ansatz von 4 ml 4 EHTs mit einem Volumen von jeweils 900 μ l hergestellt.

2.3.5 Kultivierung der EHTs

Die Kultivierung der EHTs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank. Das Kulturmedium wurde am ersten, dritten und fünften Tag nach der Herstellung nach mikroskopischer Kontrolle der Kardiomyozyten gewechselt, wobei die Kollagen-EHTs EHT-Medium und die Fibrin-EHTs Aprotinin-haltiges EHT-Medium bekamen. Am dritten bis vierten Tag nach der Herstellung begannen die EHTs kohärent zu schlagen. Da Dehnung die Differenzierung und Kontraktilität der EHTs verbessert (Fink et al. 2000), wurden die EHTs am Tag sieben in eine mit einem Elektromotor betriebene Dehnapparatur transferiert (siehe Abb. 9). Die Ruhelage im Dehnapparat entsprach 90% der Gesamtlänge der EHTs, die Dehnung erfolgte phasisch um weitere 10% mit einer Frequenz von 1 Hz am Tag sieben und mit einer Frequenz von 2 Hz ab Tag 8. Nach Transferierung in die Dehnapparatur erfolgte der Wechsel des Kulturmediums jeden zweiten Tag. Die Gesamtkulturdauer betrug 12 Tage.

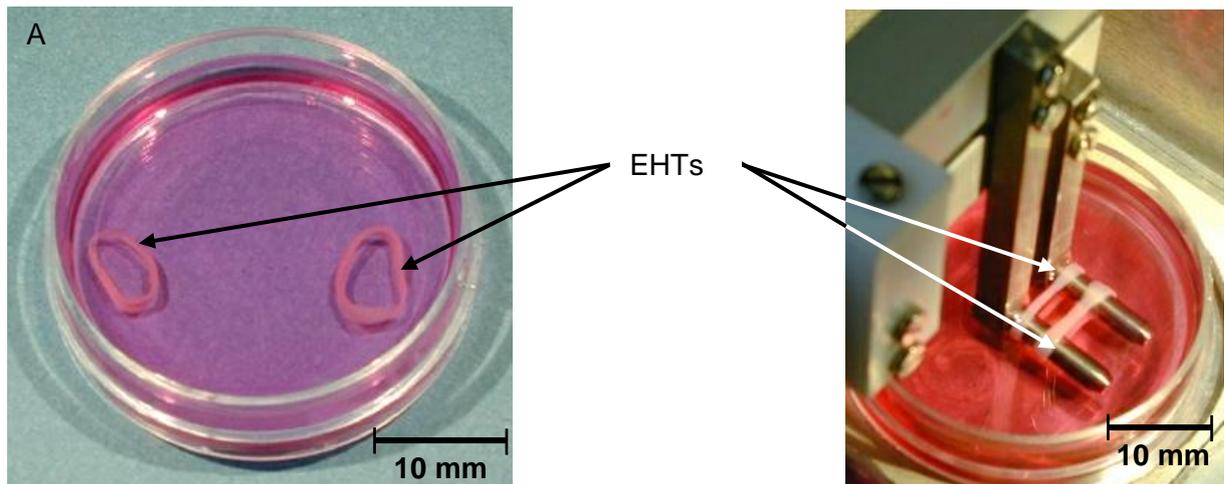


Abbildung 9: Kollagen-EHTs

A: EHTs nach Abnehmen von den Teflonzylindern am Tag 7 B: EHTs nach dem Transfer auf die Dehnapparatur (Tag 8)

2.3.6 Behandlung der Fibrin-EHTs mit Tb4

Zur Testung des Effektes von Tb4 auf EHTs wurde das Peptid in einer Konzentration von 100 ng/ml (Bock-Marquette et al. 2004, Smart et al. 2007a) zum EHT-Medium hinzugefügt.

2.3.7 Qualitätsprüfung mittels isometrische Kontraktionskraftmessung

An Kulturtag 12 wurden die Kontraktionsparameter der EHTs in modifizierter Tyrode-Lösung in temperierten (37°C) Standardorganbädern (siehe Abb. 10) unter isometrischen Bedingungen ermittelt. Die Aufhängung der EHTs erfolgte zwischen einem induktiven Kraftaufnehmer und einer statischen Halterung in Organbädern mit Tyrode-Lösung bei L_0 (ohne Vordehnung, entsprechend der Länge des Abstandshalters während der Kultur). Der Kalziumgehalt der Tyrode wurde durch Zugabe von Calciumchlorid-Stamm auf 1,0 mmol/l angepasst. Nach dem Aufhängen wurden die EHTs für 30 min ohne elektrische Stimulation äquilibriert. Im Folgenden wurden die Kontraktionsexperimente unter elektrischer Stimulation (Pulsfrequenz 2 Hz, Pulsdauer 5 ms, Pulsintensität 120-160 mA, 20% über der Reizschwelle) bei 37°C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) zur pH-Einstellung (pH 7,4) durchgeführt. Nach dem Einschalten der elektrischen Stimulation wurde die Vordehnung in Schritten von 0,2 mm von L_0 auf L_{max} gesteigert, um den Frank-Starling-Mechanismus auszulösen. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung abgelassen und das Kalzium durch zweimaligen Wechsel der

Tyrode-Lösung mit 0,2 mmol/l Kalzium ausgewaschen. Nach dem Erreichen eines *Steady-State* (nach $\sim 2 \times 15$ min) wurden kumulative Konzentrations-Wirkungskurven für Kalzium (0,2-2,4 mmol/l) ermittelt. Je nach weiterer Verarbeitung wurde entweder die Kalziumkonzentration zur Implantation auf die CAM auf einen physiologischen Wert eingestellt oder das EHT für histologische Analysen in Formalin (Histofix) (Kap. 2.5) bzw. für RNA-Extraktion in Lysis-Puffer (Kap. 2.6.1) aufgenommen. Die Einstellung der Kalzium-Konzentration wurde durch zweimaligen Wechsel der Tyrode-Lösung und anschließender Einstellung auf 2,0 mmol/l ausgeführt.

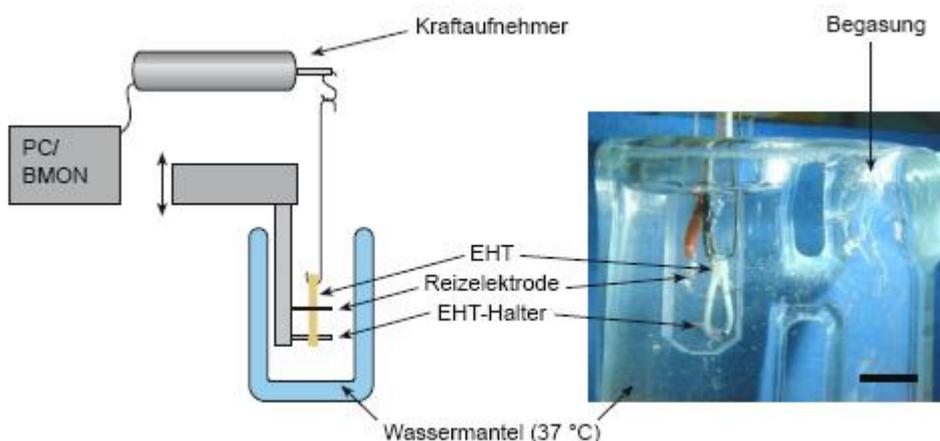


Abbildung 10: Isometrisches Kontraktionsexperiment

EHTs wurden zwischen einem Haltedraht und einem induktiven Kraftaufnehmer gespannt und elektrisch stimuliert. Maßstabsbalken: 1 cm

Die Erfassung der Kontraktionsdaten erfolgte mittels eines PC-gestützten Biomonitoring-Systems (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Die Messverstärker wurden vor jedem Versuch mit einem Gewicht von 100 mg kalibriert. Die Messsoftware ermittelt die minimale Kraft (Grundspannung) und die maximale Kraft jeweils als Mittel von vier Einzelkontraktionen. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler und minimaler Kraft bestimmt.

2.4 Chorioallantoismembran-Assay

2.4.1 Präparation der Chorioallantoismembran

Die Präparation des CAM-Assays erfolgte modifiziert nach Ribatti et al. (2006) und Auerbach et al. (1974).

Vier Tage lang wurden befruchtete Eier des Leghorn Huhns (Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) in einem Inkubator bei 37°C und 60% Luftfeuchtigkeit unter regelmäßiger Rotation (jede sechste Stunde um 25°) auf der Längsseite liegend bebrütet.

Am vierten Tag erfolgten die Öffnung der Eier am stumpferen Pol und die Freilegung der CAM. Zunächst wurden die Hühnereier durch Abreiben mit 0,275 %-igem Formaldehyd und anschließend mit Betaisodona-Lösung desinfiziert. Vor der Öffnung standen die Eier für ~ 10 min mit dem stumpferen Pol nach oben gerichtet. Die folgenden Schritte wurden unter einer sterilen Werkbank mit autoklavierten Instrumenten durchgeführt. Mit einer 25 G Subkutannadel, angeschlossen an eine 2 ml Spritze, wurden 1-2 ml des Eiweißes aus dem spitzeren Pol herausgesaugt. Dies ermöglichte anschließend ein leichteres Abtrennen der inneren Eihaut von der CAM, da sich zwischen Eihaut und CAM Luftbläschen ansammeln. Am stumpferen Pol, wo sich eine Luftkammer zwischen innerer und äußerer Eihaut befindet, wurde nun die Schale mit einem spitzen Messer eingestochen und von der Einstichstelle ausgehend die Eischale mit einer Pinzette entfernt, so dass der Durchmesser der Öffnung ca. 3 cm beträgt. Nun ist die CAM nur noch von der inneren Eihaut bedeckt. Diese wurde mit einer spitzen Pinzette vorsichtig entfernt. Am besten gelang dies, indem man die Eihaut über einem der Luftbläschen anstach und in möglichst großen Fetzen von der CAM abzog.

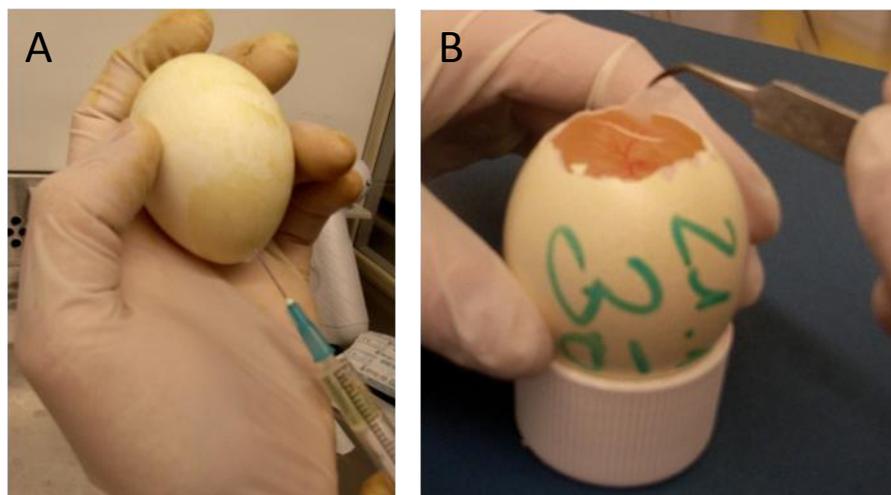


Abbildung 11: Präparation der Chorioallantois-Membran

A: Heraussaugen von Eiweiß mit einer 25 G Injektionsnadel. B: Entfernung der inneren Eihaut

beobachtet werden. Abgedeckt mit dem Boden einer Zellkulturschale (\varnothing 3 cm) lagerten die Eier für weitere vier Tage in den für diesen zweiten Inkubationsschritt vorgesehenen Inkubator (siehe Abb. 12; Kap. 2.4.2). Eine frühzeitige Öffnung der CAM ist aus technischen Gründen einfacher. Zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 6-8) ließ sich die Eihaut nicht gut von der Membran abziehen und es kam zu Beschädigungen der Membran. Dies mag daran liegen, dass die Ausbildung der CAM erst am vierten Tag beginnt und zu dem Zeitpunkt der Öffnung noch nicht so stark mit der Eihaut verwachsen ist. Steriles Arbeiten und die anschließende Inkubation der Hühnereier sind eingeschränkt nötig. Hühnereiweiß enthält große Mengen Lysozym, welches die bakterielle Zellwand schnell zerstört und langsam auch die Chitin-haltige Zellwand von Pilzen. Es sei darauf hingewiesen, dass bis zum achten Tag der Bebrütung, dem Tag, an dem die Implantation erfolgt, ca. ein Drittel der Hühnerembryonen starben. Als Ursache hierfür sind genetische Defekte und Fehlbildungen wahrscheinlich.

2.4.2 Inkubationsbedingungen und -dokumentation

Im eröffneten Zustand werden die Hühnereier aufrecht in einem Eierbecher positioniert bei 37°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit bebrütet. Der Hühnereiinkubator ist in Abbildung 12 dargestellt.

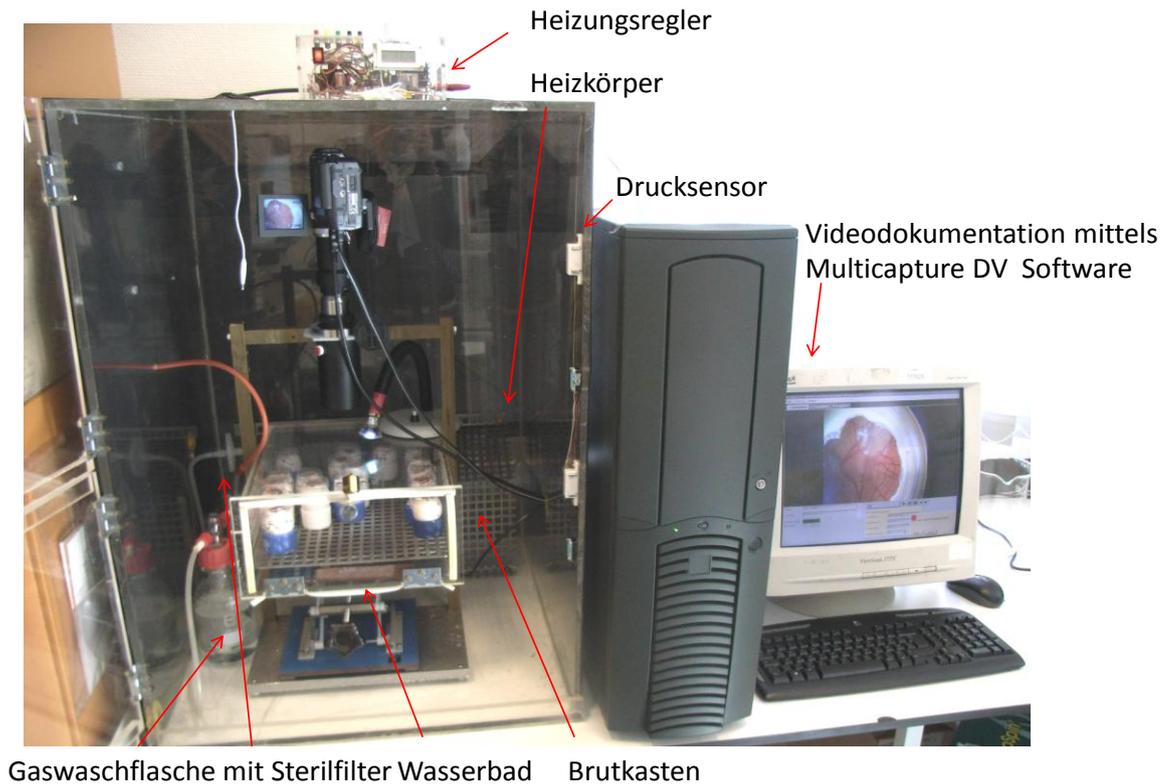


Abbildung 12: Hühnereiinkubator mit Videodokumentation

Die Eier waren in einem 33 x 27 x 13 cm großem Brutkasten aus Plexiglas auf einem Metallgitter plaziert. Unter dem Gitter befand sich ein Wasserbad, so dass sich eine gesättigte Luftfeuchtigkeit einstellte. Der Brutkasten stand in einem 1,5 x 1,0 x 0,5 m großen Plexiglasschrank, an dessen Hinterwand ein Heizkörper befestigt war, dessen Temperatur durch einen Regler eingestellt werden konnte. Durch einen Drucksensor am Türrahmen heizte der Ofen nur, wenn der Schrank verschlossen war. Eine Luftpumpe pumpte Raumluft über einen Schlauch in eine Gaswaschflasche. Die angefeuchtete Luft wurde über Silikonschläuche und einen Sterilfilter in den Brutkasten geleitet. Auf der gegenüberliegenden Seite des Brutkastens befand sich ein Loch in der Plexiglaswand, so dass die Luft zirkulieren konnte. Von außen war der Hühnereiinkubator mit schwarzer Folie bedeckt, so dass die Hühnereier im Dunkeln inkubiert wurden. Die Entwicklung des EHTs auf der CAM wurde durch eine Zeitraffer-Videoaufnahme dokumentiert. Eine Kombination aus Videokamera (Sony Handycam DCR-PC330) und Objektiv war an einen Rechner angeschlossen. Die Camera wurde von der Multicapture DV Software (SuH-EDV-Systeme, Oldenburg) gesteuert. Die Software ermöglichte die Programmierung der

Zeitrafferaufnahmen. Die vielen Einzelaufnahmen wurden anschließend mit Hilfe des *Windows Movie Makers* (Microsoft) zu einem Film zusammengefügt. Die für die Videoaufnahmen benötigte Beleuchtung kam von einer Halogenlampe (12V).

2.4.3 EHT-Kultivierung auf der Chorioallantoismembran

Die Kultivierung der EHTs auf der CAM erfolgte vom 12.-16. Tag der EHT-Entwicklung und vom 8.-12. Tag der CAM Entwicklung in dem für die Hühner-Bebrütung vorgesehenen Brutschrank. EHTs wurden auf eine neun Tage alte Membran überführt, wenn der Hühnerembryo innerhalb der ersten 24 Stunden der Kokultivierung starb. EHTs von am zweiten oder dritten Tag verstorbenen Embryonen wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Wenn der Embryo innerhalb der letzten 24 Stunden des Beobachtungszeitraumes starb, wurde das EHT dennoch explantiert und analysiert.

2.4.3.1 Implantation des EHTs auf die CAM

In einer Medium-enthaltenden Kulturschale wurde das EHT auf den Ringstretcher (siehe Abb. 20) überführt: Mit zwei Pinzetten wurde der Silikonring so gebogen, dass sich die gegenüberliegenden Häkchen annäherten. Nun konnte das EHT mittels einer Pipettenspitze an beiden Häkchen aufgehängt werden. Durch langsames Nachlassen der Biegung wurde der Silikonring wieder in seine ursprüngliche Position gebracht. Das EHT war nun gut gespannt und konnte an geeigneter Stelle auf die CAM gelegt werden. Eine geeignete Stelle war dadurch gekennzeichnet, dass dort möglichst keine größeren Gefäße verliefen, die durch das Gewicht des Stretchers komprimiert wurden. Vorher wurde die CAM vorsichtig mit der Klinge eines Skalpell berührt, so dass sie leichte Anzeichen von Irritation zeigt wie kleine Mengen austretenden Blutes.

2.4.3.2 Aufbau des Ringstretchers

Ein 1,5 mm dicker Silikonschlauch wurde mit einem 0,4 mm dicken, in dem Lumen des Silikonschlauchs verlaufenden VA-Draht gestärkt. Dieser Schlauch mit integriertem Draht wurde zu einem Ring mit 3 cm Durchmesser formiert, indem überstehende Enden des Drahtes gebogen und ineinander gehakt wurden. An gegenüberliegenden Stellen des Rings wurden Häkchen aus VA-Draht durch einen simplen Einstich in das Silikon an dem Ring so befestigt, dass sie sich im

Kreisinneren opponierten um künftig das EHT zu spannen. Sie sind so gebogen, dass sie leicht nach unten (zur CAM) führten und dann wieder nach oben, so dass das EHT an den Häkchen aufgespannt direkten Kontakt zur Membran hatte, aber nicht nach oben abzurutschen drohte. Der Abstand der Häkchen zueinander betrug 14 mm. Der biegsame VA-Draht ermöglichte eine Aufnahme des EHTs, ohne dass dieses zerriss. In Abbildung 20 ist die Struktur des Ringstretchers dargestellt.

2.4.3.3 Explantation des EHTs

Nach viertägiger Kokultur wurde mit einer Schere unmittelbar um das auf den Stretcher aufgespannte EHT ein Teil der CAM ausgeschnitten. Das EHT wurde von den Stretcherhäkchen abgestreift und mit der anhaftenden CAM in PBS überführt. Anschließend wurden die Explantate zur histologischen oder molekularbiologischen Untersuchung weiter verarbeitet. Zur Untersuchung der nativen CAM-Struktur ohne implantiertes EHT wurde ein $\sim 3 \text{ cm}^2$ großer Bereich der Membran mit einer Schere ausgeschnitten, in PBS kurz gewaschen und dann für eine Stunde in Formalin (Histofix) fixiert.

2.4.4 Positivkontrolle der Induzierbarkeit von Gefäßwachstum auf der Chorioallantoismembran

Um die Induzierbarkeit des Gefäßwachstums zu überprüfen, wurde eine Positivkontrolle modifiziert nach Ribatti et al. (2006) durchgeführt.

Auf die acht Tage alte CAM wurde ein 3 mm^3 großer Gelatineschwamm gelegt. Zuvor wurden entweder $2 \mu\text{g}$ FGF-2, 350 ng Tb4 oder unterschiedliche Konzentrationen VEGF-A ($0,5\text{-}3 \mu\text{g}$) in $3 \mu\text{l}$ PBS mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) oder in Wasser (Tb4 oder VEGF-A) gelöst. Das Lösungsmittel wurde nach Herstellerangaben des jeweiligen Proteins gewählt. Der durchnässte Schwamm wurde mit einer spitzen Pipette auf ein exponiertes und möglichst mittiges Areal der CAM niedergelegt. Direkt nach Applikation, 24 und 96 Stunden später wurde der Schwamm mit der umgebenden CAM durch ein Stereomikroskop beurteilt und mittels der AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss) und zugehöriger Axioplan Software fotografiert. Zur mikroskopischen Untersuchung wurde der Schwamm mitsamt der umgebenden CAM als ca. $1,5 \text{ cm}$ durchmessendes Explantat mit einer Schere herausgeschnitten, in Formalin (Histofix) für 8 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ fixiert und

anschließend 4 Stunden in TBS mit 3-maligem Wechsel der Lösung gewaschen. Die Gewebeaufbereitung erfolgte durch zwei Methoden: Azanfärbung von 4 µm dicken Paraffinschnitten und Immunfluoreszenzfärbung von 10 µm dicken Kryoschnitten. Für letztes wurden die Präparate mit Hilfe von Einbettungsgefäßen in Einbettungsmedium (Tissue Tec) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur Schnitthanfertigung am Kryotom wurden die Einbettungsgefäße mitsamt Gewebe bei -20 °C gelagert.

2.5 Histologische Strukturanalysen

2.5.1 Lichtmikroskopie

Morphologische Analysen wurden mit einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop durchgeführt und mit einer AxioCamHr Digitalkamera (Zeiss) dokumentiert. In manchen Präparaten wurden Technik-bedingte Mängel wie kleine Falten im Paraffinschnitt mit gängiger Bildbearbeitungssoftware (Adobe Photoshop CS; Adobe Systems; München) verbessert, ohne dass dabei der Inhalt des Bildes verändert wurde.

2.5.1.1 Paraffineinbettung

Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden die EHT-Explantate sowie die nativen EHTs über Nacht und die nativen CAMs eine Stunde in Formalin (Histofix) bei 4°C fixiert und anschließend vier Stunden in TBS gespült. In einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe wurden die Gewebe entwässert, anschließend in Paraffinblöcke eingebettet, wie in Tabelle 2 genauer dargestellt. Nach dem Aushärten wurden die Paraffinblöcke bei 4°C gelagert. Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke für eine Stunde bei -20°C zur Verbesserung der Schnittqualität gehärtet. Mit einem Schlittenbahnmikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte in vertikaler und horizontaler Ebene angefertigt. Diese Schnitte wurden anschließend in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen. Die Schnitte trockneten über Nacht oder eine Stunde bei 37°C, bevor sie nach einer der im Folgenden tabellarisch dargestellten Färbeverfahren elektrochemisch angefärbt wurden.

Tabelle 2: Entwässerungsreihe

1.	70% Isopropanol	30 Min	RT
2.	80% Isopropanol	30 Min	RT
3.	96% Isopropanol I	30 Min	RT
4.	96% Isopropanol II	30 Min	RT
5.	100% Isopropanol I	30 Min	RT
6.	100% Isopropanol II	30 Min	RT
7.	100% Isopropanol III	15-30 Min	60°C
8.	Isopropanol/Histol 1:1	15-30 Min	60°C
9.	Paraffin I	15-30 Min	60°C
10.	Paraffin II	15-30 Min	60°C
11.	Paraffin III	15-30 Min	60°C
12.	Ausgießen mit Paraffin		60°C

2.5.1.2 Färbemethoden

2.5.1.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Diese Übersichtsfärbung besticht durch kurze Einwirkzeit und einfache Handhabung. Hämalaun ist eine Mischung aus Hämatoxylin und Alaun, die als positiv geladenes Molekül die Phosphorgruppen der Nukleinsäuren des Chromatin bindet, am besten in einem stark saurem Milieu. Hämalaun hat Indikatoreigenschaften, daher muss, um die blaue Farbe zu erzielen, mit Leitungswasser ein pH über 3 eingestellt werden. Der Fluoresceinfarbstoff Eosin färbt Cytoplasma, Bindegewebe und kollagene Fasern rot.

Tabelle 3: Färbeprotokoll H.-E.-Färbung.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt

1.	Histol I	15 min
2.	Histol II	15 min
3.	100% Ethanol	5 min
4.	100% Ethanol II	5 min
5.	96% Ethanol I	5 min
6.	96% Ethanol II	5 min
7.	80% Ethanol	5 min
8.	70% Ethanol	5 min

9.	Aqua dest.	5 min
10.	Hämalaunlösung	20 min
11.	Leitungswasser, fließend oder 1x wechseln	10 min
12.	Aqua dest.	Spülen
13.	Eosinlösung	10 min
14.	Aqua dest.	Spülen
15.	96% Ethanol I	Spülen
16.	96% Ethanol II	Spülen
17.	100% Ethanol I	Spülen
18.	100% Ethanol II	Spülen
19.	Histol	3-5 min
20.	Eindeckeln mit Roticlear®	

Azan-Färbung (nach Heidenhain):

Die Azanfärbung ist eine Trichromfärbung bestehend aus den Farbstoffen Azokarmin, Anilinblau und Orange G. Zellkerne werden rot, Zytoplasma rötlich, Muskelgewebe rot-orange und Bindegewebsfasern blau gefärbt. Zunächst wird der Kern mit einem sauren Farbstoff (Azokarmin) angefärbt, dabei geht man davon aus, dass es zu einer Adsorption des Farbstoffes an die basischen Proteine in Form von Protaminen und Histonen kommt. Das Gewebe wird zunächst überfärbt, der Überschuss wird anschließend durch den Anilinalkohol entfernt, ein Vorgang, der Differenzierung genannt wird und typisch für regressive Färbungen ist. Auf die Kernfärbung folgt eine Simultanbehandlung mit zwei sauren Farbstoffen, Anilinblau und Orange G, die sich physiko-chemisch prinzipiell voneinander unterscheiden. Das Orange G ist ein feindisperser Farbstoff, der in kurzer Zeit in feine Strukturmaschen, wie das Zytoplasma, eindringt. Anilinblau gehört mit seinem Triphenylmethangerüst zu den grobdispersen Stoffen und schafft es in der kurzen Zeit (max. zwei Minuten) nur, sich in die gröberen Strukturlücken des Kollagens einzulagern. Dabei wird hier der feindisperse Farbstoff farblich von dem grobdispersen überlagert. Vorher beizt die Phosphorwolframsäure das Gewebe, um die reagiblen Gruppen zur Verbindung mit dem Farbstoff freizusetzen. Die Färbung wird somit stabil. Die Färbung muss unter dem Abzug durchgeführt werden.

Tabelle 4: Färbeprotokoll Azan-Färbung

1.	Anilinalkohol	20 min	38°C
2.	Aqua dest.	Spülen	RT
3.	Azokarmin in Eisessig	10 min	56°C
4.	Aqua dest	Spülen	RT
5.	Anilinalkohol	bis Kerne sichtbar	RT
6.	Essigsaurer Alkohol	1 min	RT
7.	5% Phosphorwolframsäure	60 min	RT
8.	Aqua dest.	Spülen	RT
9.	Anilinblau-Orange G-Essigsäure	2-5 min	RT
10.	96% Ethanol	wenige Sekunden	RT
11.	100% Ethanol	Spülen	RT
12.	Xylol	Spülen	RT
13.	Eindeckeln in Roticlear		

2.5.2 Konfokale Lasermikroskopie

2.5.2.1 Technik

Die konfokale Lasermikroskopie diente zur Untersuchung von fixierten *whole-mount*-EHT-Präparaten sowie 150 µm Vibratomschnitten von Fibrin-EHTs. Im Gegensatz zu Kollagen-EHTs hatten Fibrin-EHTs nach der zwölf-tägigen Kultur einen größeren Durchmesser, da sie nicht kondensierten. Daher war die Mikroskopie von Fibrin-EHT-Vibratomschnitten einfacher als Fibrin-EHT-*whole-mount*-Präparaten. Die Technik der konfokalen Lasermikroskopie beruht auf einer Lochblende (*Pinhole*), die sich im Brennpunkt des Mikroskops, konfokal zum beleuchteten Punkt im Präparat, befindet und nur exakt fokussiertes Licht passieren lässt. Durch das Ausblenden nicht fokussierten Lichtes können Signale ober- bzw. unterhalb der gewünschten Schärfenebene den Detektor nicht erreichen und tragen nicht zur Bildentstehung bei. Alle konfokalen Darstellungen wurden mit der Lasermikroskopie 510 Meta Software auf einem Axiovert 200 M Mikroskop erstellt. Die Aufnahmen der Fluoreszenzen erfolgten nach Einkopplung der zugehörigen Laserlinie. Die Detektorempfindlichkeit und Laserintensität pro Kanal wurden je nach Präparat so gewählt, dass die größte im Experiment vorliegende Intensität im Bereich der Detektorsättigung lag. Alle übrigen Einstellungen wie Auflösung, Scangeschwindigkeit und Signalmittelung wurden entsprechend den Anforderungen der Fragestellung und den Gegebenheiten

in dem Präparat so gewählt, dass unter Berücksichtigung der Probenstabilität eine möglichst hohe Signalqualität erhalten wurde. Diese einmal festgelegten Einstellungen wurden während der Aufnahme der Präparate einer experimentellen Serie nicht verändert.

2.5.2.2 Färbeprotokoll

Nach der Fixierung in 4% Formalin (Histofix) über Nacht wurden die EHTs einmal kurz und dann für 24 Stunden in TBS gespült. Fibrin-EHTs wurden nach der Fixierung in Agarose (5%) eingegossen, um die Anfertigung von Vibratomschnitten (150 µm) zu vereinfachen. Die Vibratomschnitte wurden dann genauso wie *whole-mount*-Präparate behandelt. Kryoschnitte (10 µm) von Geweben wurden auf Superfrost Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur für eine halbe Stunde zum Trocknen gelegt.

Färbeprotokoll *whole-mount*-Präparate und Vibratomschnitte:

Alle Schritte (Waschen, Blocken, Primärantikörper und Färbung mit Fluoreszenzfarbstoff) wurden in einer Vertiefung einer 24-*well*-Gewebekulturplatte bei 4°C auf einem Schüttler durchgeführt. Die Präparate wurden für 24 Stunden bei 4°C in Blocklösung inkubiert. Hierdurch erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie eine Permeabilisierung der Zellen. Die Blocklösung wurde abgesaugt, die EHTs wurden mit dem in Antikörper-Lösung verdünnten Primärantikörper für 24 Stunden inkubiert. Nach Waschen für 24 Stunden in TBS wurde der Primärantikörper mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit DAPI, die Aktinfilamente mit Phalloidin-Alexa 633 und die Endothelzellen mit Lektin-TRITC markiert. Die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff dauerte 24 Stunden. Das Färbeschema ist in Tabelle 5 dargestellt. Zur Fokussierung der Präparate wurden diese zwischen einem Objektträger und Deckglas leicht komprimiert und mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Dabei diente Mowiol-488 als Eindeckmedium der Konservierung.

Färbeprotokoll Kryoschnitte:

Die Objektträger wurden mit etwa 500 µl Blockierlösung pro Objektträger beschichtet. Nach einer Stunde wurde die Lösung mit einer Pasteurpipette abgesaugt.

Unmittelbar nach dem Absaugen wurden die Schnitte mit dem in Antikörper-Lösung verdünnten Primärantikörper für 2 Stunden oder über Nacht inkubiert. Nachdem die Schnitte dreimal in TBS gewaschen wurden, kamen der Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, DAPI, Phalloidin-Alexa 633 und die Lektin-TRITC in 500 µl Antikörperlösung pro Objektträger für ein- bis zwei Stunden auf den Objektträger. Nach erneutem drei mal zehn-minütigem Waschen wurden die Schnitte mit Mowiol-488 eingedeckt. Um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, wurde jeder Flüssigkeitsfilm mit einem passenden Stück Parafilm bedeckt und in einer Feuchtkammer bei 4°C dunkel gelagert. Für das Gelingen der Färbung ist das Antrocknen der Gewebeschnitte beim Lösungswechsel unbedingt zu vermeiden.

Folgendes Färbeschema wurde für beide Färbeprotokolle durchgeführt:

Tabelle 5: Antikörper und Farbstoffe für die Immunfluoreszenzfärbungen

Darstellungs- objekt	Primärantikörper	Sekundärantikörper/direkt gekoppelte Fluoreszenzmarkierung
Hühner- erythrozyten	Anti- <i>chicken red blood cell</i> -IgG ₁ des Kaninchens 9,3 mg/ml, Fitzgerald Industries International, Inc. (1:100)	Alexa Flour 488 <i>goat anti- rabbit IgG</i> (2 mg/ml; Invitrogen), 1:800
Endothelzellen	-	Bandeiraea simplicifolia Lektin- TRITC (10 µg/ml; Sigma), 1:100
Aktinfilamente	-	Alexa Fluor 633 Phalloidin (200 units/ml, Invitrogen), 1:60
Zellkerne	-	4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI <i>dilactate</i> (5 mg/ml, Sigma), 1:1000

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen

Die folgenden Methoden wurden stets mit RNase freien Pipettenspitzen mit Filter und zuvor autoklavierten Plastikreagiergefäßen ausgeführt.

2.6.1 RNA Isolation

Die RNA Isolation erfolgte mittels der RNeasy® Technologie von Qiagen. Die genauen Arbeitsschritte sind dem Herstellerprotokoll entnommen (<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000291>, 2008). Die RNeasy Technologie vereint die Eigenschaften einer Silika-Gel-Membran mit der Mikrozentrifugationstechnik. Dafür wurden EHTs zunächst durch einen denaturierenden Guanidiniumthiocyanat-enthaltenden Puffer lysiert und mit einer Spritze homogenisiert. Durch diesen Puffer wurden außerdem RNasen inaktiviert. Nachdem mit Ethanol die Bindungsbedingungen optimiert wurden, wurde die Probe auf die RNeasy Mini Zentrifugationssäule gegeben. Durch abwechselnde Zugabe von Waschlösungen und Zentrifugation werden Kontaminationen entfernt, bevor die RNA in 30-100µl RNase freiem Wasser eluiert wurde. Dabei wurden nur RNA-Fragmente größer als 200 Basen eluiert. Dies führt zu einer mRNA Anreicherung. RNA-Fragmente kleiner als 200 Basen gehören meist zur Gruppe der tRNA oder rRNA, die einen Anteil von ca. 15-20 % der Gesamt RNA ausmachen. Die außerordentlich hohe Konzentration von Proteinen in EHTs (Kollagen, Fibrin) erforderte einen Proteinverdau nach der Lyse und Homogenisation des Gewebes. Hierfür wurde Proteinase K von Qiagen® benutzt, deren genaue Verwendung ebenfalls dem Herstellerprotokoll entnommen worden ist.

Die RNA-Konzentration wurde anschließend photometrisch mit dem Nanodrop® Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrock et al. 1989). Alle Werte sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) bestimmt, und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet, wobei 1,8 für reine RNA steht. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

2.6.2 RT-PCR (Reverse Transkription)

Nach der Konzentrationsbestimmung mittels Spektrophotometrie wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde entweder die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben, indem unspezifische Primer dem Reaktionsansatz hinzugefügt wurden, oder es wurden nur spezifische RNA-Fragmente mittels spezifischer Primer in cDNA umgeschrieben.

Für die unspezifische Umschreibung wurden 500 ng der RNA-Probe wurden mit DEPC-Wasser auf 10 µl (50 ng/µl) angeglichen. Reaktionspuffer, Desoxynucleotide, *random primer* und das Enzym Reverse Transkriptase entstammten dem *High-capacity cDNA RT kit* von Applied Biosystems. Die quantitative Zusammensetzung des Reaktionsmixes ist unten dargestellt. 10µl dieses zweifach konzentrierten Reaktionsmixes wurden mit 10 µl RNA Probe versetzt. Die reverse Transkription erfolgte in einem Thermocycler, der wie in Tabelle 6 beschrieben programmiert wurde. Während der ersten zehn Minuten wird die RNA denaturiert und gestreckt, um optimale Bedingungen für die im zweiten Schritt folgende Umschreibung herzustellen. Die hohe Temperatur (85 °C) im dritten Schritt trennt RNA- und cDNA-Strang voneinander, bevor die Temperatur bei 4°C gehalten wird. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -20°C gelagert (500 ng cDNA/20 µl Gesamtvolumen = 25ng/µl cDNA/Reaktionsmischung).

Reaktionsansatz reverse Transkription:

10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP Mix	0,8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 10 µl

Tabelle 6: Temperaturprogramm für die unspezifische reverse Transkription

Prozess	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Primer Anlagerung	10 min	25 °C	1
Elongation	120 min	37 °C	1
Denaturierung	5 sec	85 °C	1
Aufbewahrung	∞	4 °C	1

Die spezifische Umschreibung der RNA in cDNA dient der Testung der Spezifität der Primer. Zunächst erfolgt die reverse Transkription, in der RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA übersetzt wurde. Die anschließende PCR diente zur

exponentiellen *in vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen zwischen zwei Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden (Saiki et al. 1985, 1988). Die Oligonukleotid-Primer hybridisieren an komplementäre Regionen des zu amplifizierenden DNA-Fragments (*Primer Annealing*). Eine hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase hängt Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment in Gegenwart von freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs, *Elongation*). Darauf folgt ein neuer Zyklus, bestehend aus Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Hybridisierung und DNA-Synthese. Der Zyklus wird 20- bis 50-mal wiederholt (Tab. 7). Es handelt sich um eine Kettenreaktion, bei der winzige Mengen einer gegebenen DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert werden.

Die Reagenzien entstammen dem *One Step RT-PCR kit*, Qiagen und wurden wie unten dargestellt eingesetzt. Dieses Kit ermöglicht die reverse Transkription und PCR in einem Schritt. Der beschriebene Reaktionsansatz versteht sich als einfacher Ansatz. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet. Die RT-PCR-Reaktion wurde mit einem *GeneAmp PCR System 9700* PCR-Gerät nach dem Temperaturschema durchgeführt, welches Tabelle 8 zu entnehmen ist.

Nach der spezifischen Umschreibung in cDNA wurde die amplifizierte DNA über ein 2%iges Agarosegel elektrophoretisch separiert. Dafür wurde 0,04 M TAE-Puffer mit 2% Agarose versetzt und bis zur vollständigen Lösung der Agarose in einer Mikrowelle erhitzt. Sobald die Lösung handwarm war, wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ zugefügt. Das Erstarren erfolgte in einer eigenangefertigten Kammer, welche mithilfe eines Taschenkamms Vertiefungen in das Gel formte, die zur Aufnahme der Probe dienten. Zur DNA-Probe wurde 20% (v/v) 6x-DNA-Ladepuffer gegeben und 12 μl des Ansatzes neben einem Molekulargewichtsstandard zur Größenreferenz in die Taschen des Agarosegels aufgetragen. Das Agarosegel wurde mit TAE-Puffer in *Sub-Cell GT* Elektrophorese-Kammern überschichtet und eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erfolgte. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht (302 nm). Die Fluoreszenz

wurde mithilfe eines *Bio Imaging Systems (Chemi Genius2)* elektronisch festgehalten.

Reaktionsansatz RT-PCR:

5x RT Puffer	5 µl
NTP Mix	1 µl
<i>Forward</i> Primer	0,2 µl
<i>Reverse</i> Primer	0,2 µl
<i>OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i>	1 µl
RNA-Vorlage	20 ng
Nuclease-freies Wasser	ad 25 µl

Tabelle 7: Temperaturprogramm für die spezifische RT-PCR

Prozess	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Reverse Transkription	30 min	50°C	1
Initiale PCR-Aktivierung	15 min	95°C	1
Denaturierung	1 min	94°C	} 25
Primer Anlagerung	1 min	55°C	
Extension	1 min	72°C	
Final Extension	10 min	72°C	1

2.6.3 Primerdesign

Die Auswahl von Oligonukleotid-Fragmenten (Primern), mit optimierter Schmelztemperatur, Sekundärstruktur, Basenzusammensetzung und Länge des Amplikons für die RT-PCR erfolgte mittels der Software *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>, 2007). Um unerwünschte Amplifikationen von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer so gewählt, dass ihre Zielsequenzen Intron überlappend sind. Die Spezifität der Primer wurde mithilfe des *BLAST*-Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2008) des *National Center for Biotechnology Information* = NCBI (USA) überprüft.

Oligonukleotide mit den optimierten Sequenzen für die RT-PCR wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden

lyophilisiert geliefert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 100 µM mit Aqua ad iniectabilia eingestellt. Die Lagerung der gelösten Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der Primerpaare wurden RT-PCR-Reaktionen durchgeführt und die PCR-Produkte auf einem zweiprozentigen Agarosegel analysiert. Dafür wurde genomische Ratten-DNA und RNA der CAM neben der EHT-RNA eingesetzt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 8: Sequenzen der verwendeten Sonden und Primer für die RT- und quantitative PCR

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Größe des PCR-Produkts
GAPDH	AAC TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA	CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA TG	138 bp
VEGF-A	CAA TGA TGA AGC CCT GGA GT	TTT GAC CCT TTC CCT TTC CT	194 bp
FGF-2	GAA CCG GTA CCT GGC TAT GA	CCG TTT TGG ATC CGA GTT TA	182 bp
Angiopoietin	TAC AAC ACC CTG AGG ATG GA	CTG TGA GTA GGC TCG GTT CC	185 bp
VEGF-B	CCC AGC ATT CAA GAA ACC AT	TCT TAA CCG CTG AGC CAT CT	200 bp
<i>Myosin heavy chain 6</i>	GGG TAT CCG CAT CTG TAG GA	TTG GTG TGG CCA AAC TTG TA	185 bp
CD31	GAA GAA AGG GCT CAT TGC AG	CAC TGG GCT CAG AAA CCT TC	172 bp
Cadherin 5	GGC CAA CGA ATT GGA TTC TA	GTT TAC TGG CAC CAC GTC CT	195 bp

2.6.4 Quantitative PCR (qPCR)

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer *Real Time*-PCR (qRT-PCR) mit einem *ABI PRISM 7900 Sequence Detection System* quantifiziert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Detektion und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit während der Amplifikation. Detektiert wird ein Fluoreszenzfarbstoff, SYBR Green I®, welcher fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Auf diese Weise nimmt das Lichtsignal im Messbereich proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA zu. Zur Quantifizierung wird die Zykluszahl während des Laufes bestimmt, bei der die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt (*cycle threshold*-Wert, Ct-Wert). Da bei jedem Zyklus der PCR eine Verdoppelung der Zielsequenzen stattfindet, gilt: Expression [Gen X] proportional zu 2^{-Ct} -Wert. Die Datenanalyse erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak

und Schmittgen 2001). Dabei wird der Unterschied zwischen dem Ct-Wert des zu analysierenden Gens und dem Ct-Wert eines konstitutiv exprimierten Haushaltsgen berechnet. Anschließend werden diese Ct-Wert Unterschiede zwischen unterschiedlichen Proben berechnet und als Herauf- oder Herunterregulation des Gens beurteilt.

Die eingesetzten Reagenzien entstammten dem *Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems*. Diese Mischung enthält neben dem SYBR Green I Fluoreszenzfarbstoff eine AmpliTaq Gold® DNA Polymerase und Desoxynukleotide.

Zur Kontrolle der Linearität der PCR wurde für jedes Primerpaar eine Negativkontrolle (NTC = *no template control*, Kontrolle ohne cDNA, Wasserkontrolle) mitgeführt. Da der Farbstoff unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, können Primer-Dimere ebenfalls zu einem Signal führen. Dieses Signal kann jedoch von dem Signal der spezifischen Amplifikation anhand der Dissoziationskurve, die von der zugehörigen Software (SDS Version 2.1.1) erstellt wird, unterschieden werden. Während des letzten Schritts, der Dissoziationsphase, wird die Probe von 60°C auf 95°C erhitzt, um doppelsträngige DNA zum Schmelzen zu bringen. Sind DNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge in dem Reaktionsansatz vorhanden, ergeben sich uneinheitliche Dissoziationskurven, da die Dissoziation von kurzen Sequenzen bei niedrigeren Temperaturen erfolgt. Die Überprüfung der Spezifität wurde nach jeder PCR durchgeführt und nur spezifische Amplifikationen in die Auswertung integriert.

Der Reaktionsansatz wurde wie unten dargestellt pipettiert. Der beschriebene Reaktionsansatz versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet. Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Reaktionsansatz quantitative RT-PCR:

Power SYBR® Green PCR Master Mix	5,0 µl
Forward Primer (10µM)	1,0 µl
Reverse Primer (10µM)	1,0 µl

cDNA (5 ng/Ansatz)	2,0 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 10 µl

Tabelle 9: Temperaturbedingungen für die quantitative RT-PCR

Prozess	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung, Initialisierung der Polymerase	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	15 sec	} 45
Primer Anlagerung, Elongation	60°C	1 min	
Dissoziations Phase	95°C	15 sec	1
	60°C	15 sec	
	95°C	15 sec	

2.7 Sequenzvergleich von Wachstumsfaktoren unterschiedlicher Spezies

Um die Interaktion von Faktoren der Ratte oder des Menschen mit der CAM besser beurteilen zu können, wurden die Aminosäuresequenzen der auf der CAM als angiogenetische Stimuli verwendeten Faktoren verglichen. Dafür wurde die Huhn-spezifische Aminosäuresequenz der verwendeten Faktoren VEGF-A, Tb4 und FGF-2 in der Nukleotid-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2008) gesucht. Die Aminosäuresequenz des verwandten Faktors wurde vom Hersteller angegeben. Diese wurden dann mittels des ebenfalls von NCBI angebotenen BLAST-Programms (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2008) aneinander gereiht und die Sequenzhomologien berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von nativen Kollagen-EHTs, Fibrin-EHTs und Tb4-supplementierten Fibrin-EHTs

3.1.1 Vergleich der Kontraktionskraft zwischen den EHT-Gruppen

Für die Funktion von Herzmuskelgewebe ist die Entwicklung von messbarer Kontraktionskraft essentiell. In Abbildung 13 ist exemplarisch die Entwicklung von Kontraktionskräften in Abhängigkeit von der Vordehnung an Kollagen-, Fibrin- und Tb4 behandelten Fibrin-EHTs dargestellt.

Kollagen-EHTs zeigten bei L_0 , der Ausgangsdehnung, eine Kontraktionskraft von 0,32 mN, bei einer Dehnung um 0,2 mm 0,35 mN, bei 0,4 mm 0,41 mN, bei 0,6 mm 0,40 mN, bei 0,8 mm 0,41 mN, bei 1,0 mm 0,43 mN, bei 1,2 mm 0,45 mN und bei 1,4 mm 0,45 mN. Dies bedeutet eine Kraftsteigerung auf 141% der Ausgangskraft. Fibrin-EHTs zeigten bei L_0 eine Kontraktionskraft von 0,33 mN, bei einer Dehnung von 0,2 mm 0,39 mN, bei 0,4 mm 0,49 mN, bei 0,6 mm 0,58 mN, bei 0,8 mm 0,64 mN, bei 1,0 mm 0,74 mN, bei 1,2 mm 0,82 mN und bei 1,4 mm 0,90 mN. Dies bedeutet eine Kraftsteigerung auf 273% der Ausgangskraft. Die mit Tb4 behandelten EHTs zeigten bei L_0 eine Kontraktionskraft von 0,61 mN, bei einer Dehnung von 0,2 mm 0,82 mN, bei 0,4 mm 0,97 mN, bei 0,6 mm 1,1 mN, bei 0,8 mm 1,21 mN, bei 1,0 mm 1,32 mN, bei 1,2 mm 1,46 mN und bei 1,4 mm 1,51 mN. Dies bedeutet eine Kraftsteigerung auf 247% der Ausgangskraft.

In allen Gruppen steigt die Kontraktionskraft mit zunehmender Dehnung. Dies entspricht dem Frank-Starling-Mechanismus, wie er in nativem Myokard auftritt. Die prozentuale Kraftsteigerung vom Ausgangswert war bei Fibrin-EHTs höher als bei Kollagen-EHTs. Die maximale Kontraktionskraft von Fibrin-EHTs ist 200% von der maximalen Kontraktionskraft der Kollagen-EHTs. Mit Tb4 behandelte EHTs zeigten eine maximale Kontraktionskraft, die 363% derjenigen der Kollagen-EHTs und 167% derjenigen der Fibrin-EHTs betrug. Diese Ergebnisse führten zur weiteren Analyse des Effektes von Tb4 auf EHTs.

Kollagen-EHTs unterschiedlicher Zellpräparationen weisen eine große Schwankungsbreite der Kontraktionskraft auf, wohingegen Fibrin-EHTs aus unterschiedlichen Präparationen besser miteinander vergleichbar sind. Für die Darstellung der Kontraktionskräfte in Abbildung 13 wurden jeweils repräsentative Messungen ausgewählt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass Kollagen-EHTs beim Aufhängen auf die Dehnapparatur im Organbad stärker zum Zerreißen neigten, was die Messung der Kontraktionsparameter unmöglich machte. Fibrin-EHTs hingegen rissen so gut wie gar nicht.

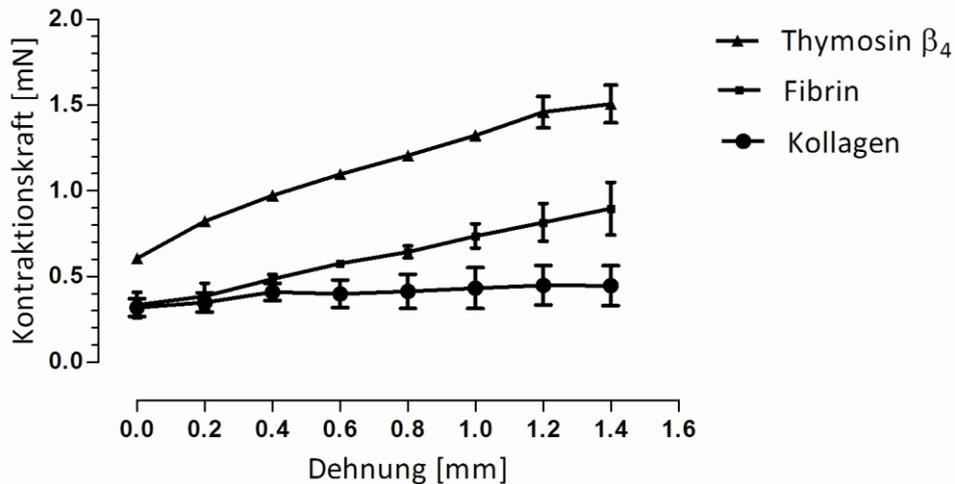


Abbildung 13: Auswirkung ansteigender Dehnung auf die Kontraktionskraft unterschiedlicher EHT-Gruppen

Dargestellt sind die mittlere Kontraktionskraft und Standardabweichung von drei EHT-Gruppen (Kollagen, Fibrin und Fibrin+Tb4) in Abhängigkeit von der Vordehnung. Die Dehnung wurde in 0,2 mm Schritten gesteigert, ausgehend von der L_0 -Gewebedehnung, siehe Kapitel 2.3.7. In allen Gruppen steigt die Kontraktionskraft mit zunehmender Dehnung, entsprechend dem Frank-Starling-Mechanismus. Die maximale Kontraktionskraft von Fibrin-EHTs ist 200% von der maximalen Kontraktionskraft der Kollagen-EHTs. Mit Tb4 behandelte EHTs zeigten eine maximale Kontraktionskraft, die 363% derjenigen der Kollagen-EHTs und 167% derjenigen der Fibrin-EHTs betrug. Alle EHTs entstammten einer Zellpräparation (n=3). Ein t-Test für unabhängige Stichproben ergab einen signifikanten Unterschied zwischen allen Gruppen bei 1,4 mm Dehnung ($p < 0,05$ bei Kollagen vs. Fibrin, Fibrin vs. Fibrin+tb4 und Kollagen vs. Fibrin+Tb4)

3.1.2 Morphologische Charakterisierung

Zur morphologischen Charakterisierung der EHT-Gruppen wurden Paraffin-Histologien sowie Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die Bilder dienen als Grundlage zur Interpretation von einerseits strukturellen Unterschieden zwischen den EHT-Gruppen und andererseits Strukturveränderungen, die während der Entwicklung auf der CAM eintraten. Für die Lichtmikroskopie wurden Paraffinschnitte mit H.E. oder Azan gefärbt. Für die konfokale Lasermikroskopie wurden *whole-mount* Präparate von Kollagen-EHTs und 150 μm dicke Vibratomschnitte von Fibrin-EHTs mit an FITC gekoppeltem Phalloidin (zur Darstellung von Aktinvorkommen im Zytoskelett aller Zellen sowie im Sarkomer der Herzmuskelzellen), an TRITC gekoppeltem Endothel spezifischen Lektin (zur Darstellung von Endothelzellen) sowie DAPI zur Kerndarstellung gefärbt.

3.1.2.1 Lichtmikroskopie

Die Azanfärbung ermöglicht die Differenzierung zwischen blau angefärbtem kollagenem Bindegewebe, unterschiedlich rot angefärbten Zellkörpern und Zytoplasma sowie zwischen kollagenem Bindegewebe und rotgefärbter Fibrinmatrix. In jeder EHT-Gruppe befanden sich in unterschiedlichem Maße ausgestreckte, längsorientierte und teils miteinander verbundene Kardiomyozyten. Die längsovalen, mittelständigen Zellkerne deuteten auf einen gewissen Reifegrad der Zellen hin. In Abbildung 14 sind repräsentative Präparate abgebildet.

In Kollagen-EHTs (siehe Abb. 14 Aa, b) waren die Kardiomyozyten eingebettet in ein dichtes Netzwerk aus wellenförmig verlaufenden kollagenen Fasern. Die Kardiomyozyten waren ausgestreckt und längs, entsprechend der Dehnrichtung, orientiert. An einigen Stellen wurden Zellkonglomerate gefunden. Die maximale Größe der Zellen betrug etwa 100 µm in der Länge und 10-15 µm in der Breite. Dies entspricht den Maßen adulter Kardiomyozyten. Spitzwinklige Verzweigungen einiger Zellen wiesen deren Suche nach Kontakt zu Nachbarzellen auf, wie es typisch für diese Zellart ist (Lüllmann-Rauch 2003). Die meisten Zellen lagen vereinzelt vor, doch an einigen Stellen zu einer Doppelschicht übereinander gelagert (siehe Abb. 14 Ab). Disseminiert im Gewebe kamen einzelne ungefärbte, runde Areale vor, die teils eine rote Begrenzung aufwiesen. Dies könnten Endothelzell-umgrenzte Gefäße gewesen sein. Die Dichte ausgestreckter Kardiomyozyten war an der inneren Zirkumferenz höher als an der äußeren. Neben den ausgestreckten Zellen gab es zahlreiche kleine, runde Zellen, die einen Durchmesser von ca. 10 µm hatten. Es könnte sich um unausgestreckte Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen oder Makrophagen handeln. Dazwischen befanden sich jedoch auch disseminierte weniger angefärbte, runde, im Durchmesser etwa 10 µm breite Ablagerungen die vermutlich avitale Zellreste als Resultat eines nekrotischen oder apoptotischen Prozesses darstellten.

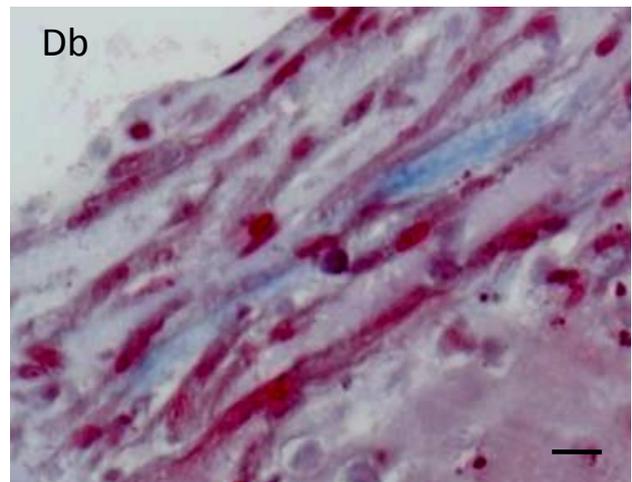
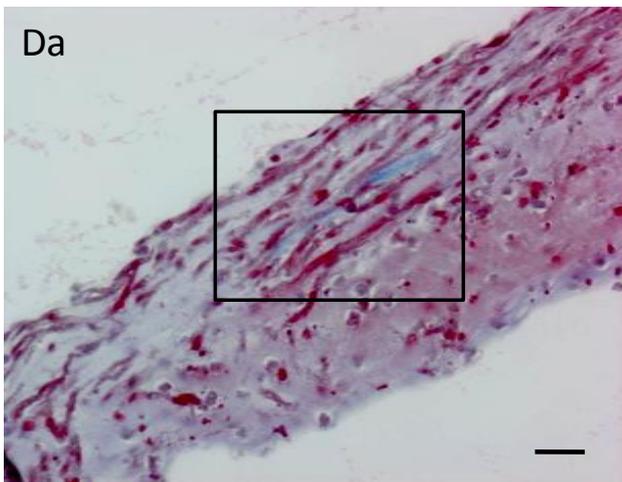
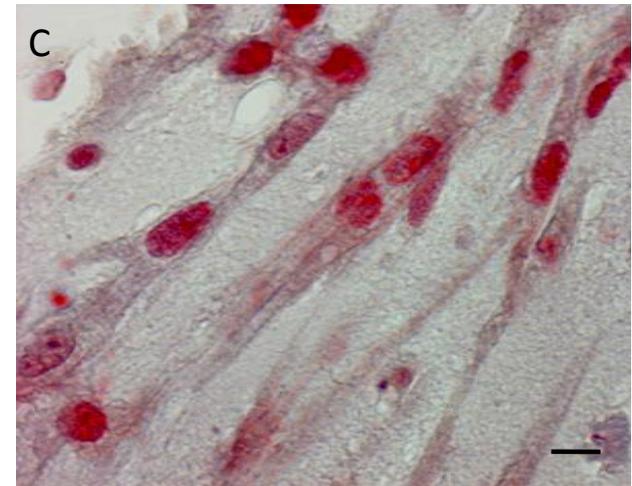
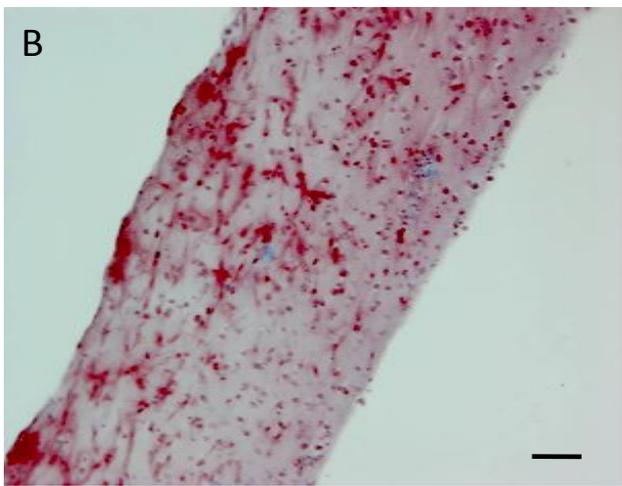
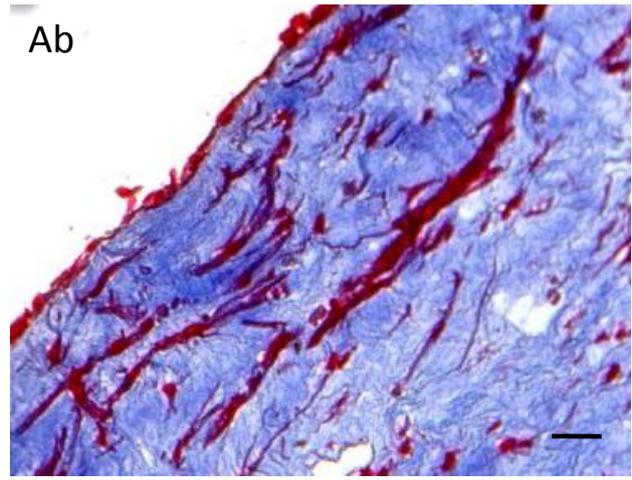
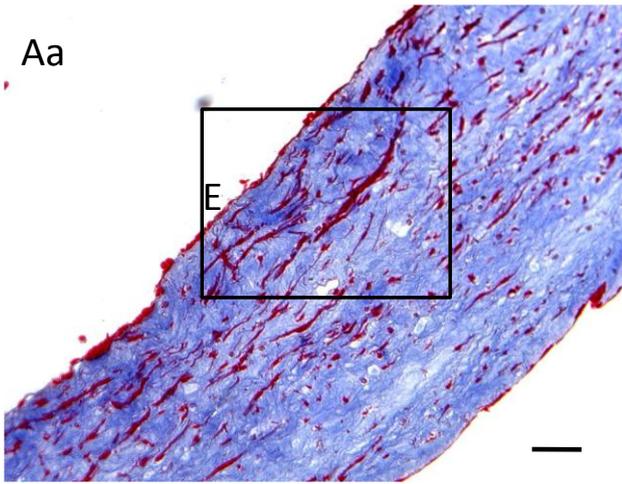
In Fibrin-EHTs (siehe Abb. 14 B, C) lagen die Kardiomyozyten eingebettet in rotgefärbtes Fibrin. Die Menge an Fibrin war innerhalb des EHTs unterschiedlich, einige Stellen waren leuchtend rot (siehe Abb. 14 E), andere Stellen schwach rot bis bläulich. In den weniger Fibrin-haltigen Arealen waren mehr ausgestreckte und größere Kardiomyozyten zu finden als in den Fibrin-reichen Arealen. Die

ausgestreckten Kardiomyozyten hatten sich entlang der Dehnrichtung orientiert, wiesen ebenso spitzwinklige Verzweigungen auf und erreichten etwa eine Größe von 100 µm Länge und 10-15 µm Breite. Querstreifung war bei genauerem Hinschauen zu erkennen. Die mittelständigen, ovalen Kerne kamen zumeist einzeln vor, jedoch schienen einige Zellen zweikernig zu sein (siehe Abb. 14 C). Manche Zellen waren über Zellausläufer miteinander verbunden, andere lagen übereinander und bildeten eine Doppelschicht. Zwischen den Zelleibern ließ sich lokale Kollagenproduktion anhand blau gefärbter Inseln ausmachen. Ein starker Matrixumbau ist in Abbildung 14 E zu betrachten, wo eine fibrinreiche (rot) Region direkt an eine kollagenhaltigere Region (bläulich grau) angrenzt. In Fibrin-EHTs fiel auf, dass die Dichte ausgestreckter Zelleiber von außen nach innen zunahm, die Muskelzellstränge schienen sich in der inneren Zirkumferenz zu sammeln. Zwischen den Kardiomyozyten aber insbesondere im unteren EHT-Abschnitt waren kleine, runde, etwa 10 µm breite Zellen zu finden, die durch ihren leuchtenden Zellkern als vital anzusehen waren, vermutlich handelte es sich um unausgestreckte Kardiomyozyten, Fibroblasten, Endothelzellen oder Makrophagen. Wie in Kollagen-EHTs befanden sich dazwischen disseminierte weniger angefärbte, runde, im Durchmesser etwa 10 µm breite Ablagerungen, vermutlich ebenso avitale Zellreste.

Mit Tb4 behandelte EHTs (siehe Abb. 15 Da, b) zeigten ebenso unterschiedliche Fibrindichten auf, die durch unterschiedliche Rotfärbung voneinander zu unterscheiden waren. In Abbildung Da, b ist ein eher Fibrin-armer Bereich abgebildet. Jedoch sieht man, wie die untere EHT Fläche eine inhomogenere EZM enthielt, die leicht scheckig und röter war als die obere Hälfte. In der oberen Hälfte befanden sich viele dicht übereinander gelegene Kardiomyozyten, die einen entsprechend der Dehnrichtung orientierten Zellkörper von etwa 100 µm Länge und 10-15 µm Breite hatten. Die Zellen hatten untereinander viele Kontakte ausgebildet. Es waren zweikernige Zellen zu sehen. Im oberen EHT Abschnitt lagen Kardiomyozyten dicht gepackt, zwischen ihnen lagen blau gefärbte Kollagenschichten. Die kleinen, runden, etwa 10 µm breiten Zellen mit einer großen Kern/Plasma Relation waren ebenso wie bei den unbehandelten Fibrin-EHTs disseminiert im Präparat zu sehen. Daneben kamen die blau-lila, weniger gefärbten Ablagerungen vor, die wahrscheinlich nekrotische Zellen darstellen.

Im Vergleich zwischen den in Abbildung 14 dargestellten Kollagen- und Fibrin-EHTs schienen Fibrin-EHTs eine größere Kardiomyozytendichte bei etwa gleicher Zellgröße zu haben. Da jedoch keine Quantifizierung der Zellen vorgenommen wurde, ist diesbezüglich keine eindeutige Aussage zu treffen. Die Zellen schienen in Fibrin-EHTs homogener verteilt zu sein, denn Zellkonglomerate waren weniger häufig zu finden. In Kollagen-EHTs waren die nekrotischen Zellen nicht so eindeutig auszumachen wie in den Fibrin-EHTs, jedoch weisen H.E.-Färbungen von nativen Kollagen-EHTs ebenso reichlich nekrotische Zellen auf. Die Kardiomyozytendichte und –größe war in Fibrin-EHTs unterschiedlicher Zellpräparationen beständig gleich. Dagegen zeigten Kollagen-EHTs eine große Schwankungsbreite bezüglich der Zelldichte und –vitalität. In Abbildung 14 sind relativ zu der Gesamtheit aller untersuchten Kollagen-EHT Präparate gut entwickelte EHTs dargestellt.

Bemerkenswert war der Unterschied in der Zelldichte und –größe zwischen den Fibrin-EHT Gruppen. In mit Tb4 behandelten EHTs schienen die Kardiomyozyten kompakter strukturiert, ausgestreckter und größer zu sein. Sie lagerten sich in Schichten übereinander. Konglomerate an nicht-ausgestreckten Zellen, wie sie in Fibrin-EHTs vorhanden waren, ließen sich in den mit Tb4 behandelten Fibrin-EHTs nicht finden. Diese Beobachtungen unterstützen die Ergebnisse der Kontraktionsexperimente.



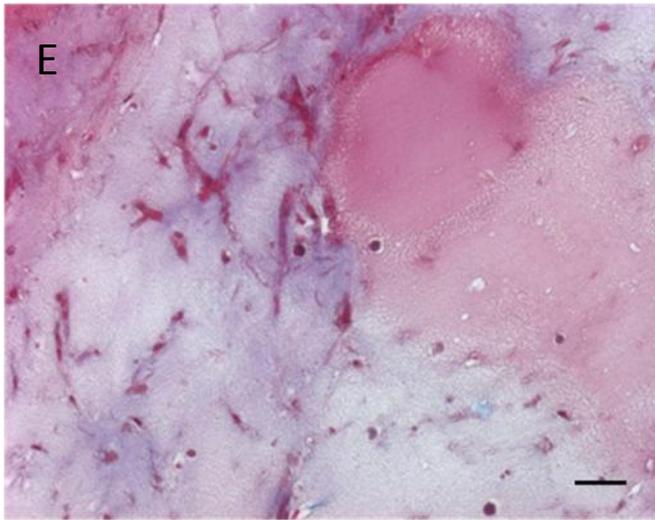


Abbildung 14: Morphologische Untersuchungen von nativen EHTs an Tag 12

Azanfärbungen von 4 μm großen Mikrotomschnitten: A: Kollagen-EHT; B, C, E: Fibrin-EHT; D: Fibrin-EHT mit Tb4 behandelt.

Längsschnitte von EHTs zeigten in Kollagen-EHTs die blau angefärbte, Kollagen-reiche Extrazellulär-Matrix und in Fibrin-EHTs eine eher rötliche Fibrin-reiche Matrix, welche an zellreichen Stellen lokale Kollagen-Produktionen aufwies (B), die zu einer inhomogenen Verteilung der Matrix führten (E). Zellkörper und -Kerne waren unterschiedlich rot-angefärbt. Die ausgestreckten Kardiomyozyten hatten sich entlang der Dehnrichtung orientiert und wiesen spitzwinklige Verzweigungen auf. Kleinere, runde Zellen wiesen auf Makrophagen, unausgestreckte Kardiomyozyten oder Endothelzellen hin. Avitale Zellreste als Resultat eines nekrotischen oder apoptotischen Prozesses waren disseminiert im Gewebe auszumachen.

Maßstabsbalken: 100 μm (Aa, B, Da, E), 40 μm (Ab, Db), 20 μm (C)

3.1.2.2 Konfokale Lasermikroskopie

In Abbildung 15 sind Übersicht- sowie Detailaufnahmen der drei EHT Gruppen, Kollagen-EHTs, Fibrin-EHTs und mit Tb4-behandelte Fibrin-EHTs, mittels konfokaler Lasermikroskopie abgebildet.

Kollagen-EHTs (siehe Abb. 15 A, B, C) enthielten ein Netzwerk aus größtenteils einzeln vorkommenden Kardiomyozyten, die sich lokal zu Zellkonglomeraten arrangierten, in deren Zentrum die Zellen mit den Enden zusammenstießen. Wie in den lichtmikroskopischen Aufnahmen war der Zellkern mittelständig und oval. Er bildete den Ort des größten Zelldurchmessers, perinukleär war das Zytoplasma spärlich ausgebildet. Die Kardiomyozyten enthielten mindestens zwei Zellausläufer, in denen sich der Zellkörper verdünnte. Spitzwinklige Verzweigungen einiger Zellen waren analog zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen vorhanden. Die meisten Zellen zeigten durch die Bindung von Phalloidin an Aktin die für Skelett- und Herzmuskulatur typische Querstreifung (siehe Abb. 16 C). Die Menge an

Sarkomeren pro Zelle sagt etwas über deren Vitalitätszustand aus. Dieser schwankte zwischen den Kardiomyozyten, so dass eine pleomorphe Zellpopulation das EHT ausmachte. EHTs aus verschiedenen Zellpräparationen zeigten unterschiedlich vitale Zellpopulationen. In Abbildung 15 C sind außergewöhnlich vitale, große Zellen dargestellt. Dagegen befanden sich in anderen Präparaten (exemplarisch siehe Abb. 15 B) kleine, atrophe weit voneinander entfernt liegende Kardiomyozyten. Neben den Kardiomyozyten waren Phalloidin-positive Zellen ohne Querstreifung zu finden, vermutlich Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen. Letztere waren mehrheitlich einzeln als runde Zellen oder mit kleinen Ausläufern homogen im Gewebe verteilt. In manchen Fällen waren die Ausläufer der Endothelzellen lang ausgestreckt und zu einem Strang von mehreren Endothelzellen verbunden, der stellenweise verzweigt aufzufinden war (siehe Abb. 15 B).

Fibrin-EHTs (siehe Abb. 16 D, E, F) enthielten ebenso ein Netzwerk aus größtenteils einzeln vorkommenden Kardiomyozyten, die sich lokal zu längs orientierten Zellbündeln arrangierten. Der mitteständige, ovale Zellkern bildete den Ort des größten Zelldurchmessers, weiter peripher verdünnte sich der Zelleib in Ausläufern. Jede Kardiomyozyte bildete zwei Ausläufer, einige enthielten spitzwinklige Verzweigungen. Die typische Querstreifung (siehe Abb. 15 E, Vergrößerung) zeichnete die meisten Zellen als Kardiomyozyten aus. Die Anzahl an Sarkomeren pro Zelle war unterschiedlich. Ebenso wie in den Kollagen-EHTs waren jedoch auch Zellen ohne Querstreifung zu finden, vermutlich Fibroblasten, Makrophagen oder Endothelzellen. Analog zu den Kollagen-EHTs waren diese mehrheitlich einzeln als runde Zellen oder mit kleinen Ausläufern homogen im Gewebe verteilt. Vereinzelte Endothelzellstränge waren in gleichem Maße wie in Kollagen-EHTs auszumachen. Oberflächennah befand sich in Fibrin-EHTs eine Schicht aus runden, etwa 20 µm breiten Zellen mit kurzen Ausläufern, deren Positivität für Lektin diese als Endothelzellen auszeichnete. Sie waren untereinander verbunden, so dass sie flächenhaft einem Zellrasen ähnelten.

Mit Tb4 behandelte EHTs (siehe Abb. 15 G, H, I) enthielten aneinander liegende, parallel verlaufende Kardiomyozyten, deren Dichte fast einer Faser glich. Aber auch Zellaggregate mit im Zentrum zusammenlaufenden Kardiomyozyten waren in den Präparaten enthalten. Der mittelständige, ovale Zellkern war von reichlich

Zytoplasma umgeben, so dass der Durchmesser hier etwa 10-15 μm betrug. Die Ausläufer waren reich an Zytoplasma und quergestreiften Sarkomeren. Spitzwinklige Verzweigungen bildeten sich zwischen den Zellen, welche diese miteinander verknüpften. In dieser EHT-Gruppe war ebenso ein Nicht-Kardiomyozyten-Anteil vermutlich aus Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen auszumachen. Letztere waren entweder disseminiert im Gewebe als kleine, runde Zellen mit kleinen Ausläufern zu finden oder sie fanden durch feine Verzweigungen Anschluss zueinander und bildeten einen Strang. An einer EHT-Oberfläche bildete sich analog zu den unbehandelten Fibrin-EHTs ein Rasen aus etwa 20 μm breiten Endothelzellen, deren Zellmembranen flächenhaft oder mit kurzen Ausläufern verbunden waren (siehe Abb. 15 F).

Die Unterschiede zwischen den EHT-Gruppen bestanden i) in der Beständigkeit der Zelldichte und Vitalität der Kardiomyozyten, wobei die Fibrin-EHTs aus unterschiedlichen Zellpräparationen besser miteinander vergleichbar waren und die Morphologie der Kollagen-EHTs großen Schwankungen unterlag; ii) in der Dichte des Kardiomyozytennetzwerkes, wobei die Kardiomyozytendichte in Kollagen-EHTs am niedrigsten und in Tb4-supplementierten-Fibrin-EHTs am höchsten zu sein schien; iii) in der Anordnung der Kardiomyozyten, wobei Tb4-supplementierte-Kardiomyozyten entlang der Längsachse orientierte Zellbündel bildeten und in Kollagen- sowie Fibrin-EHTs die Zellen eher ein grobmaschiges Netz bildeten; iv) in der Größe der Zellen, mit Tb4 supplementierte Kardiomyozyten zeichneten sich durch überdurchschnittlich große Zelleiber aus; v) in der Schichtung der Zellen innerhalb des EHTs: Fibrin-EHTs wiesen stets eine Endothelzellschicht am Unterrand auf; vi) Kollagen-EHTs enthielten mehr Zellkonglomerate als Fibrin-EHTs, insgesamt waren in Fibrin-EHTs die Zellen homogener verteilt. Ein weiterer Punkt ist die vereinfachte Strukturdarstellung in Fibrin-EHTs im Gegensatz zu Kollagen-EHTs,

da das Verhältnis zwischen Hintergrund und spezifischer Färbung höher war.

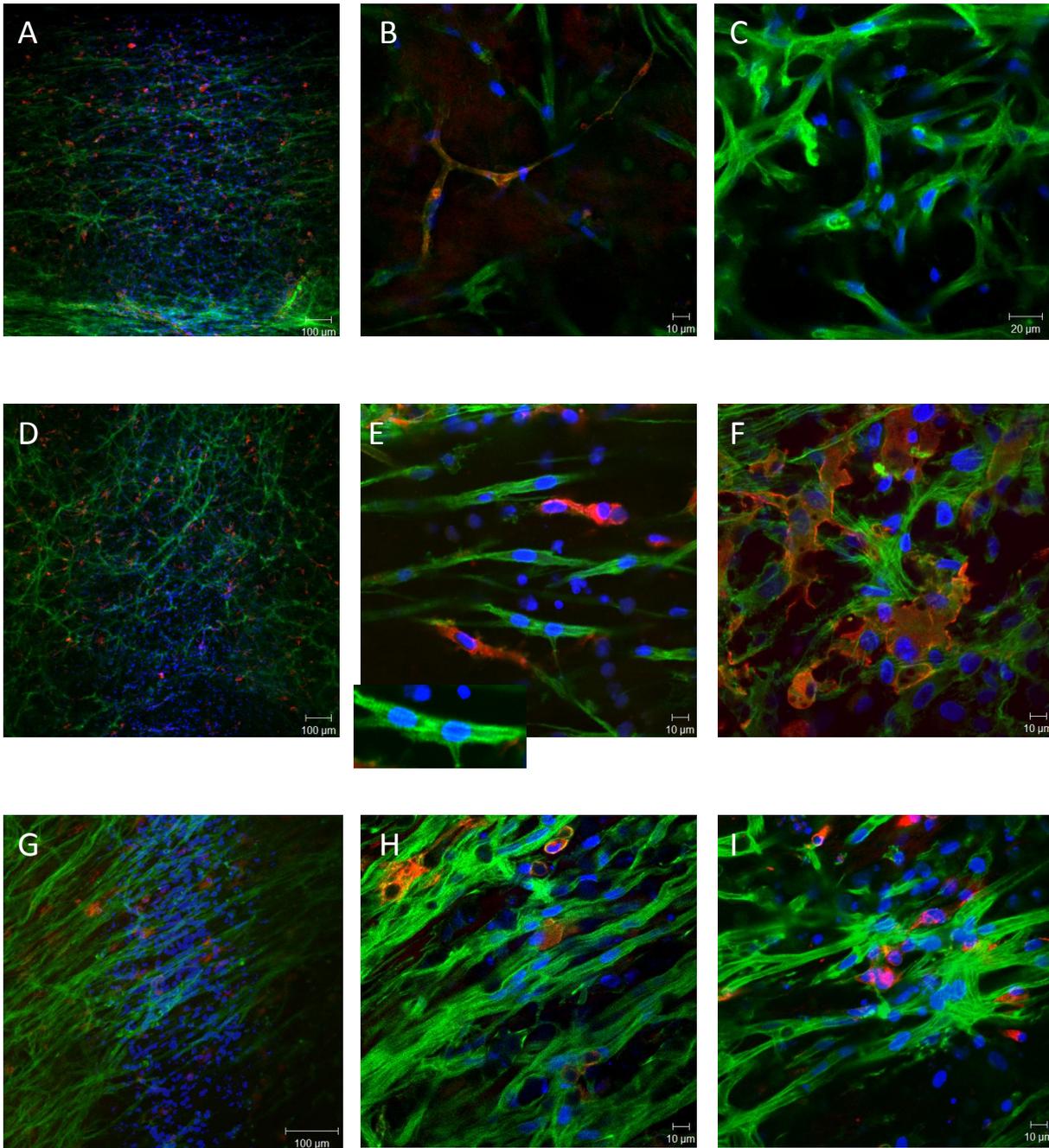


Abbildung 15: Morphologische Untersuchungen von nativen EHTs an Tag 12
 Immunfluoreszenzfärbungen von whole-mount-EHT-Präparaten A, B, C: Kollagen-EHT; und Vibratom-Längsschnitten D, E, F: Fibrin-EHT; G, H, I: Fibrin-EHT mit Tb4 behandelt. In grün ist Phalloidin, in rot Lektin und in blau DAPI dargestellt. Die Konzentrierung des DAPI-Signals auf einen mittigen Streifen ist auf die geringe Spannweite des UV-Lasers zurückzuführen. In E ist ein Ausschnitt des Bildes vergrößert eingefügt. EHTs verschiedener Gruppen sind anhand Übersichtsaufnahmen (A, D, G) und Detailaufnahmen (B, C, E, F, H, I) verglichen. Jede EHT-Gruppe zeigte einzeln vorkommenden Kardiomyozyten, die sich lokal zu längs orientierten Zellbündeln arrangierten. Ebenso wie in den Kollagen-EHTs waren

jedoch auch Zellen ohne Querstreifung zu finden, vermutlich Fibroblasten, Makrophagen oder Endothelzellen (rot, Lektin). Die Kardiomyozytendichte schien in Kollagen-EHTs am niedrigsten und in Tb4-supplementierten-Fibrin-EHTs am höchsten zu sein.

Die morphologischen Untersuchungen nativer EHTs lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die schwankende Qualität von Kollagen-EHTs spiegelte sich in den lichtmikroskopischen sowie den lasermikroskopischen Aufnahmen wider: Kollagen-EHTs enthielten in einigen Fällen ein Netzwerk mit vielen vitalen Kardiomyozyten und in anderen Fällen eine lediglich mit atrophen Zellen und Zellrümmern durchzogene Kollagenmatrix.
- Fibrin-EHTs scheinen ein dichteres Netzwerk aus Kardiomyozyten aufzuweisen. Tb4-Supplementierung der Fibrin-EHTs verdichtete das Kardiomyozytennetzwerk bemerkenswert.
- Die Assoziation von Endothelzellen zu Strängen schien weder durch Fibrineinsatz noch durch Tb4 beeinflusst zu werden.
- Die Fibrinmatrix war flächenhaft unterschiedlich modelliert. Die Extrazellulärmatrix wies unterschiedliche Fibrinkonzentrationen auf, die mit lokal unterschiedlichen Zelldichten korrelierten. Es wurde an einigen Stellen Kollagen produziert.

3.2 Strukturanalyse der Chorioallantoismembran

Zur morphologischen Charakterisierung der CAM wurden Paraffin-Histologien sowie Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die Bilder dienten als Grundlage zur morphologischen Auswertung der EHT-Explantate nach der Kultivierung auf der CAM. Paraffinschnitte wurden mit Azan gefärbt. *Whole-mount* Präparate der CAM wurden mit an FITC-gekoppeltem Phalloidin (zur Darstellung von Aktinvorkommen im Zytoskelett aller Zellen), an TRITC-gekoppeltem Endothel-spezifischem Lektin (zur Darstellung von Endothelzellen), Alexa 488 zur Darstellung der Bindung von *anti-red-blood-cell*-Antikörper (aRBC) sowie DAPI zur Kerndarstellung gefärbt.

3.2.1 Lichtmikroskopie

Ein vertikaler (siehe Abb. 16 A) sowie ein horizontaler Schnitt (siehe Abb. 16 B) der zwölf Tage alten CAM wurden angefertigt. In dem vertikalen Schnitt war das oberflächige, in die CAM eingebettete kapilläre Netzwerk zu sehen (siehe Abb. 16 A, Pfeile). Die oberflächigste Schicht war zellreich, die Größe, die Farbe und der monomorphe Charakter der Zellen wiesen darauf hin, dass in der obersten Schicht größtenteils Erythrozyten lagen. Die Zellen hatten einen intensiv rotgefärbten Kern und waren etwa 7-10 µm groß. Die darunter liegenden Schichten waren lockerer gebaut und enthielten kollagenes Bindegewebe. Zwischen den kollagenen Fasern lagen kleine runde Zellen. Dies ist in dem horizontalen Schnitt einer etwa 20 µm unter der Oberfläche liegenden Schicht deutlicher dargestellt. In dem Bindegewebe mit vereinzelt eingebetteten Zellen lag ein längs und quer angeschnittenes, mit Erythrozyten gefülltes, ca. 100x200 µm großes Gefäß. Die Kerne der ovalen ca. 10 µm großen Erythrozyten waren zu erkennen, außerdem das ca. 5 µm dicke Endothel (siehe Abb. 16 B, Pfeil). In vielen Paraffinschnitten befanden sich in den Gefäßen wenige oder keine Erythrozyten, da diese während des Färbeprozesses ausgewaschen worden waren.

3.2.2 Konfokale Lasermikroskopie

In Abbildung 16 B und C sind Querschnitte durch die CAM in unterschiedlichen Ebenen gezeigt. Abbildung 16 C zeigt ein quer angeschnittenes, etwa 100 µm im Durchmesser großes Gefäß welches 7-10 µm große kernhaltige Erythrozyten trägt, die deutlich mit dem aRBC-Antikörper markiert waren. Die Färbung war bei Erythrozyten membranständig. Erythrozyten waren weder mit Phalloidin noch mit Lektin anfärbbar. Ebenso war die Gefäßwand mit Lektin nicht anzufärben. Abbildung 16 D zeigt eine tiefer gelegene Schicht, die wabenartig angeordnete etwa 10-15 µm große extravasale Zellen zeigte. Die Phalloidinfärbung markierte die Zellgrenzen. Das Färbemuster dieser Zellen mit aRBC-Antikörper war zytoplasmatisch. Ebenso war das Zytoplasma dieser Zellen mit Lektin anfärbbar. Das aRBC-positive Signal der extravasalen CAM-Zellen war für die Beurteilung von Einwüchsen der CAM in EHTs von großer Bedeutung. Die Phalloidinfärbung zeigte deren wabenartige Anordnung, (siehe Abb. 16 D). Dieses Färbemuster suggerierte, es könnte sich um Hämangioblasten handeln.

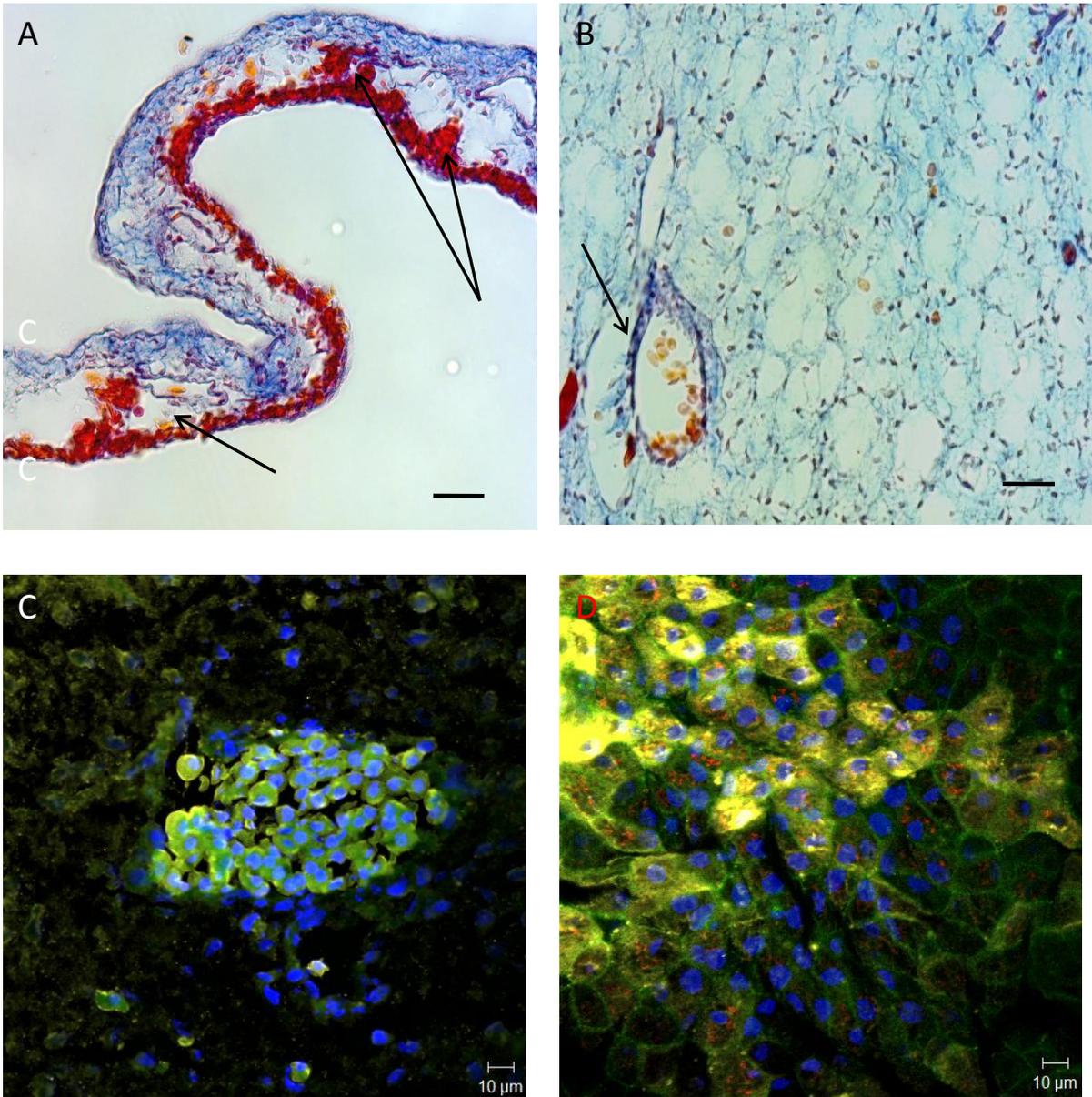


Abbildung 16: Morphologische Untersuchungen der CAM an Entwicklungstag 12

A, B: Azanfärbungen von 4 µm dicken Mikrotomschnitten: A: Vertikalschnitt, B: Horizontalschnitt. Die Färbung zeigt die oberflächliche, zellreiche, ektodermale Schicht der CAM in der kleine Kapillaren ziehen (A). Tiefere Schichten enthalten kollagenes Bindegewebe, in welches größere Gefäße eingebettet sind (B). Die Pfeile in A und B deuten auf Blutgefäße hin. C: Immunfluoreszenzfärbung eines 10 µm dicken Kryoschnitts D: *whole-mount*-Präparat. In grün ist Phalloidin, in gelb sind rote Blutkörperchen des Huhns, in rot Lektin und in blau DAPI dargestellt. Die CAM-Endothelzellen lassen sich nicht mit Lektin anfärben, jedoch zeigen interstitielle CAM-Zellen eine leichte Positivität. C und D stellen unterschiedliche Ebenen der CAM dar.

Maßstabsbalken: 100 µm (A, B), 10 µm (C,D)

3.3 Positivkontrolle der Induzierbarkeit des Chorioallantoismembran-Gefäßwachstums

Die Induzierbarkeit von gerichtetem Gefäßwachstum wurde anhand eines mit FGF-2, VEGF-A sowie mit Tb4 vollgesogenem Gelatineschwamm getestet. Dabei wurden folgende Substanzmengen eingesetzt: 2 µg FGF-2, 350 ng Tb4 oder unterschiedliche Dosen VEGF-A (0,5-3 µg).

3.3.1 Fotoserie

FGF-2- und Tb4-Präparate zeigten eine sequentielle Zunahme der Gefäßdichte vom ersten bis zum vierten Tag. Bei den VEGF-A-Präparaten war dies in etwa fünf Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen VEGF-A nicht zu beobachten. Am vierten Tag waren die Gefäße wie die Speichen eines Rads um den zentralen Schwamm herum angeordnet. Der Schwamm wurde im Laufe der Inkubation kalkweiß und erschien gegen Ende trocken. Das induzierte Gefäßwachstum zeichnete sich deswegen als solches gegenüber dem physiologischen aus, da es gerichtet ist. Nach 96 Stunden war außerdem deutlich zu sehen, wie direkt um den Schwamm herum die Kapillaren im Gegensatz zu einer weit entfernten Stelle sehr viel dichter gewachsen waren. Bei genauem Hinsehen waren die eigentlich dünnen Kapillaren direkt um den Schwamm herum geweitet. In Abbildung 17 ist ein auf die CAM aufgebrachter Schwamm mit FGF-2 vor und nach Ablauf von vier Tagen dargestellt. Ähnlich sieht die Entwicklung eines mit Tb4 vollgesogenen Schwamms aus.

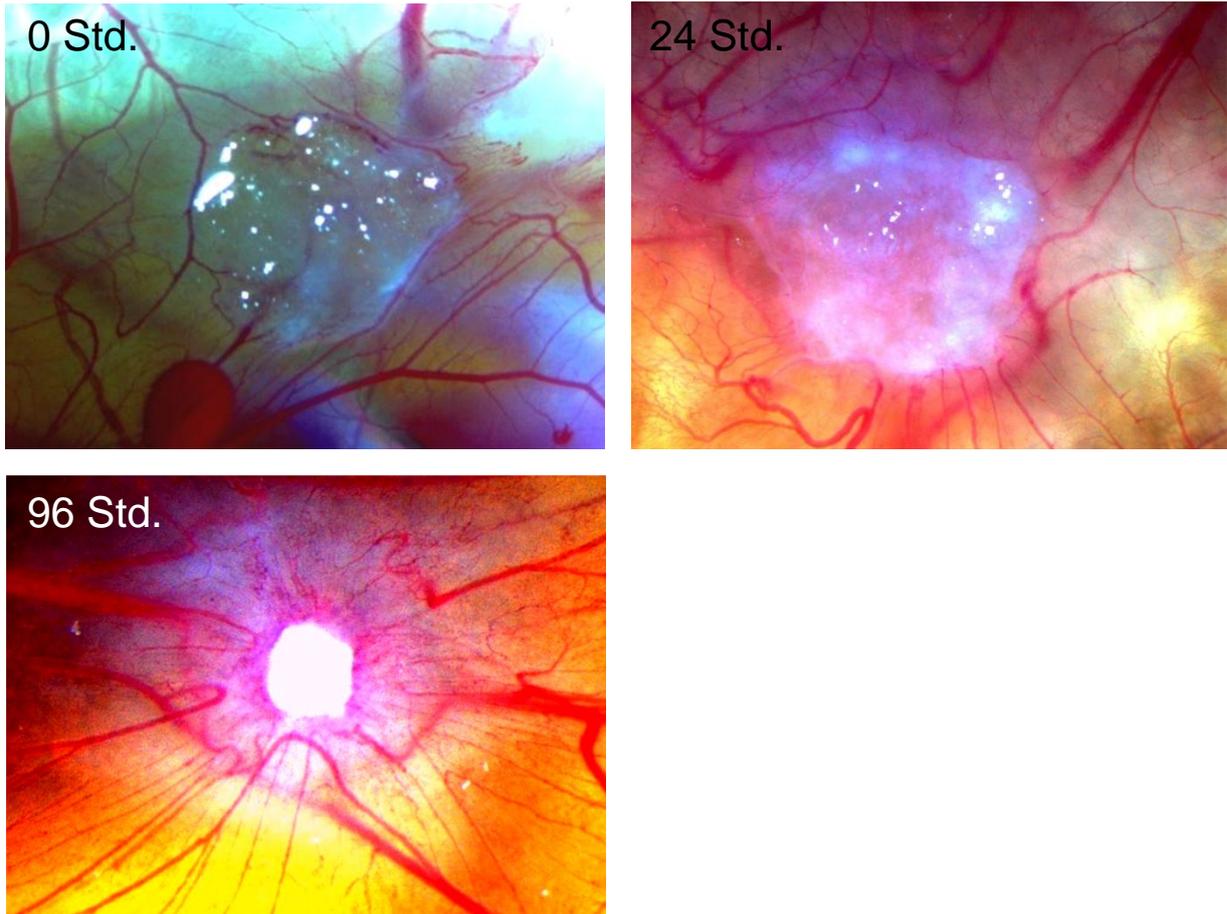


Abbildung 17: Positivkontrolle der Induzierbarkeit des CAM-Gefäßwachstums

Fotos eines mit 2 µg FGF-2 vollgesogenen Gelatineschwamms auf der 8-12 Tage alten CAM am Tag 0, 1 und 4. Nach 96 Stunden waren die Kapillaren direkt um den Schwamm im Gegensatz zu einer weit entfernten Stelle sehr viel dichter gewachsen. Der Querschnitt des Schwamms beträgt etwa 3 mm².

3.3.2 Lichtmikroskopie

In Azanfärbungen war das Schwammtrabekelwerk deutlich in rot zu erkennen. Die Zwischenräume waren voller Zellen und vereinzelt Kapillaren (siehe Abb. 18 A, Pfeile). Die intravasalen roten Blutkörperchen, an der roten Farbe zu erkennen (siehe Abb. 18 A, Sternchen), hatten eine Größe von etwa 7-10 µm. Wie die in tiefen Schichten der CAM liegenden Zellen (siehe Abb. 18 A, B), waren die meisten Zellen nur schwach mit dem Zytoplasma-Farbstoff Goldorange angefärbt.

3.3.3 Konfokale Lasermikroskopie

Immunfluoreszenzfärbungen von 10 µm dicken Kryoschnitte ergaben ein zellreiches Infiltrat analog dem aus der Paraffin-Histologie gewonnenem Bild. Kapillaren waren auch hier zu finden, wie die deutliche Färbbarkeit der Hühnererythrozyten mit dem

aRBC-Antikörper zeigt. Das membranständige Färbemuster entsprach dem der differenzierten Erythrozyten, Abbildung 18 B. Das Differentialinterferenzkontrastbild (DIC) dieses Areals zeigte die zellfreien Bereiche, wo sich das Trabekelwerk befand.

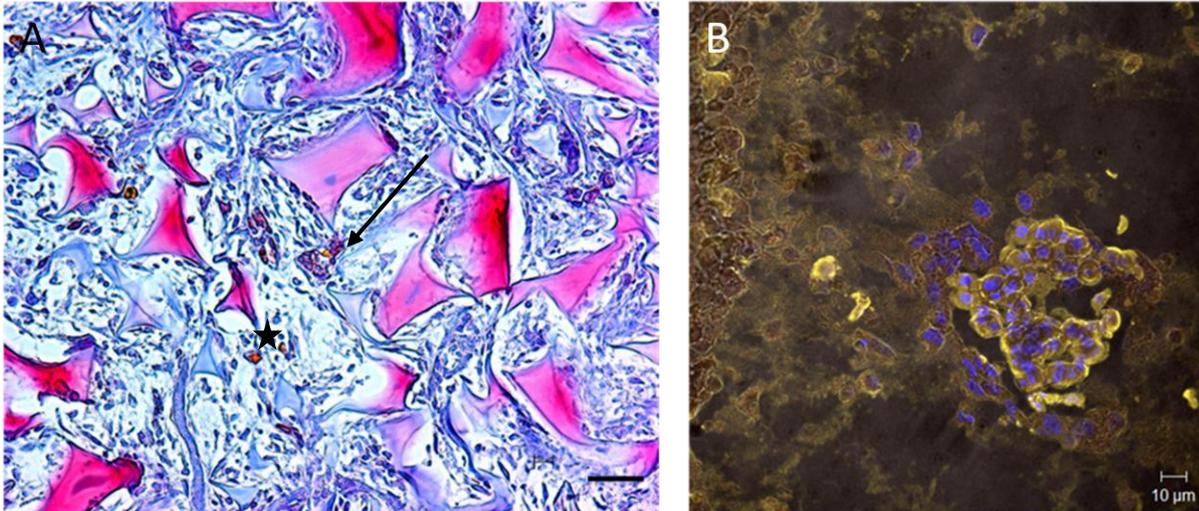


Abbildung 18: Positivkontrolle der Induzierbarkeit des CAM-Gefäßwachstums

Mikroskopische Untersuchungen der Innenstruktur des mit FGF-2 vollgesogenen Gelatineschwamms nach 96 Stunden auf der CAM. A: Azanfärbung eines von 4 µm dicken Mikrotomschnitts B: Immunfluoreszenzfärbung eines 10 µm dicken Kryoschnitts. In gelb sind rote Blutkörperchen des Huhns, in rot Lektin und in blau DAPI dargestellt. Dem mittels konfokaler Lasermikroskopie generiertem Bild wurde *Differential Interference Contrast* (DIC) aufgelagert. Der Pfeil deutet auf eine eingesprossende Kapillare hin, rundherum waren weitere auszumachen. Das Sternchen zeigt auf Hühnererythrozyten. Das Vorhandensein eingesprossener Kapillaren beweist die Möglichkeit vertikalen Gefäßwachstums über die Oberfläche der CAM hinaus. Maßstabsbalken: 100 µm (A), 10 µm (B).

3.4 EHT-Kultivierung auf der CAM

Der CAM-Assay kann *in vitro* sowie *in ovo* ausgeführt werden. Erstes sieht den Transfer des Embryos in eine Plastik Kulturschale an einem frühen Zeitpunkt der Inkubation vor. Letzteres lässt die Embryogenese in der Eischale stattfinden und ermöglicht den Zugang zur CAM sowie deren Beobachtung durch ein Loch am oberen, stumpferen Pol des Eis. Die *in vitro*- Kultivierung ging mit einer höheren Mortalität der Embryonen einher, weswegen die *in ovo*-Kultivierung als Standardarbeitsmethode gewählt wurde. In Abbildung 19 ist die Mortalität während der *in ovo*-Kultivierung dargestellt. Um einen Kompromiss zwischen möglichst langer Inkubationsdauer und möglichst hoher EHT-Explantationsrate von lebendigen CAMs zu wählen, wurden die EHTs standardmäßig vier Tage lang auf der CAM inkubiert. Nach Ausprung et al. (1974) proliferieren die Kapillaren der CAM bis zum elften Entwicklungstag sehr schnell, ab dem elften Tag sinkt der mitotische Index der

Endothelzellen. Die EHT-Implantation schon vor dem achten Tag vorzunehmen, wurde durch die beschränkte Größe der CAM zu dem Zeitpunkt problematisch. Demnach wurde der Inkubationszeitraum von Tag acht bis zwölf der CAM-Entwicklung gewählt. In vorherigen, unveröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das EHT an Entwicklungstag 12 die höchste Kontraktionskraft entwickelte. Demnach wurde die Überführung der EHTs auf die CAM am zwölften Entwicklungstag der EHTs gewählt.

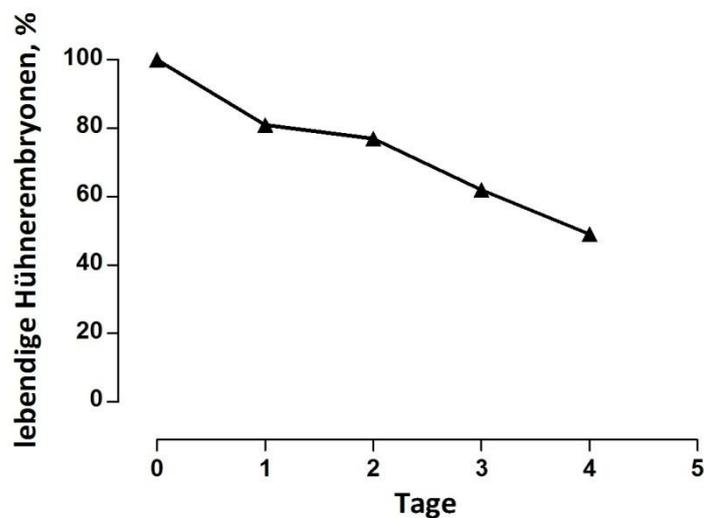


Abbildung 19: Mortalität der Embryonen während *in ovo*-Bebrütung im Rahmen des CAM-Assays nach Öffnung der CAM

Von Tag 0 bis Tag 4 nach der Implantation des EHTs auf die CAM starben etwa 50% aller Embryonen.

3.4.1 Versuche zur Optimierung des EHT-Strukturerhalts

Anfängliche Strukturanalysen von EHTs nach der viertägigen Kultivierungsperiode auf der CAM zeigten degenerierte Kardiomyozyten. Zunächst konnte zwar makroskopisch beobachtet werden, dass Kollagen- sowie Fibrin-EHTs auf der CAM kurz nach der Implantation auch auf der CAM zu kontrahieren anfangen. Am zweiten bis dritten Tag jedoch fingen manche EHTs an zu schrumpfen und auszutrocknen. Diese waren bei Explantation hart und gelblich, während andere Präparate bis zum Tag der Explantation schlagen und ihren ursprünglichen Turgor beibehielten. Damit die Bedingungen auf der CAM einen optimalen Strukturerhalt ermöglichen, wurden unterschiedliche Modifikationen ausprobiert und durch makroskopische und mikroskopische Beobachtungen analysiert.

3.4.1.1 Mechanische Dehnung der EHTs

Schon in früheren Arbeiten wurde die Bedeutung der Dehnung für die EHT-Entwicklung aufgezeigt (Fink et al. 2000). Dies führte zu der Entwicklung eines auf der CAM einsetzbaren Abstandshalters. Dieser musste i) leicht sein und einen kleinen Umfang haben ii) einen Aufbau haben, der die CAM nicht schädigt iii) das EHT spannen und den Kontakt des EHTs mit der CAM gewährleisten iv) autoklavierbar sein. Verschiedene Modelle wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und getestet. Das endgültige Modell bestand aus einem Silikonring, an dem zwei Häkchen zur Aufnahme des EHTs befestigt waren (siehe Abschnitt 2.4.3.2).

3.4.1.2 EHT-Bedeckung mit verschiedenen Materialien

Um die Austrocknung zu verhindern, wurden gedehnte EHTs während der gesamten Inkubationsdauer mit Parafilm, Dialyseschlauch oder mit einem mit EHT-Medium vollgesogenem Gelatineschwamm bedeckt. Hierfür wurde ein mit Ethanol desinfiziertes, 1,5 cm * 0,5 cm großes Stück Parafilm oder Dialyseschlauch so auf das EHT gelegt, dass das EHT an den Längsseiten gut abgedeckt war (siehe Abb. 20 B). Die das Stretcherhäkchen umschlingenden Anteile des EHTs blieben dabei frei. An den Seiten blieb das Material durch Kapillarkräfte fest an der CAM haften. Ein mit EHT-Medium durchtränktes, 1,5 cm * 0,5 cm * 0,1 cm großes Stück Gelatineschwamm wurde hingegen so auf das EHT gelegt, dass das EHT komplett abgedeckt war, einschließlich Stretcherhäkchen und EHT-Enden (siehe Abb. 20 C).

Die Abdeckung mit Parafilm oder Dialyseschlauch verhinderte die Austrocknung nicht und verbesserte damit auch nicht den Strukturerhalt der Kardiomyozyten (siehe Abb. 21 C). Genau wie unbedeckte EHTs wurden ca. die Hälfte aller EHTs nach ca. 48 bis 72 Stunden unter der Bedeckung atroph und sistierten zu kontrahieren. Der Medium-durchtränkte Gelatineschwamm führte zwar zu einem guten Strukturerhalt der Kardiomyozyten (siehe Abb. 21 C, 22 A, B), jedoch ebenso zu einem vorzeitigen Versterben der Hühnerembryonen (70% der Embryonen verstarben vor Ablauf der Inkubationsdauer). Wenige Tropfen EHT Medium auf eine unbelegte CAM führte ebenso zum Versterben der Embryonen. Infolgedessen sah der Standardarbeitsablauf die EHT-Kultivierung auf der CAM nur mit dem Ringstretcher, aber ohne Bedeckung vor.

Tabelle 10: Auswirkung der EHT-Bedeckung auf den Dehydrierungsprozess der Implantate

	Mit Bedeckung (n=14)	Ohne Bedeckung (n=18)	Gesamt
Atroph	9 (64%)	9 (50%)	18 (56%)
Hydriert	4 (29%)	5 (28%)	9 (28%)
Zur Hälfte atrophiert	1 (7%)	4 (22%)	5 (16%)

Der Strukturverlust von Kardiomyozyten während der Inkubationsdauer blieb ein kritischer Punkt und unterlag Schwankungen, die nicht einfach zu kontrollieren waren. Fibrin-EHTs stellten sich als resistenter heraus. Diese Präparate neigten weniger zur Austrocknung und die Zelldichte nach Explantation überwog die der Kollagen-EHTs.

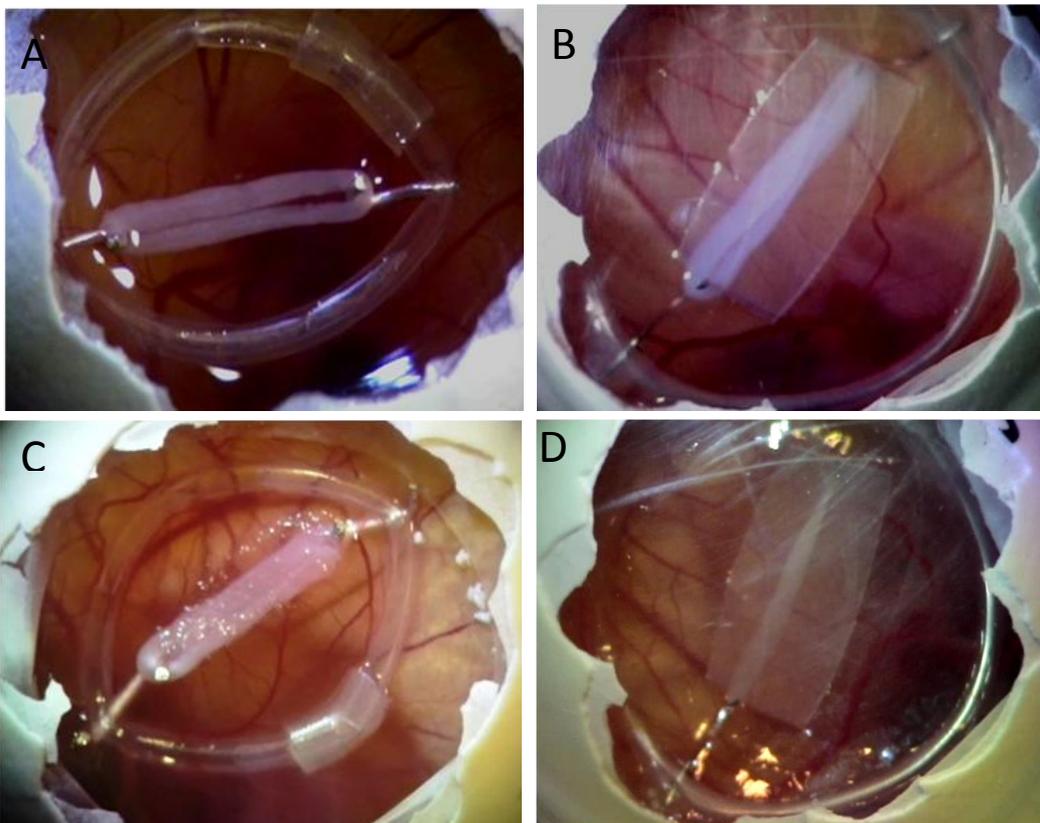


Abbildung 20: Fotos von EHTs in der Ringstretcherapparatur auf der CAM am Tag der Implantation, mit und ohne Bedeckung.

A, B, C: am Tag der Implantation. D: vier Tage nach Implantation. Um die Austrocknung von EHTs während der Inkubationsperiode zu verhindern, wurden

diese versuchsweise mit Parafilm (B, D) oder mit Medium-vollgesogenem Gelatineschwamm bedeckt (C). Der Kontakt der CAM mit EHT-Medium führte zu einer höheren Mortalität der Hühnerembryonen, weswegen dies nicht weiter verfolgt werden konnte. Auch mit Parafilm-bedeckte EHTs neigten zur Austrocknung, was einen Verlust von Flüssigkeit durch Verdunstung unwahrscheinlich macht.

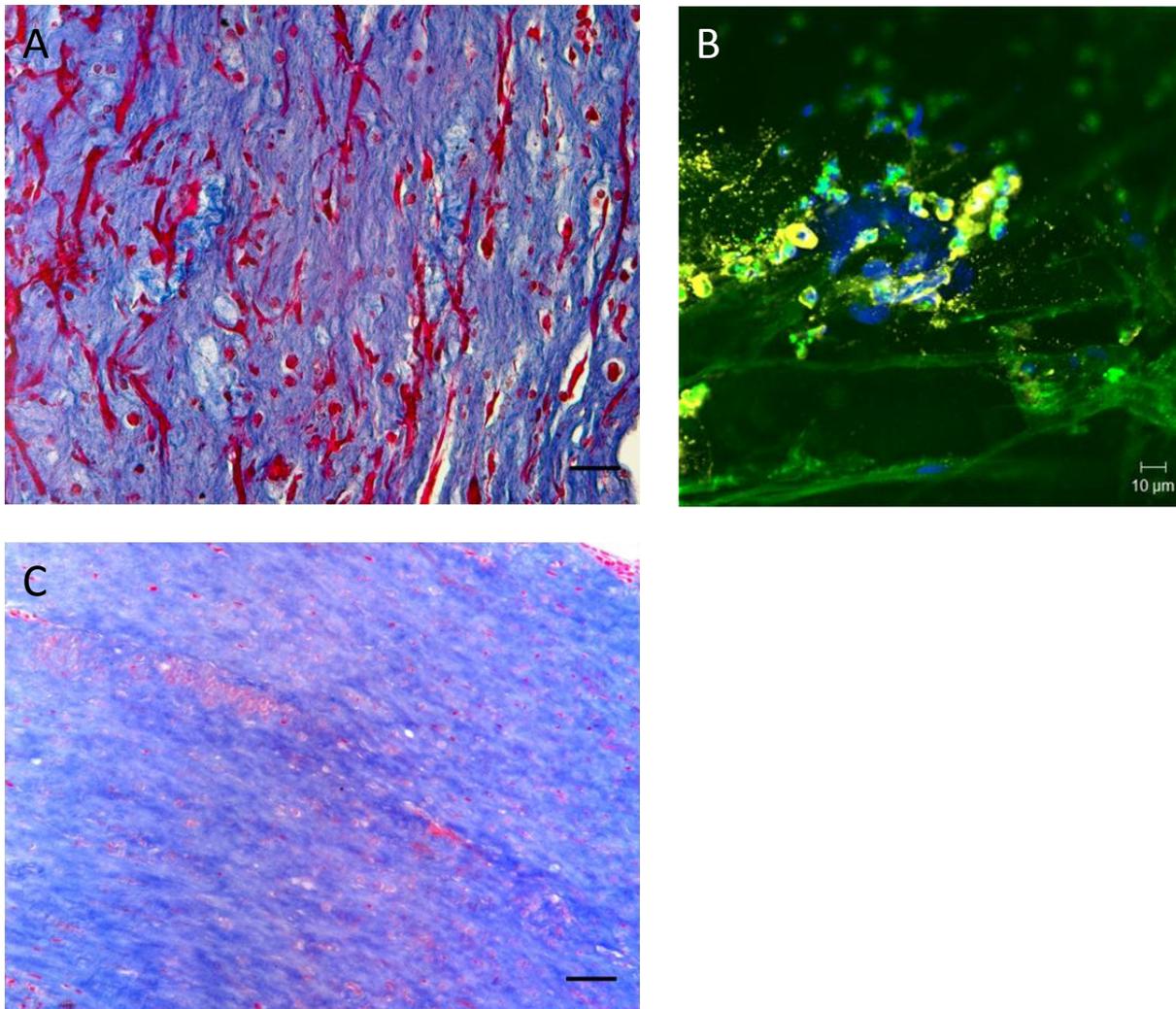


Abbildung 21: Morphologische Untersuchungen von explantierten EHTs, die während der viertägigen Inkubation auf der CAM bedeckt waren.

Azanfärbungen eines 4 µm dicken Mikrotomschnitts (A, C) sowie Immunfluoreszenzfärbung von einem *whole-mount*-EHT. Die Azanfärbung zeigt stark unterschiedliche Kardiomyozytendichten eingelagert in blau angefarbter Kollagen-Matrix, wobei die mit Medium-versorgten EHTs (A, B) größere Zelldichten aufwiesen als die mit Parafilm abgedeckten EHTs. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine kleine Erythrozytenkolonne (anti-RBC, gelb) in der Nähe von Kardiomyozyten (Phalloidin, grün) innerhalb eines mit Medium-versorgten EHTs. In blau ist DAPI dargestellt. Maßstabsbalken: 100 µm (A), 200 µm (C)

3.5 Morphologie der EHTs nach vier Tagen Inkubation auf der CAM

3.5.1 Fotoserie

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, entwickelten sich EHTs auf der CAM unterschiedlich. Einige wurden nach 48-72 Stunden atroph, dünn, trocken und hörten auf zu kontrahieren (siehe Abb. 22 C). Andere kontrahierten bis zur Explantation und blieben bis dahin hydriert, bis auf leichte Schrumpfungen an den Enden, wo das EHT auf den Stretcherhäkchen aufgespannt war (siehe Abb. 22 E). Während der Inkubation bewegten sich die Embryonen unterhalb der CAM heftig, was zu Verschiebungen der CAM führte. Ebenso entwickelte sich die CAM bis zum 18. Tag, ihre Struktur veränderte sich und expandierte. Der Ringstretcher auf der CAM ist diesen Bewegungen stets gefolgt, da die schleimig-klebrige Konsistenz der CAM diesen bei jeder Verschiebung mitzog. Das führte vielfach dazu, dass das EHT nach einigen Tagen von der CAM bedeckt war, da sich diese über das EHT wölbte (siehe Abb. 23 D a,b, E). Mitunter ist das EHT in der CAM versunken, ähnlich wie ein Körper in einer Hängematte. In seltenen Fällen ist der Stretcher sogar mit gesunken. Die Dichte der Gefäße in EHT-Nähe hat, dem physiologischen Wachstum der CAM entsprechend, im Laufe der Inkubation zugenommen. Da dies in der gesamten CAM der Fall war und nicht nur in EHT-Nähe, ist ein angiogenetischer Effekt des EHTs auf die Endothelzellen der CAM anhand der makroskopischen Aufnahmen nicht eindeutig festzustellen. Bei Betrachtung der dichten Gefäßstruktur auf dem EHT in Abbildung 22 Db ist zu beachten, dass an dieser Stelle zwei Schichten CAM aufeinanderliegen. Der Pfeil markiert die Umschlagsfalte der CAM, die sich während der Inkubationszeit über das EHT gelegt hatte. Beim Betrachten des Implantats mit einem Stereomikroskop (ca. 10x Vergrößerung) ist der Erythrozytenfluss in den Kapillaren zu beobachten, wobei man sehen kann, dass die Erythrozyten der pfeilmarkierten Stelle der Umschlagsfalte folgten und umkehren. Der erste Blick ließ ein starkes Gefäßwachstum in das EHT hinein vermuten. Größere Aufnahmen wiesen jedoch lediglich auf eine Überlagerung der CAM auf das EHT hin. Die Explantate zeigten oftmals an der Fläche, die mit der CAM in Verbindung war, dichte Gefäßzeichnungen, wie in Abbildung 22 F dargestellt. Dies war insbesondere bei den Tb4-behandelten Fibrin-EHTs ausgeprägt. Ob während der viertägigen Inkubation Gefäße in das EHT sprossen, wenn auch in kleinerem Maße als die Übersichtsaufnahmen in Abbildung 22 Da, Db, E und F vermuten ließen, wurde mit histologischen Methoden untersucht.

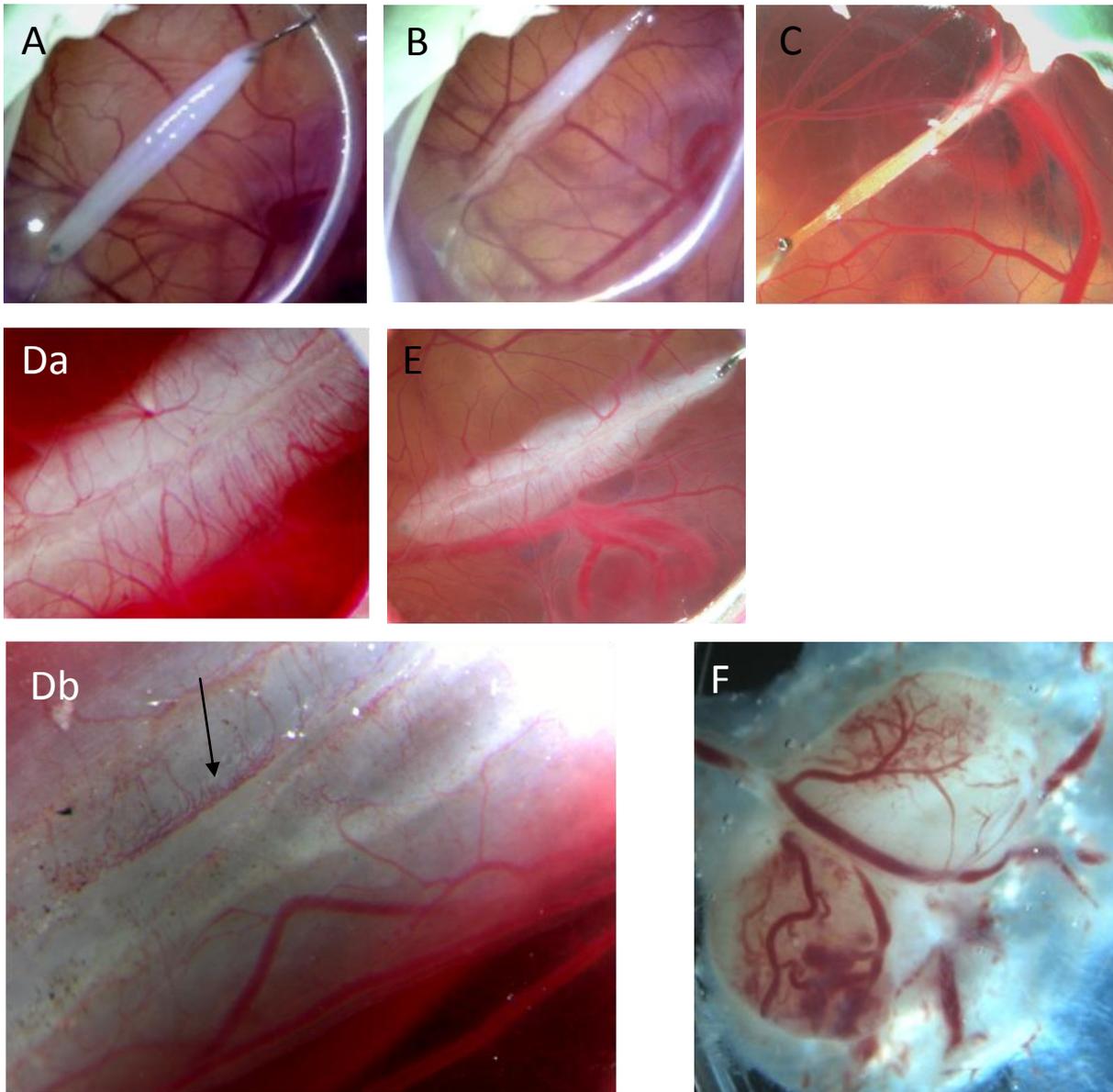


Abbildung 22: Fotos von EHT-Kultivierung auf der CAM

A: Erster Tag, B: dritter Tag, C, D, E: vierter Tag, Kollagen-EHTs auf der CAM. Einige EHTs wurden nach 48-72 Stunden atroph, dünn, trocken und hörten auf zu kontrahieren (C), andere blieben hydriert und kontrahierten bis an das Ende der Inkubationszeit (D, E). Bewegungen des Embryos führten gelegentlich zu einem Versinken des EHTs in die CAM, so dass diese sich über das EHT wölbte (D a, D b, B, E). In Db ist zu beachten, dass an der zwei Schichten CAM aufeinanderliegen, der Pfeil markiert die Umschlagsfalte der CAM. F: Explantat eines Tb4-behandelten Fibrin-EHTs ebenfalls nach viertägiger Kokultur. Die der CAM aufliegende EHT-Fläche ist abgebildet. Die Explantate zeigten oftmals an der Fläche, die mit der CAM in Verbindung war, dichte Gefäßzeichnungen, dies war insbesondere bei den Tb4-behandelten Fibrin-EHTs ausgeprägt.

3.5.2 Lichtmikroskopie

Die Paraffinschnitte der EHTs wurden in einer Ebene angefertigt, so dass die beiden Arme des EHTs längs nebeneinander lagen. Die Paraffinschnitte wurden mit H.-E. sowie Azan gefärbt und mit den Färbungen der nativen EHTs verglichen. Dies ermöglichte eine Unterscheidung zwischen EHT-eigenen Strukturen und Reaktionen der CAM auf das EHT, die möglicherweise Gefäßeinsprossungen ähneln.

3.5.2.1 Kollagen-EHTs

Abbildung 23 und 24 zeigen den Zustand von unterschiedlichen Entwicklungsprozessen nach vier Tagen Inkubation auf der CAM. Die intensive Blaufärbung des kollagenen Bindegewebes lässt zwischen CAM- und EHT-Areal unterscheiden. Gedehte sowie ungedehnte EHTs wurden den histologischen Aufbereitungen unterzogen und sind hier dargestellt. Abbildung 25 A, C, D, E und F stellen nicht-gedehnte EHTs in H.-E.-Färbungen dar. In Abbildung 23 A, B und C, 24 A sowie 25 B und G sind gedehnte EHTs mit Azan gefärbt dargestellt.

Ein Vergleich zwischen der EHT-Struktur vor und nach der Kokultur ist in Abbildung 23 veranschaulicht. Zunächst fiel an den Färbungen auf, dass in den meisten Kollagen-EHTs die Zelldichte und -größe während der viertägigen Kokultur abgenommen hatte (siehe Abb. 23 B). Hier war das kollagene Bindegewebe durchsetzt mit größtenteils kleinen runden Zellen, spärlich ausgestreckten Zellen und vermehrt nekrotischen Zellen und Zellresten. In etwa 10% der EHTs war selbst nach den vier Tagen die Kardiomyozytenstruktur gut erhalten (siehe Abb. 23 C).

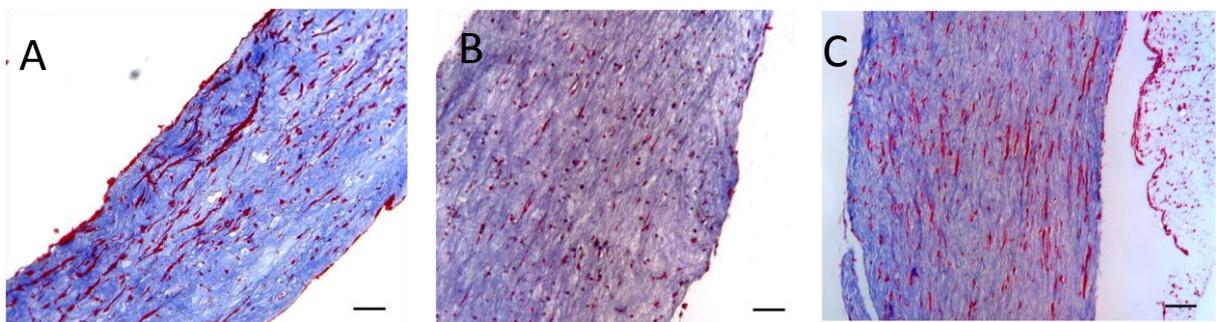


Abbildung 23: Vergleich von Kollagen-EHTs vor und nach der viertägigen Inkubation auf der CAM

Die Azanfärbung zeigt intensiv blau gefärbtes kollagenes Bindegewebe mit eingelagerten Kardiomyozyten. Vor der Inkubation (A) war die Zelldichte sehr viel höher als in den meisten Explantaten (B), in wenigen Explantaten (ca. 10%) war die Zellkonzentration nach Explantation jedoch vergleichbar mit der vor Implantation (C). Maßstabsbalken: 200 µm

Zwischen EHT und CAM zu sehen (siehe Abb. 23 B und C). Etwa 20% der EHTs

zeigten unregelmäßige, etwa 10 µm ins EHT reichende Zellassoziationen. Zellen in diesen Arealen zeigten lang ausgestreckte Ausläufer, zwischen ihnen lagen ungefärbte Bereiche (siehe Abb. 24 Ab). Es könnte sich um ein Gefäßlumen mit wenigen Erythrozyten (siehe Abb. 24 Ab, Sternchen) und endothelialer Begrenzung (siehe Abb. 24 Ab, Pfeil) handeln. Weitere Pfeile weisen auf CAM-Gefäße in unmittelbarer Nähe zum EHT hin. Diese randständigen Veränderungen zeigen jedoch nicht eindeutig, ob es sich um EHT-eigenes Zellmaterial oder tatsächlich um Reaktionen der CAM auf das EHT handelte.

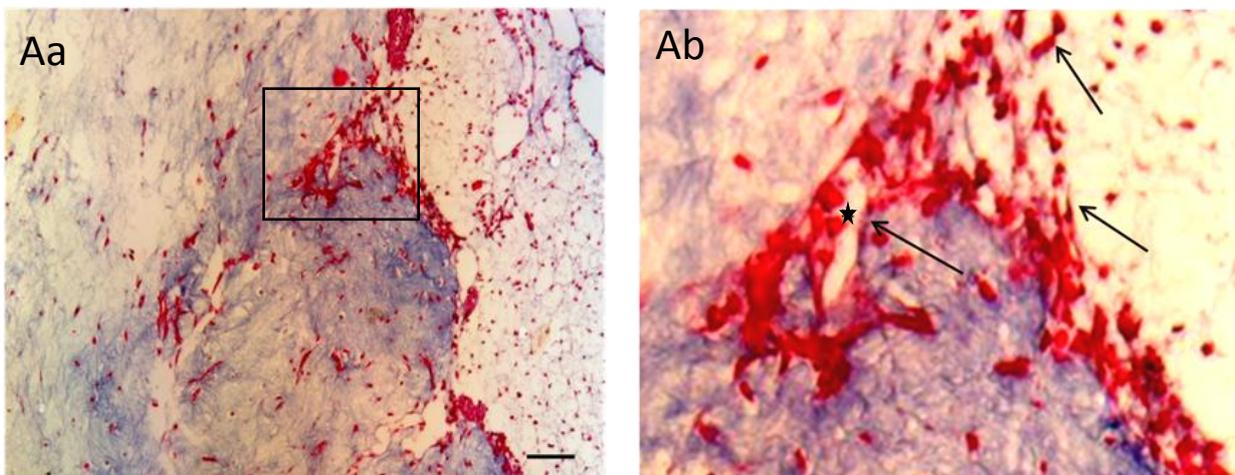


Abbildung 24: Morphologische Untersuchungen von Kollagen-EHTs nach vier Tagen Inkubation auf der CAM

Azan-Färbungen, Ab entspricht dem gekennzeichneten Ausschnitt aus Aa. Die Pfeile deuten auf mutmaßliche Blutgefäße hin, welche ausgehend von der CAM (links von dem EHT durch dessen intensive Blaufärbung abgrenzbar) eine kleine Strecke in das EHT hineinsprossen. In Ab ist eine Lumenbildung zwischen Zellen erkennbar, vermutlich Endothelzellen. Das Sternchen zeigt auf einen Erythrozyten, der sich in einem Gefäß im EHT befindet. Maßstabsbalken: 200 µm (Aa),

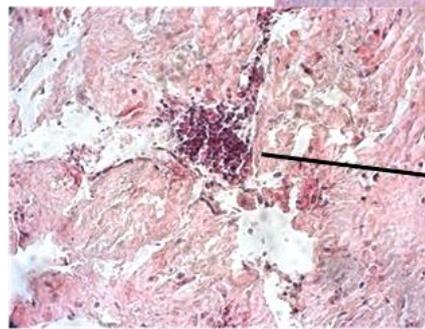
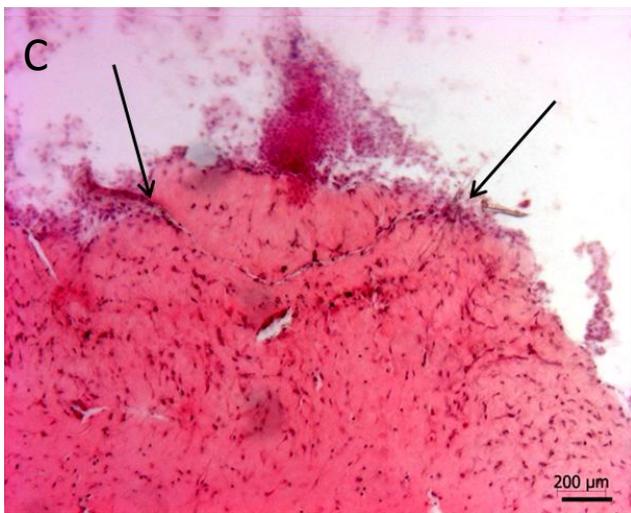
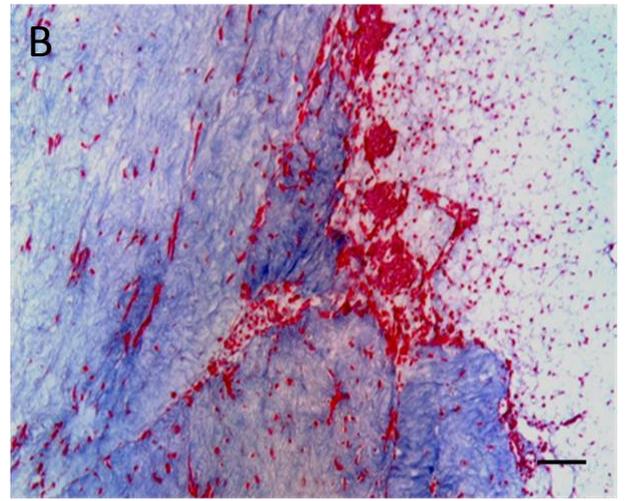
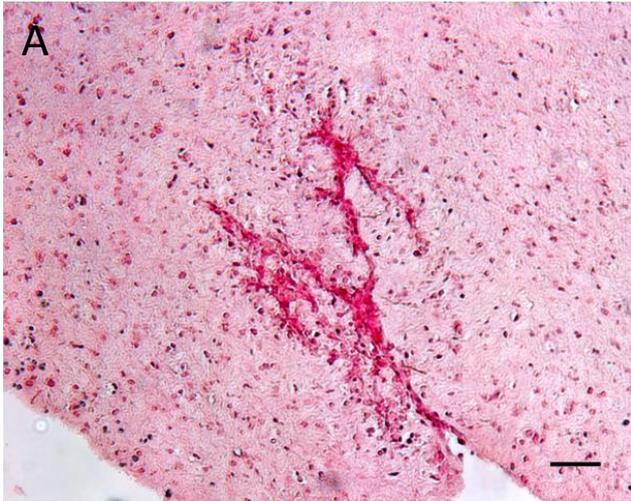
Die restlichen 50% der Präparate zeigten Veränderungen, die aufgrund ihres Größenumfangs, der Zellmorphologie und –assoziationen eindeutig als Einwüchse von Seiten der CAM in das das EHT zu deuten sind. Die Veränderungen waren unterschiedlicher Morphologie, exemplarisch werden im Folgenden einige beschrieben und veranschaulicht (siehe Abb. 25).

In Abbildung 25 A fiel die eosinophile, schmale, weit ins Gewebe hineinreichende, verzweigt verlaufende Zellreihe auf. Die Zellreihe stand in Verbindung mit dem Rand

des EHTs, was an die CAM als Ursprung dieser Zellen wahrscheinlich machte. Die Zellen besaßen Ausläufer. Eine Lumenbildung oder Erythrozyten waren in dieser sowie den anliegenden Schnittebenen in diesem EHT nicht auszumachen. Das EHT enthielt keine ausgestreckten Kardiomyozyten mehr. Im Gegensatz zu Abbildung 25 A ist die CAM in Abbildung 25 B während der Explantation anhaftend geblieben und als solches dargestellt. An der Schnittfläche zwischen EHT und CAM waren auf CAM-Seite zahlreiche mit Erythrozyten gefüllte Gefäße getroffen. In der Bildmitte war eine Schar Zellen getroffen, die sich in einem scharf umgrenzten Bereich im EHT befanden. Einige Zellen migrierten weiter ins EHT-Innere hinein. Die Morphologie der Zellen ähnelte der kernhaltigen Erythrozyten in den CAM-Gefäßen, was auf einen angiogenetischen Prozess hindeutet. Im EHT befanden sich einige ausgestreckte, große Kardiomyozyten. Das in Abbildung 25 C dargestellte Präparat ist ein EHT-Endstück, die CAM war auch hier beim Explantationsprozess anhaften geblieben. Quer durch das EHT zog eine feine lumenbildende Zellreihe die an zwei Stellen mit der CAM in Verbindung stand (siehe Abb. 25 C, Pfeile). In diesem EHT waren die Kardiomyozyten während der Inkubationsphase degeneriert. Abbildung 25 D zeigt eine Übersichtsaufnahme, so dass die Lokalisation des vergrößert dargestellten Bereichs im Verhältnis zum gesamten EHT zu sehen ist. Das zwischen den EHT-Armen gelegene dunkel lila angefärbte Areal zeigte CAM-Zellen, wahrscheinlich ein Gefäß, welches kernhaltige Blutzellen führte. Der vergrößert dargestellte Zellhaufen im EHT wies eine sehr ähnliche Zellzusammensetzung und -morphologie auf und war klar vom EHT-Gewebe abgegrenzt. Zusammengenommen ließ dies die Invasion eines CAM-Gefäßes in das EHT vermuten oder eine Invagination eines CAM-Zapfens in das EHT. Die Entwicklungen an der Schnittstelle zwischen CAM und EHT konnten auch zu wie in Abbildung 25 E und F dargestellten Umwandlungen führen. In Abbildung 25 E war das EHT Gewebe breitbasig zersetzt durch eine Zellmasse, die CAM-Material ähnelte. Zwischengelagert befanden sich eosinophile EHT-Extrazellulärmatrix. Die invadierende Zellmasse durchsetzte kollagenes Bindegewebe. In Abbildung 26 F lagen zwischen den Invasionsfronten, die sich bis zur EHT-Mitte „fraßen“, gebündelte, längs orientierte und vital erscheinende Kardiomyozyten. Die Invasionsfront ist in der unteren Hälfte locker strukturiert, führt einzelne Blutgefäße und grenzt sich deutlich vom kollagenen EHT-Bindegewebe ab. Im oberen Teil sind dem invadierenden Material vital aussehende Kardiomyozyten zwischengelagert.

Zusammenfassend ließen sich folgende Punkte festhalten:

- Die meisten EHTs litten unter den Kulturbedingungen auf der CAM, es waren nicht mehr viele vitale Kardiomyozyten aufzufinden.
- Etwa 30% der Präparate zeigten gar keine Reaktionen der CAM auf das EHT.
- Etwa 20% der Präparate enthielten kleine, auffallende Strukturveränderungen an der Schnittstelle zwischen CAM und EHT, die möglicherweise angiogenetische Prozesse darstellten.
- Die restlichen 50% der Explantate enthielten deutliche Reaktionen, die sich von klar formierten, gut umgrenzten und EHT-Struktur erhaltenden, bis hin zu zersetzenden, invadierenden Morphologien erstreckten. Am vierten Tag stellten sich diese Veränderungen als Blutgefäße oder großflächige Migrationsfronten dar.
- Die Entwicklungen an der Kontaktfläche zwischen CAM und EHT unterlagen keiner Regelmäßigkeit.



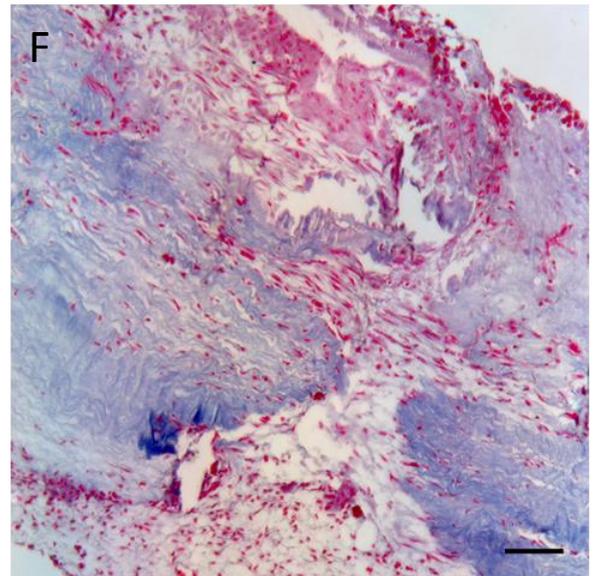
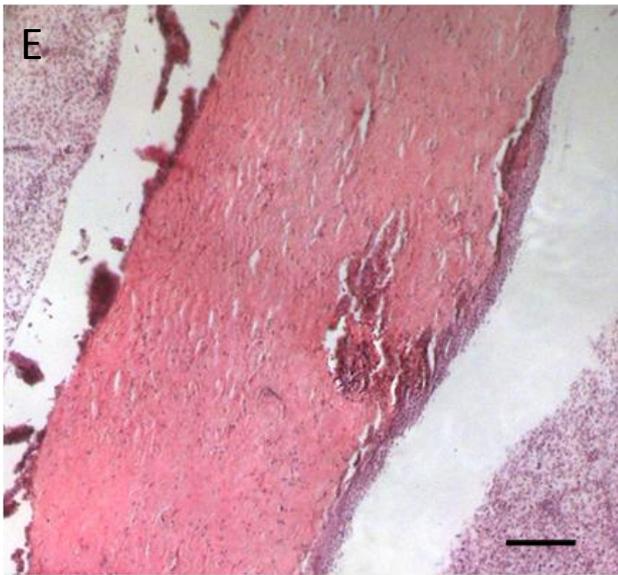
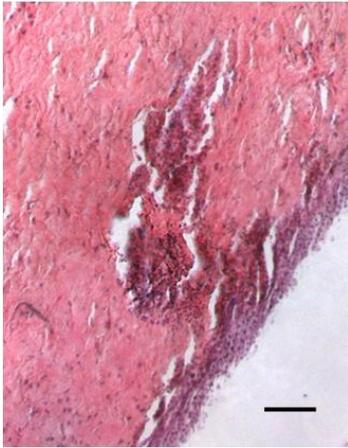


Abbildung 25: Morphologische Untersuchungen von Kollagen-EHTs nach vier Tagen Inkubation auf der CAM

Darstellung repräsentativer Exemplare von EHT-Explantaten die eindeutig CAM-Zellinvasionen enthielten. 25% aller Exemplare zeigten weitreichende CAM-Zell Invasionen, welche sich als Streifen eosinophiler Zellen migratorischen Phänotyps (A), Erythrozytenkolonnen (C) oder zellulär begrenzten Ansammlungen roter Blutkörperchen in blau angefärbten kollagenen Matrix darstellten (B). 25% aller Explantate zeigten jedoch großflächige destrukturierende Invasionen (D, E, F) die in ihrer Organisation zwar nicht einem Gefäßsystem ähnelten, jedoch vereinzelt Kapillaren enthielten (F) und sich ebenso durch das kollagene Bindegewebe drängten und somit die EHT-Struktur zersetzten.

Azan Färbungen (B, G) und H.-E.-Färbungen (A, C, D, E, F). Maßstabsbalken: 100 µm (A, B, F), 200 µm (C), 1000 µm (D, E).

3.5.2.2 Fibrin-EHTs

Die Abbildung 26 A-D zeigt den Zustand von unterschiedlichen Entwicklungsprozessen nach vier Tagen Inkubation auf der CAM. Azan färbt Fibrin-EZM rot an. Es sind ausschließlich EHTs präsentiert, die auf der CAM mechanisch gedehnt wurden.

Bei den Fibrin-Explantaten fiel auf, dass die Kardiomyozytenstruktur besonders in den EHT-Randbereichen gut erhalten war. Die Kardiomyozyten verliefen in dicken parallelen Strängen (siehe Abb. 26 B, C, Pfeile). Zum Zentrum des EHTs hin waren kaum noch Zellen zu finden, allerdings nekrotische Zellreste. Die Rotfärbung des EHTs wies flächenhaft unterschiedliche Intensitäten auf, was dafür spricht, dass das Fibrin in den EHTs, die vier Tage auf der CAM lagen, unterschiedlich verteilt war. Lokale Kollagen-Produktionen, wie in nativen Präparaten, waren hier nicht vermehrt zu finden.

Die Reaktionen der CAM auf das EHT ähnelten denen in der Gruppe der Kollagen-EHTs: Es waren kleine invadierende Zelltruppen an der Kontaktfläche zwischen CAM und EHT bis hin zu einer Auflösung der Fibrinmatrix und Durchsetzung des EHT-Gewebes mit CAM-Material zu finden. Abbildung 26 A stellt eine etwa 150 µm weit ins EHT ziehende Ansammlung von monomorphen, kleinen, runden Zellen dar, die in ihrem Gesamten gut gegen die EHT-EZM abgegrenzt sind. Vermutlich handelt es sich um mikrovaskuläres Wachstum ins EHT hinein. Ebenso ist in Abbildung 26 C an der Kontaktfläche zwischen EHT und CAM, jedoch etwa 100 µm ins EHT hineinreichend kleine Ansammlungen von runden, kleinen gut abgegrenzten Zellen dargestellt, vermutlich handelt es sich hierbei um quer angeschnittene Gefäße. Abbildung 26 B und D veranschaulichen, wie das EHT in der Nähe der CAM Kardiomyozyten enthielt, wohingegen im Inneren die Fibrinstruktur sich zu lösen schien und nur noch wenige atrophe Zellen enthielt. Abbildung 26 E hingegen zeigt ein Explantat, dessen Struktur stark aufgelockert war. Zwischen Kardiomyozytensträngen (siehe Abb. 26 Ea, Pfeil) lag disseminiert CAM-Material: einzelne sinusoide Blutgefäße, die Erythrozyten enthielten (siehe Abb. Eb, Sternchen). Letzteres wies auf einen angiogenetischen Prozess hin.

Die Veränderungen in Fibrin-EHTs während der viertägigen Inkubation auf der CAM lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Konservierung der Kardiomyozytenstruktur war in der Nähe der CAM am stärksten.

- Die Quantität und Qualität an angiogenetischen bzw. migrierenden, invadierenden Prozessen von der CAM aus in das EHT ähnelte der der Kollagen-EHTs
 - ➔ Etwa 30% der Präparate zeigten gar keine Reaktion der CAM auf das EHT. Etwa 20% der Präparate enthielten kleine auffallende Strukturveränderungen an der Kontaktfläche zwischen CAM und EHT. Die restlichen 50% der Explantate enthielten deutliche Reaktionen, die einen zersetzenden und invadierenden Charakter hatten.
- Die Fibrinmatrix war an den Zersetzungsfronten aufgelockert und zeigte zahlreiche Leerräume auf.

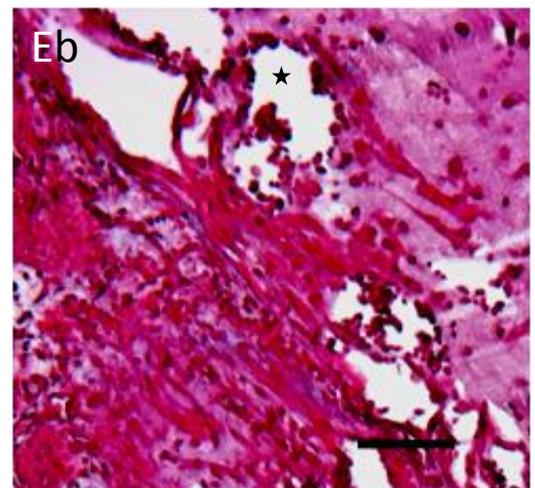
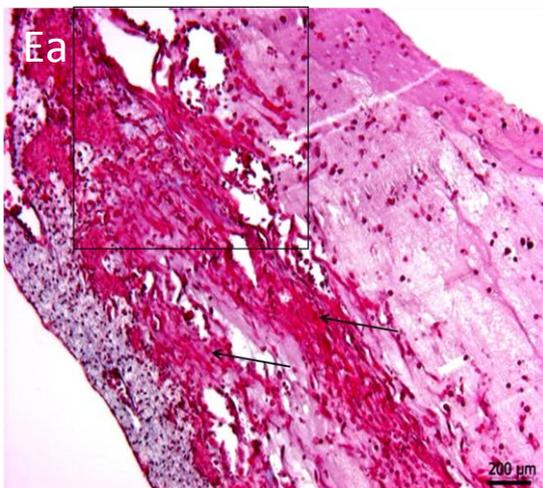
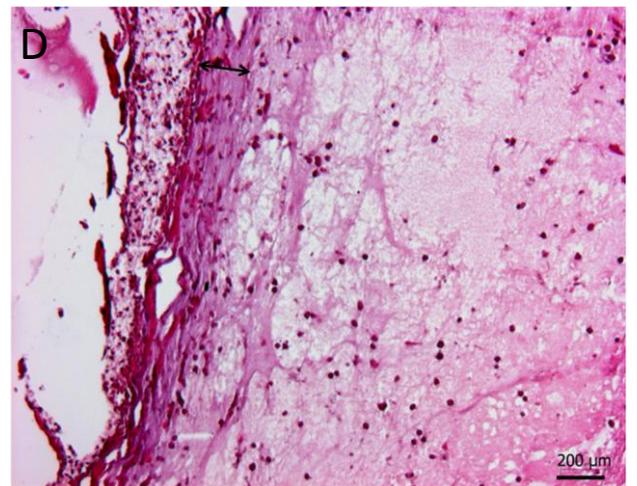
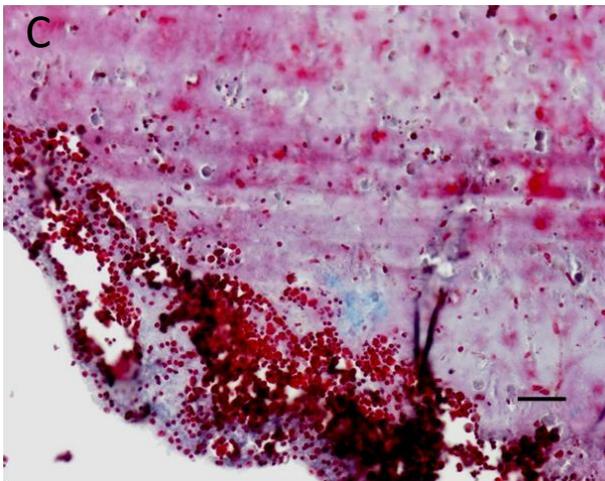
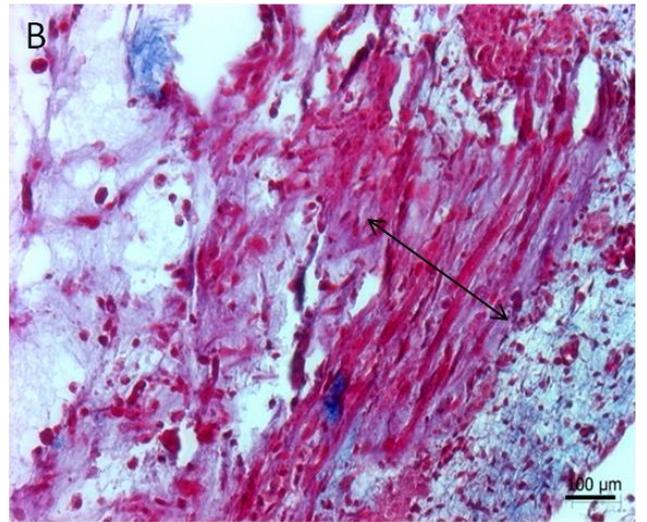
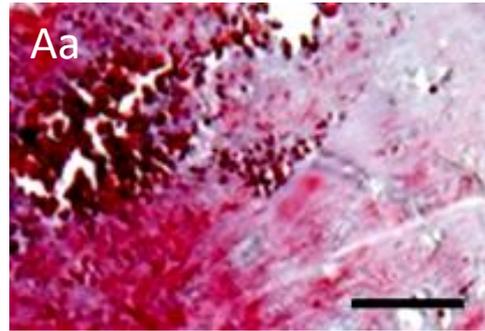
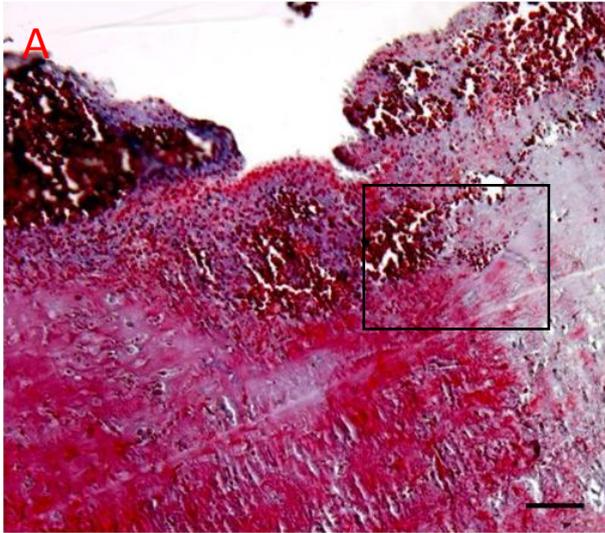


Abbildung 26: Morphologische Untersuchungen von Fibrin-EHTs nach vier Tagen Inkubation auf der CAM

Die CAM-Zell Einwüchse in Kollagen-EHTs während der viertägigen Inkubation ähnelten qualitativ und im quantitativen Verhältniss zueinander derjenigen der Kollagen-EHTs. Etwa 30% aller Explantate zeigten keine Einwüchse jedoch eine an der Grenze zur CAM höhere Zellkonzentration (B, D), während 20% aller Exemplare dezente Veränderungen der EHT-Grenze aufzeigten, die im Querschnitt angeschnittenen Gefäßen ähnelten (C). 25% zeigten prominentere CAM-Zell Invasionen, welche sich als zellulär begrenzte Ansammlungen roter Blutkörperchen inmitten der fibrinösen Matrix darstellten (A, und vergrößerter Ausschnitt aus A, Aa). 25% aller Explantate zeigten jedoch großflächige destruirende Invasionen ähnlich denen der Kollagen-EHTs (E) die das EHT durchsetzten mit weitulmigen Gefäßen (E und vergrößerter Ausschnitt aus E, Eb). In der Nähe dieser weitulmigen Gefäße waren viele ausgestreckte Kardiomyozyten zu sehen. Azan Färbungen von Fibrin-EHTs (B, D, Ea und Eb) und mit Tb4-suplementierten Fibrin-EHTs (A, C). Maßstabsbalken: 100 µm (B und C), 200 µm (Aa, Ab, D und Ea, Eb).

3.5.3 Konfokale Lasermikroskopie

Für die konfokale Lasermikroskopie wurden zahlreiche *whole-mount* Präparate von Kollagen-EHTs und 150 µm dicke Vibratomschnitte von Fibrin-EHTs mit an FITC-gekoppeltem Phalloidin (zur Darstellung von Aktinvorkommen im Zytoskelett aller Zellen sowie im Sarkomer der Herzmuskelzellen), an TRITC-gekoppeltem Endothel-spezifischen Lektin (zur Darstellung von Endothelzellen), Alexa 488 zur Darstellung der Bindung von *anti-red-blood-cell*-Antikörper sowie DAPI zur Kerndarstellung gefärbt.

3.5.3.1 Kollagen-EHTs

In Abbildung 27 sind Immunfluoreszenzfärbungen von Kollagen-EHT-Explantaten dargestellt. Analog zu den Erkenntnissen aus der Lichtmikroskopie sind in Kollagen-EHTs nach viertägiger Inkubation auf der CAM die Kardiomyozyten unterschiedlich gut erhalten.

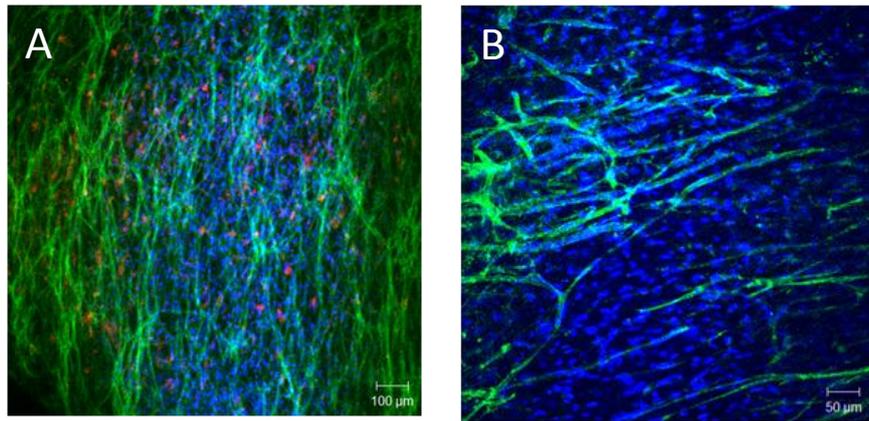


Abbildung 27: Vergleich von Kollagen-EHTs

Immunfluoreszenzfärbungen von Kollagen-EHTs vor (A) und nach (B) der viertägigen Inkubation auf der CAM. In grün ist Phalloidin und in blau ist DAPI dargestellt. Die Kardiomyozytendichte hat innerhalb der Inkubationsperiode abgenommen. Maßstabsbalken: 100 µm (A), 50 µm (B).

Die in nativen EHTs größtenteils disseminierten, manchmal zu Strängen organisierten Lektin-positiven Endothelzellen waren in EHTs nach vier Tagen Inkubation auf der CAM in gleichem Maße wiederzufinden. Im Gegensatz zu den Kardiomyozyten blieben diese Zellstrukturen während der Inkubation unverändert. Abbildung 28 D und E zeigen dasselbe Präparat in unterschiedlichen konfokalen Ebenen. Die oberflächlichere Ebene (D) zeigt disseminiert vorliegende Endothelzellen, die sich in der tieferen Schicht (E) zu Strängen assoziierten. Diese Zellaggregate waren meistens in Nestern angeordnet und eng assoziiert mit Kardiomyozyten, wie in Abbildung 28 D, E und F zu sehen. Bei der Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen von EHT-Explantaten wurde nach Hühnererythrozytenassoziationen innerhalb des EHTs gesucht. Es wurden Hühnererythrozyten in unterschiedlichen Aggregationen gefunden: In Abbildung 28 A und B sind Hühnererythrozyten im EHT gezeigt, die sich mit Lektin-positiven Zellen zusammengelagert haben. In Abbildung 28 A wurde die Erythrozytenansammlung von Lektin positiven Zellen umgrenzt, möglicherweise aus dem EHT stammende Endothelzellen. Da dem Lektin-Signal jedoch kein Zellkern zugeordnet werden konnte, ist keine eindeutige Aussage zu treffen, ob es sich tatsächlich um Endothelzellen handelte. In Abbildung 28 B ist ein längliches Konglomerat von Hühnererythrozyten mit Lektin-positiven Zellen abgebildet, die weniger organisiert waren. Diese Lektin-positiven, kernhaltigen Zellen wanden sich um die Hühnererythrozyten, es hätte sich um eine entwickelnde Gefäßstruktur handeln können. Die in Abbildung 28 C dargestellte Entwicklung ähnelt derjenigen, die in

Abbildung 25 B dargestellt ist. Vom Rand des EHTs aus wandern Erythrozyten in einer kleinen Kolonne in das EHT ein. Da die Kardiomyozytenstruktur in etwa 90% der Explantate degeneriert war, waren in der Nähe solcher Migrationen keine oder nur wenige, atrophe Kardiomyozyten anzutreffen, wie in Abbildung 28 A, B und C. Ein Areal mit ähnlich wie in Abbildung 25 A, B und C migrierenden CAM-Zellen ist in Abbildung 28 G und H abgebildet. Hier überlappten sich Lektin- und *anti-red blood cell*-Antikörper-Signal in den Zellen, die sich in einer schmalen Kolonne durch das Kardiomyozytengewebe wandern. In Abbildung 28 G und H war die membranständige Färbung des *anti-red blood cell*-Antikörpers aufgehoben und durch ein punktförmiges Muster ersetzt, welches evtl. Membranarealen entspricht. Darüber hinaus war das *anti-red-blood-cell*-Signal manchmal wie in Abbildung 28 B und C verwischt. Wie in Paraffinhistologien war auch hier zersetzendes, grobflächig in das EHT einwandernde CAM-Material zu finden (siehe Abb. 28 H). Hier waren *anti-red blood cell*-Antikörper positive Zellen gezeigt, die anstelle von dem kugelrunden, kleinen, etwa 7-8 µm großen Zellkörpern eine am ehesten extravasalen Anteilen der CAM entsprechende Morphologie aufwiesen. Sie wanderten mit einer breiten Migrationsfront in das EHT ein, wobei Kardiomyozyten bzw. Fibroblasten dazwischen gelagert waren.

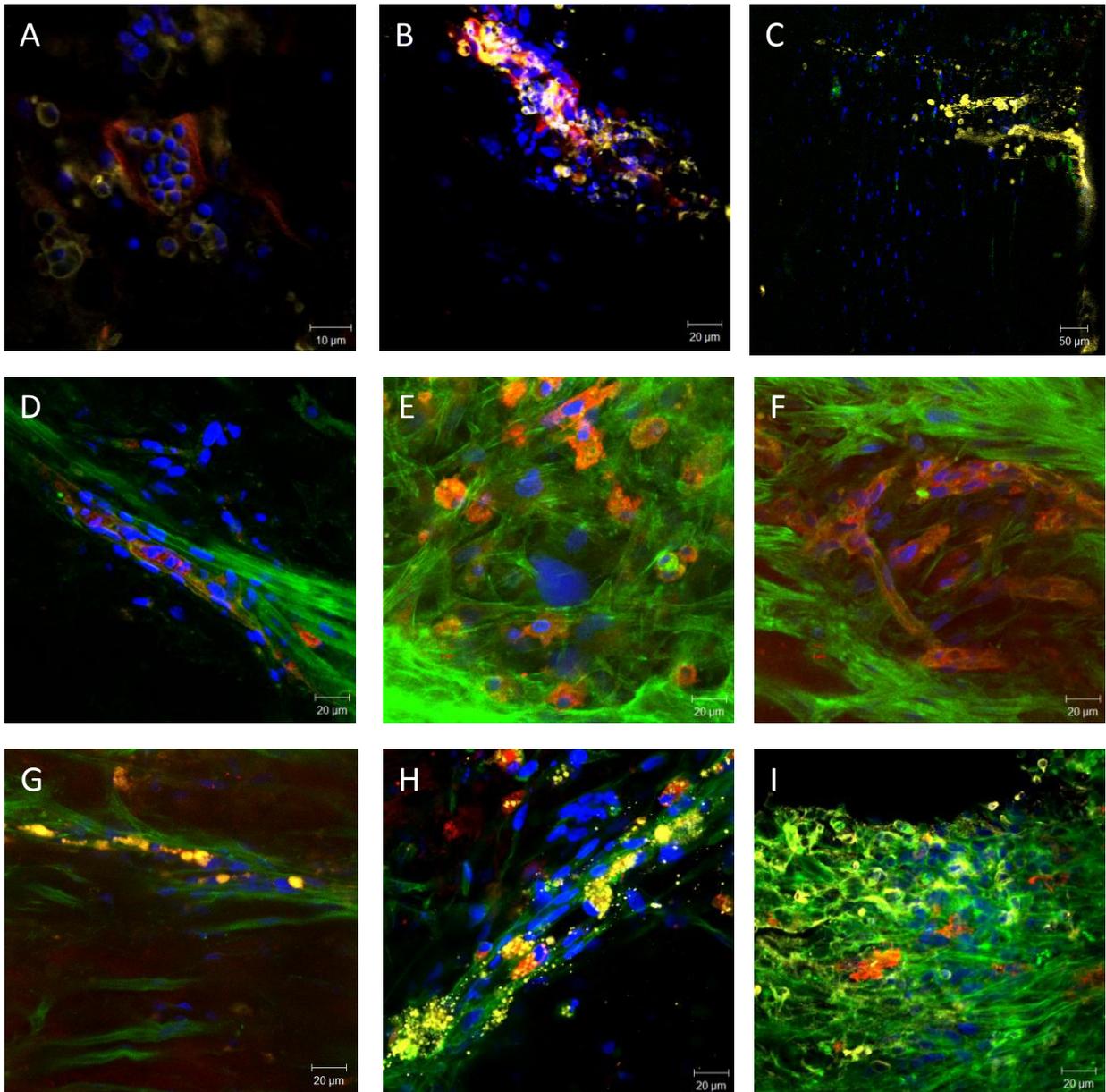


Abbildung 28: Morphologische Untersuchungen von *whole-mount*-Kollagen-EHT-Explantaten nach vier tägiger Inkubation auf der CAM

Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten, dass die lichtmikroskopisch erkennbaren Einwüchse Erythrozyten enthielten und damit als angiogenetische Prozesse zu deuten sind. Färbungen mittels anti-RBC (gelb), Endothelzell-spezifischem Lektin (rot) und Phalloidin (grün) zeigten unterschiedliche Stufen des Einsprossungsprozesses, mal als Erythrozytenkolonne umgrenzt von Kardiomyozyten (G), mal zusammengelagert mit Lektin-positiven Endothelzellen, vermutlich EHT-Ursprungs. Die schon in nativen EHTs vorhandenen Endothelzellen ließen sich in den Explantaten wiederfinden, oftmals assoziiert in Nestern (E) und umwunden von Kardiomyozyten (F). In blau ist DAPI-Kernfärbung dargestellt. Maßstabsbalken: 10 µm (A), 20 µm (B, D, E, F, G, H, I), 50 µm (C).

Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen die Beobachtungen aus der Paraffin-Histologie (siehe Abb. 25). Die Reaktionen der CAM auf das EHT sind vielseitig und unterschiedlicher Ausprägung.

Zusammenfassend lassen sich folgende Punkte festhalten:

- Die meisten EHTs litten unter der Kultur auf der CAM, es waren nicht mehr viele vitale Kardiomyozyten aufzufinden.
- Etwa 30% der Präparate zeigten gar keine Reaktionen der CAM auf das EHT.
- Etwa 20% der Präparate enthielten kleine, auffallende Strukturveränderungen an der Kontaktfläche zwischen CAM und EHT, die möglicherweise angiogenetische Prozesse darstellen.
- Die restlichen 50% der Explantate enthielten deutliche Reaktionen, die sich von klar formierten, gut umgrenzten und EHT-Struktur erhaltenden, bis hin zu zersetzenden, invadierenden Morphologien erstreckten. Am vierten Tag stellten sich diese Veränderungen als Blutgefäße oder großflächige Migrationsfronten dar.
- Die Entwicklungen an der Schnittfläche zwischen CAM und EHT unterlagen keiner Regelmäßigkeit.

3.5.3.2 Fibrin-EHTs

Die Abbildung 30 A-E zeigen den Zustand von unterschiedlichen Entwicklungsprozessen nach vier Tagen Inkubation auf der CAM. Bei den Fibrin-Explantaten fiel auf, dass die Kardiomyozytenstruktur in etwa 50% der Explantate, besonders in den EHT-Randbereichen gut erhalten war. Dort verliefen die Kardiomyozyten in parallelen Strängen (siehe Abb. 29 B, Pfeil). Zum Zentrum des EHTs hin befanden sich anstelle von Kardiomyozyten nekrotische Zellreste. Die Endothelzellen waren in Fibrin-EHTs, die vier Tage auf der CAM inkubiert wurden, nicht weiter zu Strängen zusammengewachsen.

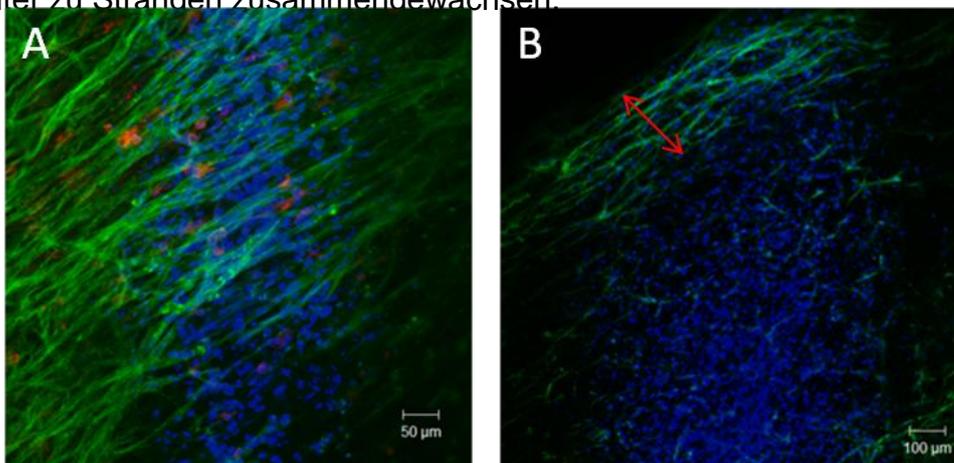


Abbildung 29: Vergleich von Fibrin-EHTs

Immunfluoreszenzfärbungen von Fibrin-EHTs vor (A) und nach (B) der viertägigen Inkubation auf der CAM. Im Randbereich war die Kardiomyozytenstruktur sehr viel besser erhalten als im Inneren des EHTs, siehe Pfeil. In grün ist Phalloidin, in rot ist Lektin und in blau ist DAPI dargestellt. Maßstabsbalken: 50 µm (A), 100 µm (B).

In allen Präparaten waren Einwüchse der CAM in das EHT in unterschiedlicher Form und unterschiedlichem Ausmaß zu sehen. Fibrin-EHTs zeigten ähnliche Einwüchse von CAM-Zellen wie Kollagen-EHTs. In Abbildung 30 A, Ba, Bb und C schlängeln sich migrierende Erythrozyten wie eine Kolonne bis zu 500 µm tief in das EHT hinein (Pfeil). Dies war die am häufigsten vorkommende Migrationsform (50% der Präparate). Aber auch etwas weniger invasive Einwüchse waren zu finden, die etwas ungeordneter und weiträumiger in das EHT vordrangen (siehe Abb. 30 D). Entsprechend den lichtmikroskopischen Befunden gab es auch in diesen Färbungen Vorkommen von grobflächigen Invasionen, die die EHT Struktur zersetzten (siehe Abb. 31 E).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass:

- Die Konservierung der Kardiomyozytenstruktur in der Nähe der CAM am besten war.
- Kolonnenförmige Migrationen von Erythrozyten in das EHT die am häufigsten vorkommende Veränderung waren.
- Endothelzellstränge sich innerhalb der viertägigen Inkubation auf der CAM nicht weiter ausgebildet haben.

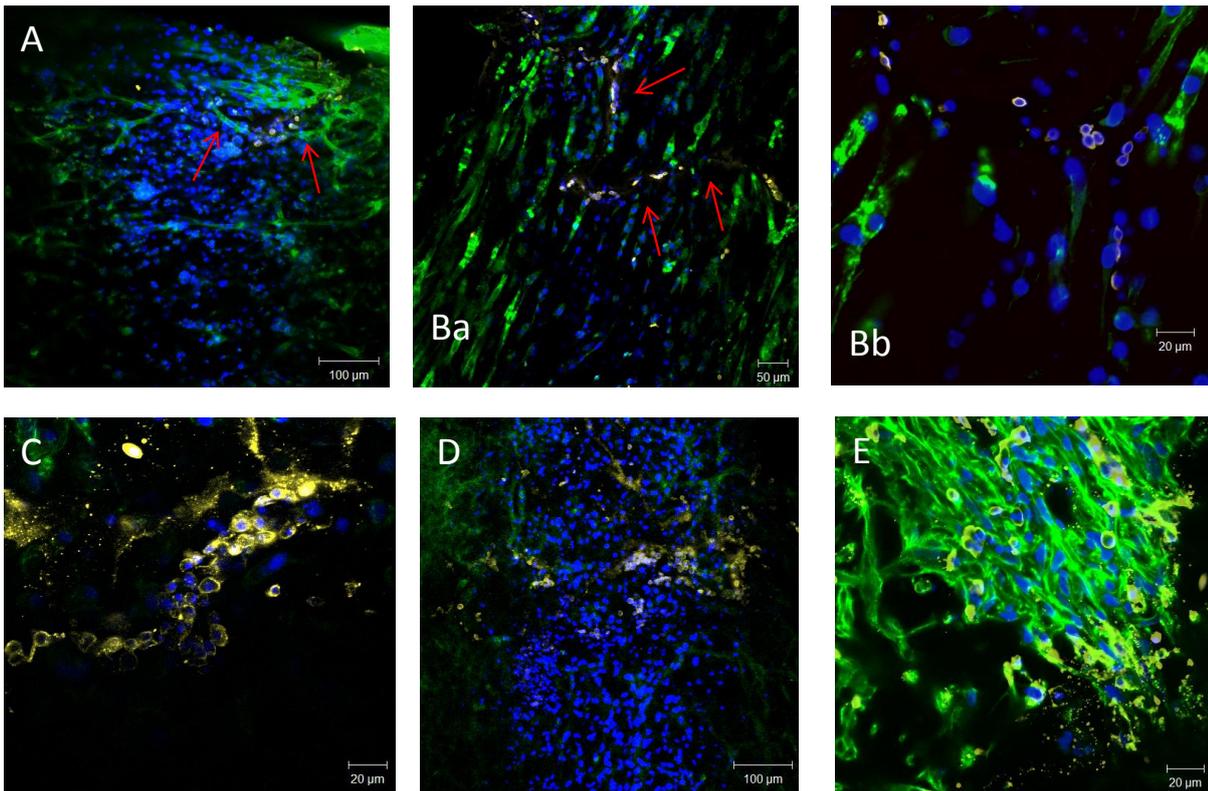


Abbildung 30: Morphologische Untersuchungen von Fibrin-EHT-Explantaten nach viertägiger Inkubation auf der CAM

Die Explantate zeigten oftmals weit in das EHT eindringende Erythrozytenkolonnen (A, B, C) die anhand des gelben anti-RBC Signals auszumachen waren. Weniger invasive Einwüchse, die etwas ungeordneter und weiträumiger in das EHT vordrangen sind in D gezeigt. Grobflächige Invasionen von CAM-Zellmaterial (gelb angefärbte rote Blutkörperchen, E) durchsetzten EHT-Struktur (E). Kardiomyozyten sind durch die Färbung mit Phalloidin (grün) dargestellt. Lektin-positive Zellen (rot) sind in diesen Explantaten nur spärlich auffindbar gewesen. Die DAPI-Kernfärbung ist in blau dargestellt. Fibrin-EHTs: A, B und F; mit Tb₄-supplementierte Fibrin-EHTs: C, D. Maßstabsbalken: 100 µm (A, D), 50 µm (Ba), 20 µm (Bb, C, E).

3.6. Veränderungen der Genexpression in EHTs

Genexpressionsanalysen wurden durchgeführt, um die Qualität der drei verschiedenen nativen EHTs (Kollagen, Fibrin und Fibrin supplementiert mit Tb₄) untereinander sowie im Zustand vor und nach vier Tagen Kultur auf der CAM miteinander zu vergleichen. Dafür wurden die Genexpressionslevel eines kardialen Markers, MHC-6 (*Myosin heavy chain 6*), untersucht. In jedem Muskel besteht

Myosin aus zwei Schwereketten und vier Leichtketten. Dabei kodieren zwei Gene für die Schwereketten, *alpha-* und *beta-myosin heavy chain*. Im Herzen überwiegt die Isoform 6 der Myosin-Schwerkette (im Folgenden MHC genannt). In Rattenherzventrikeln stellt die beta-Kette die fetale Form dar, während die Expression der alpha-Kette, die nach der Geburt ansteigt, die adulte Form ist (Lompré et al. 1979). Darüber hinaus wurden vier Angiogenese-Marker, VEGF-A, -B, FGF-2 und Angiopoietin, sowie zwei Endothelzellmarker CD31/PECAM-1 und VE-Cadherin/Cadherin 5 mittels quantitativer PCR untersucht.

In Abbildung 31 sind für jeden Gruppenvergleich (Kollagen vs. Fibrin, Fibrin vs. Fibrin+Tb4 sowie Kollagen, Fibrin und Fibrin+Tb4 jeweils vor und nach der Inkubation auf der CAM) die relative mRNA-Konzentration der jeweiligen Probe dargestellt. Die Balken zeigen den Standardfehler als Streuungsmaß für die Stichprobenverteilung an, welche aus jeweils drei biologischen Replika bestand. Es fällt auf, dass die Präparate, die auf der CAM inkubiert wurden, eine sehr viel höhere Streuung aufweisen als die nativen Präparate. Bei Messungen mit großen Standardfehlern kann man davon ausgehen, dass der Mittelwert nicht die Grundgesamtheit der Präparate widerspiegelt, deswegen werden diese Werte in der folgenden Beschreibung der Genexpressionsergebnisse nicht erwähnt.

Wie in Abbildung 31 A dargestellt, war das Expressionsmuster von Fibrin-EHTs im Gegensatz zu Kollagen-EHTs sehr unterschiedlich. Einige Gene wurden weniger, andere stärker exprimiert. So wurden die Gene für FGF-2 und Angiopoietin-1 jeweils auf etwa ein Zehntel des Expressionslevels von Kollagen-EHTs runterreguliert; CD31 jedoch nur um etwa die Hälfte reduziert exprimiert. Die mRNA-Menge für VEGF-A und MHC-6 blieb in etwa gleich. Auffallend viel mRNA für das Protein VE-Cadherin war in Fibrin-EHTs enthalten, nämlich mehr als 100mal der Menge in Kollagen-EHTs. Die Standardfehler waren in Kollagen-EHTs im Mittel geringer als in Fibrin-EHT.

Die Medium-Supplementierung mit Tb4 (siehe Abb. 31 B) führte zu einer verminderten Expression von VEGF-A (durchschnittlich 0,4-fach) und VE-Cadherin (durchschnittlich 0,09-fach). Die Expression von MHC-6 hingegen blieb unwesentlich verändert. VEGF-B (durchschnittlich 143-fach) und CD31 (durchschnittlich 2,58-fach)

hingegen waren im Vergleich zu unsupplementierten Fibrin-EHTs sehr viel stärker exprimiert.

Kollagen-EHTs, die vier Tage auf der CAM inkubiert wurden (siehe Abb. 31 C), zeigten eine im Mittel weitaus geringere Expressionsrate der Gene VEGF-A (0,09-fach), Angiopoietin (0,12-fach) und VEGF-B (0,02-fach) sowie MHC-6 (0,004-fach) im Gegensatz zu den nativen Kollagen-EHTs. Jedoch wurde eine vielfach höhere Menge an VE-Cadherin/Cadherin 5 mRNA in den Proben der EHTs gefunden, die vier Tage auf der CAM lagen, nämlich durchschnittlich 35-fach der in den nativen Präparaten befindlichen Menge.

Fibrin-EHTs, die vier Tage auf der CAM inkubiert wurden (siehe Abb. 31 D), zeigten eine etwa auf die Hälfte reduzierte Expression der Gene für VEGF-A, FGF-2, VEGF-B und MHC-6. Dagegen blieb das Expressionsniveau für Angiopoietin, CD31 und VE-Cadherin annähernd konstant.

Tb4-supplementierte EHTs, die vier Tage auf der CAM inkubiert wurden (siehe Abb. 31 E), zeigten im Mittel eine verschwindend geringe Expression der Gene VEGF-A, FGF-2, Angiopoietin, VEGF-B sowie MHC-6. Die Expression von CD31 war hingegen nur auf die Hälfte reduziert. Ähnlich der Kollagen-Präparate, die vier Tage auf der CAM inkubiert wurden, zeigten die Tb4-supplementierten Präparate nach der Inkubation auf der CAM eine stark gesteigerte Expression von VE-Cadherin.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass

- Die Präparate welche auf der CAM inkubiert wurden innerhalb der Gruppen biologischer Replika die Expression der getesteten Gene eine höhere Variabilität aufwies.
- Die Inkubation auf der CAM die Genexpression der getesteten Gene größtenteils herunter regulierte.
- Die Herunterregulation der getesteten Gene in den Fibrin-EHTs weniger stark ausgeprägt war als in den Kollagen und mit Tb4-supplementierten Fibrin-EHTs.
- Die Expression von VE-Cadherin in den Kollagen- sowie mit Tb4-supplementierten Fibrin-EHTs durch die Inkubation auf der CAM massiv verstärkt war.

- Tb4-Behandlung in nativen Fibrin-EHTs zu einer starken Expressionsvermehrung des Gens für VEGF-B führte.

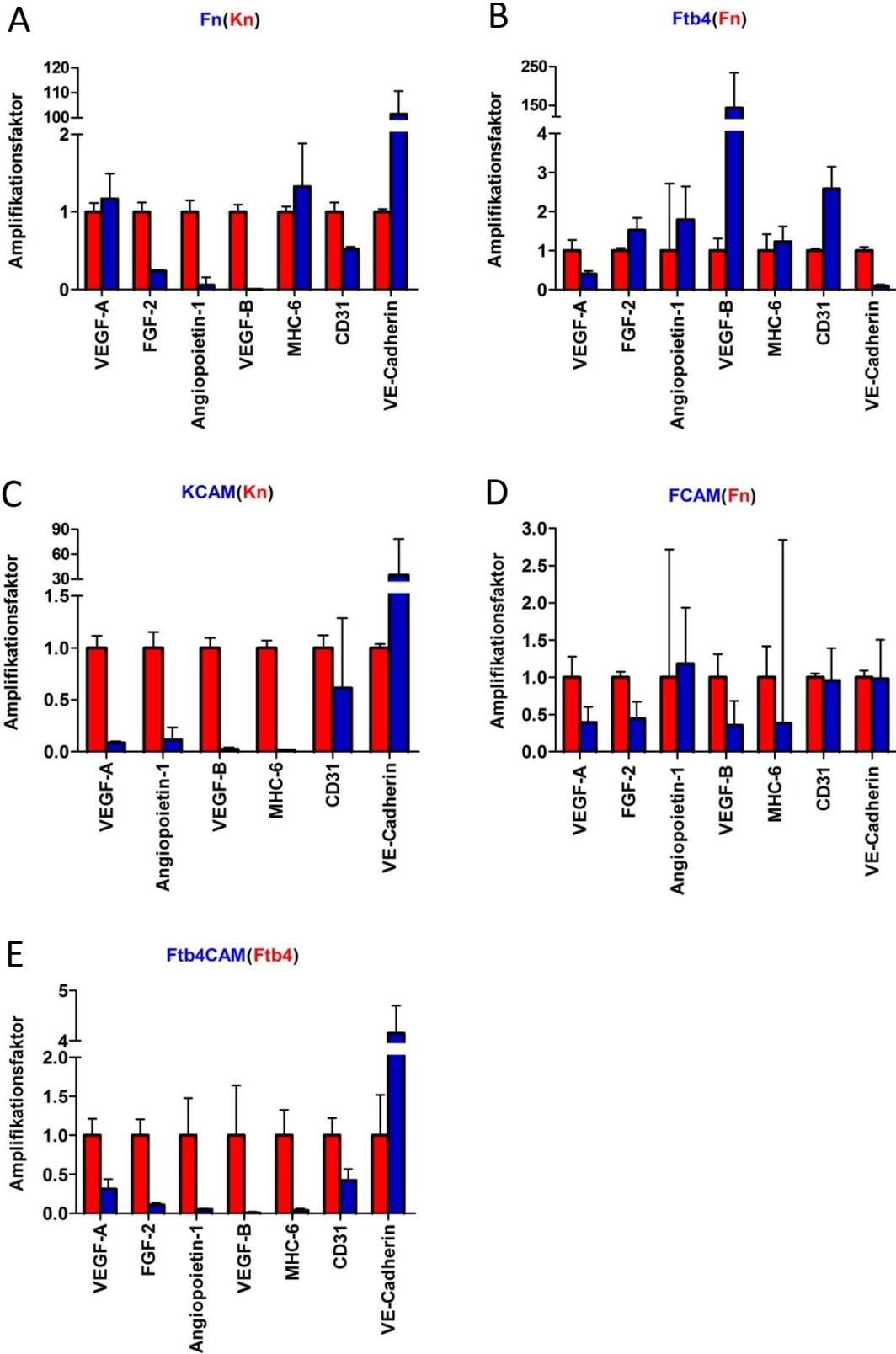


Abbildung 31: Genexpressionsanalysen verschiedener Gewebe im Vergleich

Abgebildet sind Vergleiche der Genexpressionsniveaus innerhalb von fünf Gruppen (Kollagen vs. Fibrin, Fibrin vs. Fibrin+Tb4 sowie Kollagen, Fibrin und Fibrin+Tb4 jeweils vor und nach der Inkubation auf der CAM). Die relative Expression der getesteten Gene eines Gewebes im Vergleich zu dem eingeklammerten Gewebe (Amplifikationsfaktor) ist in blau markiert. Das Bezugsgewebe ist in rot markiert und weist stets einen Amplifikationsfaktor von 1 auf. Der Standardfehler ist durch Fehlerbalken angegeben. Werte oberhalb des Amplifikationsfaktors von 1 bedeuten eine höhere Expression des jeweiligen Markers, unterhalb liegende Werte eine niedrigere Expression. Kn=Kollagen-EHT, nativ d12; Fn=Fibrin-EHT, nativ d12; Ftb4=Fibrin-EHT, nativ d12, Medium supplementiert mit Tb4; CAM=EHT nach vier Tagen auf der CAM.

3.7. Sequenzvergleich von Wachstumsfaktoren unterschiedlicher Spezies

Da im Rahmen der Positivkontrollen Faktoren humanen Ursprungs auf der CAM getestet wurden, schien ein Sequenzvergleich der Faktoren der beiden Spezies sinnvoll, um den beobachteten Unterschied in der Provozierbarkeit von CAM-Gefäßwachstum zu erklären. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der auf der CAM als angiogenetische Stimuli verwendeten Faktoren mit der jeweiligen Sequenz des Huhns wurde mittels des BLAST-Programms durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2008).

Der Sequenzvergleich von VEGF-A des Huhns mit der in der Positivkontrolle verwendeten humanen, rekombinanten VEGF-A Isoform 165 ergab eine Sequenzübereinstimmung von 65% (Siehe Abb. 32 A).

Der Sequenzvergleich von Tb4 und FGF-2 von Huhn und Mensch ergab eine Sequenzübereinstimmung von 100% bzw. 92% (siehe Abb. 32 B, C).

A

```
Score = 288 bits (73%), Expect = 4e-83, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 141/216 (65%), Positives = 163/216 (75%), Gaps = 25/216 (11%)

Query 1 MNFLLSWVHWLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQNHHEVVKFMVDVYQRSYCHPIETLVD 60
Sbjct 1 MNFLL+W+HW LA LLYL A+ S+AAP G + +EV+KF++VY+RS+C IETLVD 60

Query 61 IFQEYDPDEIEYIFKPSCVPLMRCGGCCNDEGLECVPTTEESNITMQIMRIKPHQGHIGEM 120
Sbjct 61 IFQEYDPDE+EYIF+PSCVPLMRC GCC DEGLECVP + N+TM+I RIKPHQ QHI M 120
IFQEYDPDEVEYIFRPSCVPLMRCAGCCGDEGLECVFVDVYNVTMEIARIKPHQSQHIAHM 120

Query 121 SFLQHNKCECRPKKD-RARQENP-----CGPCSERRKHLFV 155
Sbjct 121 SFLQH+KC+CRPKKD + +QE C PCSERRKHLFV 180
SFLQHSKCDRCRPKKDVKNKQEKKS KRKGKGGQKRKRKKGRYKPPSFHCEPCSEKHLFV 180

Query 156 QDPQTCCKSCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR 191
Sbjct 181 QDPQTCCKSCCKFTDSRCKSRQLELNERTCRCEKPRR 216
QDPQTCCKSCK TDSRCK+RQLELNERTCRC+KPRR
```

B

```
Score = 85.5 bits (210%), Expect = 4e-23, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 44/44 (100%), Positives = 44/44 (100%), Gaps = 0/44 (0%)

Query 1 MSDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPPLPSKETIEQEKQAGES 44
Sbjct 1 MSDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPPLPSKETIEQEKQAGES 44
```

C

```
Score = 277 bits (70%), Expect = 5e-80, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 134/147 (91%), Positives = 139/147 (94%), Gaps = 1/147 (0%)

Query 13 PAL-PDDGGGGAFFPGHFKDPKRLYCKNGGFFLRINPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAE 71
Sbjct 1 PAL P+DGG GAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFFLRI+PDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAE 60
PALIPEDGGGGAFFPGHFKDPKRLYCKNGGFFLRIHDPGRVDGVREKSDPHIKLQLQAE 60

Query 72 RGVVSIKGVSANRFLAMKEDGRLLALKATEECFFFERLESNNYNTYRSRKYSDWYVALK 131
Sbjct 61 RGVVSIKGV ANR+LAMKEDGRLLA KC T+ECFFFERLESNNYNTYRSRKY+ WYVALK 120
RGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTYRSRKYTSWYVALK 120

Query 132 RIGQYKPGPKTGPGQKAILFLPMSAKS 158
Sbjct 121 RIGQYK G KTGPGQKAILFLPMSAKS 147
RIGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS 147
```

Abbildung 32: Sequenzvergleich von den in der CAM-Positivkontrolle verwendeten Wachstumsfaktoren mit der jeweiligen Huhn-spezifischen Form
Auszug der BLAST-Ergebnisse mit der jeweiligen prozentualen Sequenzübereinstimmung zwischen der Mensch- und Huhn-Isoform. A: VEGF-A, B: Tb4, C: FGF-2

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kollagen und Fibrin als alternative Hydrogelmatrices zur Herstellung von EHTs miteinander verglichen. Der Einfluss von dem als „kardioprotektiv“ (Bock-Marquette et al. 2004) bekannten und angiogenetisch wirksamen (Smart et al. 2007b) Wachstumsfaktor Tb4 wurde auf die Entwicklung der EHTs hinsichtlich kontraktile und morphologischer Parameter untersucht. Schließlich wurden die unterschiedlichen EHT-Gruppen (Kollagen-, Fibrin- und mit Tb4 behandelte Fibrin-EHTs) auf die CAM des bebrüteten Hühnereis implantiert, um die angiogenetische Antwort der CAM auf das EHT zu untersuchen.

Die Hauptergebnisse lassen sich wie folgt zusammen fassen:

- Kollagen und Fibrin-EHTs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Kontraktionskraft insofern, als dass Fibrin-EHTs etwa 200% der Kontraktionskraft von Kollagen-EHTs entwickelten.
- Tb4 erhöhte die Kontraktionskraft der Fibrin-EHTs um 67%.
- Morphologisch schienen Fibrin-EHTs ein dichteres Netzwerk aus Kardiomyozyten auszubilden als Kollagen-EHTs.
- Tb4-Behandlung der Fibrin-EHTs führte zur Ausbildung eines dichteren Kardiomyozyten-Netzwerkes.
- Die Endothelzellausstattung und -anordnung war in Kollagen-, Fibrin- und Tb4 behandelten Fibrin-EHTs etwa gleich.
- Die EHT-Kultivierung auf der CAM ist nur eingeschränkt möglich.
- Nach der viertägigen Inkubation auf der CAM waren in den EHTs (Kollagen-, Fibrin- und mit Tb4 behandelte Fibrin-EHTs) unterschiedliche Entwicklungsprozesse zu beobachten: Von strukturierten angiogenetischen Prozessen bis hin zur großflächigen Zersetzung des EHT-Gewebes durch CAM-Material. Dabei war zwischen den einzelnen Gruppen kein wesentlicher Unterschied zu beobachten.

Die Ergebnisse im Einzelnen werden folgend diskutiert.

4.1 Kardiales *tissue engineering* mit verschiedenen Hydrogelmatrices

Künstliches Herzgewebe eignet sich möglicherweise als *in vitro*-Modell zur pharmakologischen Substanztestung und als Gewebeersatzquelle *in vivo*. Die

Arbeitsgruppe Eschenhagen/Zimmermann hat gezeigt, dass künstliche Herzgewebe in Form von EHTs aus unreifen Herzzellen des Huhns und der Ratte sowie Kollagen und Matrigel hergestellt werden können (Eschenhagen et al. 1997, Zimmermann et al. 2000). Diese EHTs entwickelten Kontraktionskräfte von 0,7 mN (Naito et al. 2006). Native EHTs enthalten ein primitives Netzwerk aus Endothelzellsträngen (unveröffentlichte Daten). Anfängliche Untersuchungen an Kollagen-EHTs im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die Reproduktion dieser grundlegenden Ergebnisse in zweierlei Hinsicht schwierig war: Erstens konnte nach der von Eschenhagen und Zimmermann vorherig beschriebenen Methode der EHT-Herstellung mit Kollagenmatrix (Zimmermann et al. 2000) keine vergleichbare Kontraktionskraft erreicht werden (Abschnitt 3.1.1). Zweitens wurde in diesen EHTs kein präexistierendes Gefäßnetz gefunden, sondern zumeist vereinzelte Endothelzellen, die sich nur lokal zu Strängen aus ein bis zwei Zellkörpern organisierten. Vordergründig war jedoch die unbeständige Qualität der Kollagen-EHTs. Die gemessene Kontraktionskraft schwankte zwischen 0,1-0,6 mN. In Abbildung 13 ist die Kontraktionskraft von einer repräsentativen EHT-Gruppe dargestellt. Die schwankende Qualität von Kollagen-EHTs spiegelte sich außerdem in den lichtmikroskopischen sowie den lasermikroskopischen Aufnahmen wider: Kollagen-EHTs enthielten in einigen Fällen ein Netzwerk mit vielen vitalen Kardiomyozyten und in anderen Fällen eine lediglich mit atrophen Zellen und Zelltrümmern durchzogene Kollagenmatrix. EHTs unterschiedlicher Zellpräparationen waren selten miteinander vergleichbar. Dies erschwerte die Auswertung von CAM-Implantationsversuchen. Aus diesen vorläufigen Ergebnissen ergab sich die Frage, welchen Einfluss eine Änderung der Extrazellulärmatrix im Rekonstitutionsmix auf die EHT-Entwicklung hat. Es wurde folgende Arbeitshypothese formuliert: **Ersatz von Kollagen durch Fibrin als Hydrogelmatrix verbessert die Reproduzierbarkeit der EHT-Herstellung, führt zu höheren Kontraktionskräften und zu einem dichter ausgebildetem Netzwerk aus Kardiomyozyten mit zwischengelagerten Endothelzellsträngen.**

Zunächst stellt sich die Frage, worauf die variierende Qualität der Kollagen-EHTs bei gleichbleibender Versuchsdurchführung zurückzuführen ist. Mehrere Schritte in der Herstellung von EHTs sowie verwendete Produkte tragen zur Variabilität der Zellpräparation bei.

Auf der technischen Seite ist zunächst das Abschneiden der Vorhöfe zu nennen, dieses kann von Präparator zu Präparator zu unterschiedlich aggressiver Entfernung von Vorhofzellen führen, die für die Schrittmacherfunktion des Herzens sehr bedeutend sind. Während des Zellverdaus ist die Länge eines jeden Trypsinierungsschrittes (mit Ausnahme des Vorverdaus) abhängig von der Einschätzung der Trübung durch den Präparator. Bei der Abnahme vom Überstand und selbst bei der Triturierung der Gewebestückchensuspension kann mehr oder weniger Überstand abgenommen werden. Außerdem kann die Triturierung unterschiedlich zellschonend durchgeführt werden. Vor allem aber die Zugabe von undefinierten Wachstumsfaktorlösungen zu dem Rekonstitutionsmix, wie Hühnerembryonenextrakt und Pferdeserum, führt zu einer großen Schwankungsbreite der EHT-Qualität. Im Verlauf der Arbeit fiel außerdem auf, dass die Enzymaktivität des kommerziell erhältlichen Trypsins trotz vom Hersteller als gleich angegebener Aktivitäten von Charge zu Charge stark in seiner Aktivität schwankt. Da es sich um Rohextrakt aus bovinem Pankreas handelt, sind neben dem Trypsin u.a. Carboxypeptidasen, Kollagenasen und Elastasen in dem Gemisch enthalten. Die Aktivität dieser Enzyme wird vom Hersteller nicht kontrolliert. Ebenso lassen sich nicht alle diese Enzyme durch das in der DNase-Arbeitslösung enthaltene FKS hemmen. Zusammengenommen ist die Gesamtzymaktivität des Gemisches nicht standardisiert. Auch das Matrigel, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist von einem anderen Hersteller als das Matrigel, welches bei früheren Experimenten verwendet wurde. Das für die EHT-Herstellung verwendete Kollagen stammte aus eigener Herstellung und die Qualität dieses Produktes ist damit Experimentator-abhängig. Letztlich ist auch das Alter der neonatalen Ratten zu nennen, welches von Tag 0-3 schwanken kann. Eine Einengung dieses Bereiches auf ein oder zwei Tage ist aus praktischer Sicht nicht möglich.

Als Konsequenz aus diesen Untersucher-abhängigen, nicht automatisierten Arbeitsschritten sowie den unstandardisierten Komponenten ergaben sich eine geringe Robustheit und daraus resultierend eine schlechte Reproduzierbarkeit der Qualität der Kollagen-EHTs. Viele dieser technischen und materiellen Faktoren wurden im Rahmen dieser Arbeit variiert, um die guten Kontraktionskräfte vorheriger

Arbeiten reproduzieren zu können. Keine dieser Veränderungen führte zu einer beständig guten EHT-Qualität. Um die Produktion von EHTs besser zu standardisieren, müsste der Rekonstitutionsmix aus definierten Faktoren bestehen. Ansätze zum Serumersatz im EHT-Medium durch definierte Wachstumsfaktoren führten zu einer geringeren Kontraktionskraft von EHTs (Naito et al. 2006). Deswegen wurde die serumhaltige Kultivierung in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuchen beibehalten. Die Herstellung von Fibrin-EHTs entspricht derjenigen der Kollagen-EHTs, bis auf den Ersatz des Hydrogels Kollagen durch Fibrin. Die Tatsache, dass Fibrin-EHTs unterschiedlicher Zellpräparationen gut miteinander vergleichbar sind, deutet darauf hin, dass Fibrin den EHTs im Gegensatz zu Kollagen sehr viel mehr Robustheit verleiht.

Die unzulänglichen Ergebnisse mit Kollagen wurden durch einen Wechsel von Kollagen zu Fibrin verbessert. Kollagen- und Fibrin-EHTs wurden parallel hergestellt und die Eigenschaften von unterschiedlichen EHTs aus derselben Zellpräparation miteinander verglichen. Der Vergleich der Kontraktionskraft von EHTs mit Kollagen- und EHTs mit Fibrin-Hydrogel zeigte, dass Fibrin-EHTs 200% der Kontraktionskraft von Kollagen-EHTs entwickelten. In dieser Eigenschaft zeichnen sich Fibrin-EHTs gegenüber Kollagen-EHTs aus, denn wie im Abschnitt 1.1.1 der Einleitung gefordert, hat ersetzendes Gewebe eine Größe und kontraktile Funktion aufzuweisen, die das Empfängerherz bedeutsam unterstützen kann. Darüber hinaus ist für den funktionellen Synergismus eine möglichst genaue Anpassung des Implantats an die Physiologie des Empfängerherz vonnöten. Auch in dieser Eigenschaft sind Fibrin-EHTs den Kollagen-EHTs überlegen, denn die Kraftsteigerung bei zunehmender Dehnung war bei Fibrin-EHTs ausgeprägter als bei Kollagen-EHTs (141% vs. 273%, Abschnitt 3.1.1).

Was führt nun in Fibrin-EHTs zu einer stärkeren Kontraktionskraft? Ohne eine höhere Menge an Myosin als Bestandteil einer kontraktile Einheit im Sarkomer ist eine Steigerung der Kontraktionskraft um 200% nicht möglich. Für eine Steigerung der Kontraktionskraft sind prinzipiell vier Unterschiede zwischen Kollagen- und Fibrin-EHTs denkbar: i) Fibrin-EHTs enthalten mehr kontraktionsfähige Kardiomyozyten, ii) Fibrin-EHTs enthalten größere Kardiomyozyten, iii) die Kardiomyozyten in Fibrin-EHTs sind untereinander besser vernetzt, so dass sie eine stärkere funktionelle

Einheit darstellen, iv) die Extrazellulärmatrix ermöglicht aufgrund ihrer Beschaffenheit hinsichtlich Rigidität und Dichte eine stärkere Kontraktionskraft.

In den morphologischen Analysen scheinen Fibrin-EHTs mehr Zellen zu enthalten als Kollagen-EHTs bei etwa vergleichbarer Zellgröße. Da keine Quantifizierung der Zellen in mehreren Präparaten vorgenommen wurde, ist aber keine sichere Aussage über die tatsächlichen Zellzahlen in Kollagen- und Fibrin-EHTs zu machen. Jedoch ist eine höhere Zellzahl in Fibrin-EHTs als Ursache für die höhere Kontraktionskraft wahrscheinlich. Im Rekonstitutionsmix werden pro Kollagen-EHT 2,5 Millionen Zellen eingesetzt, für Fibrin-EHTs 3,7 Millionen Zellen. Bekannterweise sterben während der Inkubationszeit von Kollagen-EHTs viele Kardiomyozyten. In unveröffentlichten Arbeiten wurde gezeigt, dass die Zellzahl von Tag 0 (2,5 Millionen Zellen/EHT) bis Tag 12 (ca. 0,5 Millionen Zellen/EHT) abnahm. Ebenso nahm die Konzentration an Apoptose-Surrogatmarkern im Verlauf der Inkubation zu. So betrug die mRNA Konzentration von dem Apoptose-assoziierten Protein Bax an Kulturtag 12 327% der Ausgangskonzentration. Für Fibrin-EHTs liegen noch keine Daten bezüglich des Zelltods während der Inkubation vor. Apriori würde man eine 1,5-fache Kontraktionssteigerung erwarten, da 1,5-mal so viele Zellen in Fibrin-EHTs enthalten sind. Innerhalb eines EHTs sind in Fibrin- ebenso wie in Kollagen-EHTs vereinzelte Kardiomyozyten auszumachen, die keinen Kontakt zu dem restlichen Zellnetzwerk haben. Diese Zellen tragen weniger oder gar nicht zur Gesamtkraftbildung bei als verbundene Kardiomyozyten. Bezüglich der Kardiomyozyten-Konnektivität ist kein Unterschied festgestellt worden.

Ob die Kardiomyozyten in Fibrin-EHTs größer sind als in Kollagen-EHTs oder mehr kontraktile Proteine enthalten, sollte mittels der Messung der Myosin-Schwerketten mRNA ergründet werden. Als Bestandteil des Sarkomers müsste die Expression mit der Größe der Kardiomyozyten ansteigen. Die Analysen ergaben, dass Fibrin-EHTs 30% mehr mRNA für die schwere Kette des Myosins enthalten als Kollagen-EHTs. In Anbetracht des großen Standardfehlers, kann dies nicht als repräsentativ für die Genexpression des kontraktiven Proteins *Myosin Heavy Chain* in der Grundgesamtheit der Fibrin-EHTs gedeutet werden. Eine höhere Zahl an Kardiomyozyten bei gleichbleibendem Verhältnis zwischen Nicht-Kardiomyozyten und Kardiomyozyten im EHT würde auch ohne relative Erhöhung der Expression

kontraktiler Proteine mehr kontraktile Einheiten bedeuten. Somit wäre die etwa gleichbleibende Konzentration der MHC mRNA Gene mit einer höheren Kontraktionskraft von Fibrin-EHTs vereinbar. Ist es dennoch denkbar, dass Fibrin-EHTs größere Kardiomyozyten bzw. ein größeres Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten enthalten, obwohl die mRNA-Menge nicht signifikant erhöht ist? Auch ohne Erhöhung der für die MHC kodierenden mRNA-Menge kann es zu einem Anstieg der Proteinkonzentration kommen. Mehrere Mechanismen werden in der Literatur dafür beschrieben. Eine gleichbleibende MHC-mRNA-Menge bei Hypertrophie des Herzens oder der Kardiomyozyten in 2D Kultur wurde öfter beobachtet. Ivester et al beschrieben 1995, dass die Menge an MHC in Katzen-Kardiomyozytenkulturen bei Kontraktionsstimulation durch elektrische Feldstimulation ansteigt, ohne dass die mRNA Produktion für dieses Protein zunimmt. Als Mechanismus erkannten sie eine erhöhte Rate an Translationsinitiation, mit anderen Worten eine höhere Translationskapazität, da eine Verlagerung der MHC-mRNA von kleineren zu größeren Polysomen zu beobachtet war. Auf der anderen Seite fanden Matsuo et al. 1998, dass in hypertrophen Hundeherzen die erhöhte Proteinkonzentration von MHC nicht durch erhöhte Proteinbiosynthese bedingt ist, sondern durch eine geringe Proteindegradation verursacht wird. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Messung der mRNA-Menge kein sensibler Parameter für die Proteinkonzentration von MHC ist. Trotz unwesentlich erhöhter mRNA-Konzentration in Fibrin-EHTs können Fibrin-EHTs eine stärker ausgebildete Sarkomerstruktur haben, was die höheren Kontraktionskräfte wahrscheinlich macht. Um dem auf die Spur zu kommen, müsste die MHC-Proteinkonzentration bestimmt werden.

Der zuletzt genannte Punkt, welcher als Erklärung der Kontraktionskraftdifferenz von Kollagen-EHTs und Fibrin-EHTs herangezogen werden kann, deutet auf Unterschiede zwischen Kollagen und Fibrin als extrazelluläre Matrix hin. Faktoren wie Dichte, Struktur, Modellierbarkeit durch ausgesäte Zellen oder die Beeinflussung der Zellfunktion durch Abbauprodukte, können die Vitalität und damit die Kontraktionskraft der Kardiomyozyten beeinflussen. Die Dichte der Extrazellulärmatrix sollte ein Kompromiss zwischen Stabilisierung und Ausbreitungsmöglichkeiten treffen. Ein Übermaß an nichtkontraktiler Matrix inhibiert die Formation von Muskelbündeln, was die Kontraktionskraft und damit die

Gewebefunktion einschränken würde. In Kollagen-EHTs befinden sich 800 µg Kollagen/EHT. Die optimale Kollagen-Menge zur größtmöglichen Kraftentwicklung in EHTs wurde 2002 von Eschenhagen et al untersucht (Eschenhagen et al. 2002). Dabei erreichten zwar 500-700 µg das beste Kontraktionsergebnis, aufgrund der Instabilität dieser EHTs wurde eine Menge von 800 µg als ein Kompromiss zwischen Stabilität und Kontraktilität betrachtet. Während der Inkubation kondensieren EHTs, was zu einer größeren Kollagendichte auf engerem Raum führt (Abschnitt 1.1.1.). Hingegen ist Fibrin im polymerisierten Zustand so fest, dass EHTs aus Fibrin kaum zu reißen drohen. Pro Fibrin-EHT werden 5 mg Fibrinogen eingesetzt. Vieles spricht dafür, dass die Menge an Fibrin in der polymerisierten, steifen Form sehr viel kleiner als die eigentlich eingesetzte Menge ist: Das Fibrinogen, welches im Rekonstitutionsmix eingesetzt wird, besteht nur zu 55-70% aus Protein, wovon etwa 90% vom Hersteller als „gerinnbar“ angegeben werden. Darüber hinaus spalten die im Medium (Hühnerembryonenextrakt, Pferdeserum) enthaltenen und von den Zellen produzierten Proteasen von dem polymerisiertem Fibrin Produkte ab, welche mit dem Medium gewaschen werden. Außerdem wird die Fibrinmatrix von im Serum enthaltenen Proteasen degradiert, speziell durch Plasmin. Dieses kann zum Teil durch Zugabe von Aprotinin, welches Plasmin spezifisch hemmt, inhibiert werden kann. Auf die Modellierbarkeit der Kollagenmatrix durch im EHT enthaltene Zellen ist in Expressionsanalysen von Matrix-Metalloproteasen in vorherigen Arbeiten hingewiesen worden. Zusätzlich wurde in Kollagen-EHTs die Produktion von Kollagen Typ IV nachgewiesen. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Kollagenproduktion in Kollagen-EHTs unter anderem durch TGF-β angeregt wird. Histologische Analysen an Fibrin-EHTs zeigten, dass in dem Fibrin enthaltene Zellen lokal Kollagen produzierten (siehe Abb. 14). Dies kann auf ein Bestreben der Zellen hindeuten, eine eigene Basallamina auszubilden. Die Fibrinmatrix unterlag flächenhaft verteilten Modellierung. So zeigte die Extrazellulärmatrix in Azanfärbungen unterschiedlich intensive Rotfärbungen, die auf unterschiedliche Fibrinkonzentrationen hinwiesen, die mit lokal unterschiedlichen Zelldichten korrelierten (siehe Abb. 14). In Kollagen-EHTs wurde häufig eine Ausbildung von Zellkonglomeraten gefunden, wohingegen in Fibrin-EHTs kaum solche Konglomerationen aufzufinden waren. Möglicherweise bietet die Resuspension der Zellen in Fibrin eine bessere Ausbildung eines Zellarrangements, welches zu einem erhöhten funktionellen Synergismus führt.

Prinzipiell unterscheiden sich Kollagen- und Fibrinmatrices in der Hinsicht, dass Zellen in Kollagen eine relativ dichte Matrix repopulieren, wohingegen in Fibrinkonstrukten die Zellen zunächst mit Fibrinogen vermischt werden und dann die enzymatische Polymerisierung der Fibrinogenketten die Zellen einfängt. Während dieses Polymerisierungsschrittes können Wachstumsfaktoren mittels der im Serum enthaltenen Transglutaminase (Faktor XIII) kovalent an das Fibringerüst gebunden werden. Eine höhere Exposition der Kardiomyozyten mit Wachstumsfaktoren ist dementsprechend vorstellbar. Die Rigidität und Struktur der Fibrinmatrix können durch Polymerisierung unter unterschiedlichen Bedingungen beeinflusst werden (van Hinsbergh et al. 2001). Für Kollagen ist dergleichen nicht bekannt, was den Einsatz von Fibrin für *tissue engineering*-Ansätze brauchbarer macht. Für Transplantationszwecke eignet sich das Fibrin deswegen besonders, weil der schnelle Abbau von Fibrin durch Plasmin die Verbindung und das Anwachsen des transplantierten Gewebes am Empfängerherzen erleichtert. Fibrin kann weiterhin aus dem Empfängerserum gewonnen werden, dadurch ist mit einer geringeren Immunabwehr des Empfängers gegen das Transplantat zu rechnen.

Für die strukturelle Analyse der EHTs war die Azanfärbung sehr geeignet, da sie kollagene Fasern blau und Zellkern sowie –körper rot färbt. In Kollagen-EHTs lässt sich deutlich der Zellkörper von der Matrix unterscheiden, was einen schnellen Überblick über den Zellgehalt ermöglicht. In Fibrin-EHTs hingegen fallen durch die unterschiedliche Anfärbbarkeit von Kollagen und Fibrin lokale Produktionen von Kollagen auf. Die technisch schwierige Durchführung dieser Trichromfärbung führt jedoch dazu, dass Färbungen nie von einer ganz gleichen Intensivität sind. Daher sollte die Azanfärbung nur für spezielle Fragestellungen angewandt und in der Routinefärbung eine H.-E.-Färbung durchgeführt werden. Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie von Fibrin-EHTs war leichter als von Kollagen-EHTs, da weniger Hintergrundsignal bei der Bildgebung störte. Möglicherweise hat Kollagen mehr Autofluoreszenz (Monici 2005) als Fibrin. Auch ist es denkbar, dass sich Abbauprodukte und nekrotische Zellen vermehrt in dem Kollagennetz verfangen und aus Fibrin-EHTs besser ausgewaschen werden.

4.2 EHT-Vaskularisierungsversuche mittels des Chorioallantoismembran-Assays

Vorherige Arbeiten zeigten, dass EHTs die Herzfunktion durch Implantation auf infarzierte Rattenherzen verbessern können. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich in implantierten EHTs perfundierte Gefäße ausbilden (Zimmermann et al. 2006). Um den Prozess der EHT-Vaskularisierung besser zu charakterisieren, wurde folgende Hypothese formuliert: **Implantiert auf die CAM des bebrüteten Hühnereis wachsen Gefäße aus der CAM in das EHT hinein, finden Anschluss an ein präexistierendes Gefäßnetz und perfundieren das EHT.**

Erste Versuche, Kollagen-EHTs auf der CAM zu kultivieren, zeigten, dass etwa die Hälfte der EHTs während der Zeit auf der CAM kontrahierten und ihre ursprüngliche Form beibehielten. Andere jedoch verloren viel Substanz, wurden atroph und kontrahierten folglich nicht mehr. Histologische Strukturanalysen zeigten degenerierte Kardiomyozyten in ausgetrockneten sowie nicht ausgetrockneten Präparaten. Versuche, die Kulturbedingungen des EHTs auf der CAM zu optimieren, umfassten die statische Dehnung der EHTs mittels eines Ringstretchers, die Abdeckung der EHTs mit unterschiedlichen Materialien wie Parafilm, Dialysemembran sowie die gleichzeitige Abdeckung und Versorgung des EHTs mit Medium mittels eines vollgesogenen Gelatineschwamms. Die Einführung des Ringstretchers verhinderte das Austrocknen der Präparate nicht. Die Abdeckung der EHTs mit Parafilm oder Dialysemembran zeigte einen negativen Einfluss auf die Entwicklung der EHTs. Kardiomyozyten wurden selbst unter dem Parafilm atroph, sistierten zu kontrahieren und zeigten eine degenerierte Struktur in mikroskopischen Analysen (siehe Abb. 20, 21). Die Versorgung der EHTs mit Medium schützte die Struktur der EHTs. Diese Präparate trockneten nicht aus und zeigten ein vergleichbar dichtes Netz an Kardiomyozyten wie es in nativen Präparaten gefunden wurde. Leider schadete das Medium der Entwicklung und Vitalität der Embryonen, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt werden konnte. Da EHTs die Eigenschaft haben zu kontrahieren, ist es nicht möglich, das EHT mit Medium zu versorgen, es auf die CAM zu bringen und gleichzeitig die CAM von dem Medium verschont zu lassen, da die Kontraktionen das Medium auf die CAM durchsickern lassen würden. Eventuell sind Komponenten des EHT-Mediums in kleinen Mengen schädlich für die Embryonalentwicklung, beispielsweise die hohe Konzentration an

Wachstumsfaktoren in dem Hühnerembryonenextrakt oder Triiodthyronin in dem Pferdeserum.

Die weiteren Arbeiten wurden mit unbedeckten, jedoch gestreckten EHTs durchgeführt. Dass die Bedingungen für die EHTs auf der CAM suboptimal waren, zeigte sich auch in den Genexpressionsanalysen. Der Unterschied zwischen den Expressionsleveln des *housekeeping-genes* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und den ausgewählten Genen für VEGF-A, FGF-2, Angiopoietin-1, VEGF-B, MHC-6, CD31 und VE-Cadherin war in den EHTs, die vier Tage auf der CAM inkubiert worden sind, um einiges größer als in den nativen EHTs. Dies spricht für eine allgemeine Herunterregulation der Expression aller Gene, die nicht für den Grundstoffwechsel der Zelle benötigt werden. Eine solche Herunterregulation der Gene tritt ein, wenn die Kulturbedingungen der Zelle nicht den Bedürfnissen der Zelle entsprechen. Die Austrocknung mancher Präparate, die mikroskopischen Untersuchungen sowie die Herunterregulation fast aller getesteten Gene sprechen dafür, dass die CAM den Kardiomyozyten schadet. Ein Gewebeerhalt nach Implantation ist jedoch die Voraussetzung für Angiogenese in das Gewebe hinein, sowie für die Regeneration des zu ersetzenden Gewebes. Auf der CAM scheinen die Voraussetzungen für einen Strukturertalt nicht gegeben zu sein, was dieses Modell zur Untersuchung von EHT-Vaskularisierung ungeeignet machte. Der ursprünglich erkannte Vorteil der CAM als ein offenes System lag in der direkten Beobachtungsmöglichkeit des Vaskularisierungsprozesses. Da der Vaskularisierungsprozess jedoch nicht in dem erwarteten Maße eintrat, war diese Eigenschaft unnützlich.

Was macht die CAM ungeeignet für die Untersuchung von *tissue engineering*-Produkten wie EHTs? Faktoren wie die fehlende Versorgung des EHTs mit ausreichend Nährstoffen durch Medium und die Kultivierung an der Luft tragen zu den schlechten Kulturbedingungen bei. Durch den fehlenden Kontakt zu EHT-Kulturmedium wird das EHT weder mit Glukose noch mit Mineralien, Aminosäuren etc. versorgt. Außerdem können Stoffwechselprodukte wie Laktat nicht aus dem Gewebe gespült werden, was zellschädigend wirkt. Die Umgebungsluft enthält 21% Sauerstoff, dies entspricht 260 mg/l. Bei 20 °C und einem Umgebungsdruck von 1 bar lösen sich in reinem Wasser etwa 8 mg/l Sauerstoff, wobei die Löslichkeit von Sauerstoff mit steigender Temperatur abnimmt, so dass Kulturmedium bei 36°C

wahrscheinlich weniger Sauerstoff enthält. Eine hohe Sauerstoffbelastung führt in Zellen zu Akkumulation von freien Sauerstoffradikalen, die cytotoxisch wirken (Lin et al. 2008). Zudem ist die CAM ein Sammelbecken für stickstoffhaltige Endabbauprodukte, welche durch den Embryo produziert werden (Bellairs and Osmond 2005, Dawes 1975). Auch diese könnten den Metabolismus der EHT-Zellen negativ beeinflussen, wenn sie in das EHT diffundieren. Diesen Gründen gegen den Gebrauch der CAM steht die in der Einleitung dargelegte Vielfalt der CAM-Anwendung für Fragen der Angiogenese entgegen. Bei genauen Recherchen fällt jedoch auf, dass in der Literatur vornehmlich drei Anwendungen der CAM diskutiert werden: Die Testung von Substanzen und azellulären Biomaterialien auf der CAM sowie die Untersuchung des angiogenetischen Potentials von Tumorzellen mittels der CAM. Für erstere Anwendungen sind die oben genannten unvorteilhaften Eigenschaften des CAM-Assays gegenstandslos. Und gerade Tumorzellen zeichnen sich durch ihre hohe Widerstandsfähigkeit und Apoptoseresistenz im Gegensatz zu Kardiomyozyten in EHTs aus, was deren Kultivierung auf der CAM einfacher macht.

Die Testung von Geweben nicht tumorösen Ursprungs beschränkt sich auf insgesamt vier veröffentlichte Ansätze. Im Folgenden werden diese kurz vorgestellt und der bedeutende Unterschied zu dem dieser Arbeit zu Grunde liegendem Versuchsaufbau diskutiert. Borges et al konstruierten eine Kulturschale für in Fibrinmatrix ausgesäte Präadipozyten zur Kultur auf der CAM. Die Kulturschale war unten und oben offen, so dass die in Fibrin ausgesäten Zellen Kontakt zur CAM hatten und von oben mit Medium versorgt werden konnten, ohne dass dieses mit der CAM in Kontakt geriet (Borges et al. 2003b). Die Präadipozyten differenzierten und es bildeten sich perfundierte Gefäße in der Fibrinmatrix, deren Wachstum durch die vermehrte Expression von VEGF der Präadipozyten noch verstärkt wurde. Unterschiede zum EHT Modell waren i) die Nutzung von Präadipozyten, also undifferenzierten Vorläuferzellen, ii) die Versorgung der Zellen mit Medium zur Erhöhung der Vitalität der Zellen und iii) die Tatsache, dass Präadipozyten nicht den cytotoxischen Effekten der freien Luft ausgesetzt waren. In einer zweiten Arbeit wurde humanes Endometrium aus der proliferativen Phase auf die CAM implantiert und zeigte einen angiogenetischen Effekt (Maas et al. 1999). Im Unterschied zum EHT-Ansatz handelte es sich hier um ein Gewebe, was durch eine hohe mitotische Teilungsrates gekennzeichnet ist (Lüllmann-Rauch 2003). Da es sich um natives

Gewebe handelt, war die Zelldichte viel höher als in EHTs. Ein weiterer Ansatz verfolgte die Vaskularisierung von myokardialen Mikrostrukturen, die mit HUVEC-Zellen ummantelt auf die CAM gelegt wurden (Kelm et al. 2006). Nach zwei Tagen zeigten diese Konstrukte in ihrem Inneren perfundierte Gefäße Vogel-Ursprungs. Jedoch tragen folgende Faktoren zur Vaskularisierung der Mikrogewebe bei, die bei dem EHT-Ansatz fehlen: i) Die maximal 200 µm großen Konstrukte tauchten in die CAM ein, was einerseits deren Versorgung mit interstitieller Flüssigkeit sicherstellte und zweitens diese Gewebe vor oxidativem Stress schützte; ii) die Mikrokonstrukte wurden ohne extrazelluläre Matrix mittels der Methode des hängenden Tropfens generiert, daher war die Zelldichte vermutlich höher als in EHTs. Schließlich verglichen Ausprunk et al. verglichen die Vaskularisierung von neoplastischen, embryonalen und adulten Geweben unterschiedlichen Ursprungs auf der CAM (Ausprunk et al. 1975). Dabei zeigte sich, dass präexistierende Gefäße aus Rattentumorgewebe zerfallen und das Tumorgewebe mit einem Vogel-stämmigen Netz revaskularisiert wurde. Das Gefäßnetz des embryonalen Rattengewebes fand Anschluss an ein aus der CAM hineinwachsendes Gefäßnetz. Nur das adulte Gewebe wurde nicht revaskularisiert, sondern das eigene Gefäßnetz degenerierte. Das implantierte Gewebe zeigte zentrale Zellschädigungen und wurde durch CAM-Zellen und CAM-Bindegewebe invadiert. Nur an den peripheren Gewebestellen wurde gelegentlich Revaskularisierung beobachtet, schließlich folgten jedoch die Zersetzung und Phagozytose des implantierten Gewebes durch die CAM-Zellen. Wie sind die Ergebnisse der viertägigen EHT-Kultivierung auf der CAM zu beurteilen?

Aufgrund der Ausbildung von perfundierten Gefäßen in Kollagen-EHTs, die auf ein Rattenherz implantiert waren, wurde eine ähnliche Perfusion der EHTs auf der CAM erwartet. Die morphologischen Untersuchungen von Kollagen-, Fibrin- und mit T_b4-supplementierte Fibrin-EHTs, die vier Tage auf der CAM inkubiert worden sind, zeigten jedoch unterschiedliche Reaktionen der CAM auf das EHT, die allesamt nicht zu einem perfundierten Gefäßnetz im EHT führten. In Kapitel 3.5 ist anhand von makroskopischen sowie lichtmikroskopischen und konfokal-mikroskopischen Bildern die Entwicklung der EHTs auf der CAM dargestellt. In etwa 70% der Fälle war ein ähnliches Bild zu sehen, wie die von Ausprunk et al. beschriebenen Einwüchsen von CAM-Material in adulte Rattengewebe: an der Grenzfläche zwischen CAM und EHT wurden in etwa 45% der Präparate Strukturen gefunden, die charakteristische

Eigenschaften von angiogenetischen Prozessen aufwiesen. Immunfluoreszenzfärbungen zeigten Hühnererythrozyten, die sich unterschiedlich tief ins Gewebe schlängelten. Diese Zellen wiesen mitunter ein punktförmiges oder verwischtes Färbemuster auf. Da dieses Signal in den Negativkontrollen ohne primären Antikörper nicht aufzufinden war, kennzeichnet es möglicherweise eine Morphologieänderung der unreifen migrierenden CAM-Zellen oder eine Sekretion des Antigens (Art des Antigens ist unbekannt). Lektin-positive Zellen assoziierten sich in einigen Fällen mit den invadierenden Zellen, so dass sie die roten Blutkörperchen umgrenzten wie ein Endothel. Über die Herkunft dieser Zellen lässt sich keine eindeutige Aussage machen. Einerseits könnte es sich um Endothelzellen des EHTs handeln, die sich zur Ausbildung eines Gefäßes mit den roten Blutkörperchen assoziierten. Andererseits sind in den Färbungen der nativen CAM extravasale Zellen der CAM mit Lektin anfärbbar, die möglicherweise Hämangioblasten entsprechen und im EHT zur Gefäßausbildung rekrutiert wurden. Lektine färben zwar vorwiegend membranständige Zuckerreste, jedoch ist der Zielzucker des hier verwendeten Lektins aus *Bandeira simplifoica* auch an intrazelluläre Proteine konjugiert (Zachara 2009). Etwa 25% der Präparate zeigten bis tief in das EHT eindringende Einwüchse, die das EHT Gewebe zersetzten und mit breitbasigen Migrationsfronten invadierten. Ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Destruktion bzw. der Invasion mit gefäßähnlichen Strukturen war nicht zu erkennen. Explantate mit gut erhaltener Gewebestruktur zeigten mitunter gar keine Einwüchse. An den Gewebeflächen, die durch eine Zersetzung der Matrix durch CAM-Zellen gekennzeichnet waren, fällt in Kollagen- sowie Fibrin-EHTs auf, dass die Kardiomyozyten sehr gut erhalten waren, in Schichten übereinander lagen und ausgestreckte Zellkörper zeigten. In Fibrin-EHTs waren die Kardiomyozyten an der äußersten, der CAM anliegende Fläche in etwa der Hälfte der Präparate sehr gut erhalten. Dies spricht dafür, dass die nutritiven Effekte der interstitiellen CAM-Flüssigkeit der cytotoxischen Wirkung von Stickstoffabbauprodukten überwiegen und Fibrin als Matrix möglicherweise geringeres Diffusionshindernis darstellt als Kollagen.

Was führt dazu, dass in EHTs eher zaghafte, ungeordnete und destruirende Reaktionen stattfanden und andere Gewebe durch CAM-Gefäße vaskularisiert werden? Da in etwa 90% der Fälle die Kardiomyozyten degenerierten, nimmt die

Produktion von Wachstumsfaktoren, die die CAM-Endothelzellen zur Aussprossung in das EHT stimulieren, ab. Zwar zeigen Fibrin sowie Fibrindeggradationsprodukte auf dem CAM-Assay angiogenetische Aktivität (Thompson et al. 1985), jedoch scheint diese nicht stark genug zu sein, um ein geordnetes Gefäßwachstum zu provozieren. Die Tatsache, dass Ausprunk et al. bei adulten Geweben sehr ähnliche Reaktionen vorfanden wie die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse, spricht dafür, dass die Zellen in EHTs eher adultem als neonatalem Gewebe ähneln. Tatsächlich konnte in vorherigen Arbeiten gezeigt werden, dass EHTs während der zwölf-tägigen Kultur Eigenschaften von adultem Gewebe annehmen (Boy 2006). Ein zweiter Grund für die geringe Angiogenese könnte darin bestehen, dass die Kombination von zwei Geweben unterschiedlicher Spezies zu einer Nicht-Übereinstimmung der Liganden mit den Rezeptoren der unterschiedlichen Gewebe führt. So wurde in Abschnitt 3.7 gezeigt, dass VEGF-A humanen und Vogel-Ursprung nur 65% Sequenzhomologie aufweisen. Andere Ansätze haben ebenfalls Xenotransplantate erfolgreich vaskularisiert. Allerdings zeigte die Studie von Ausprunk et al., dass embryonale Hühnergewebe innerhalb von 1-2 Tagen revaskularisiert wurden, embryonale Rattengewebe aber erst nach 2-3 Tage. Ob eine Verlängerung des Inkubationszeitraumes zu einem organisierterem Gefäßnetz im EHT führen würde, ist fraglich. Erstens sind die in der Literatur beschriebenen Ansätze eher kürzer als länger als im EHT-Modell und zweitens würde eine Verlängerung der EHT-Inkubation auf der CAM eher zu einem weiteren Austrocknen und Degeneration der EHT-Zellen führen.

Anhand dieser Unterschiede zwischen den Ansätzen, die entweder eine Vaskularisierung des nicht-tumorösen Gewebes ermöglichten oder einen angiogenetischen Reiz auf die CAM ausübten, und dem EHT-Modell lässt sich feststellen, welche Bedingungen für die Untersuchung von Gewebe auf der CAM gegeben sein müssen. i) Die Vitalität des Gewebes muss aufrecht erhalten werden, entweder durch einen Versuchsaufbau, der die Versorgung mit Medium ermöglicht, durch die Invagination des Gewebes in die CAM hinein, so dass das Gewebe mit interstitieller Flüssigkeit der CAM versorgt wird (hierfür eignen sich jedoch nur sehr kleine Gewebe) oder durch die Verwendung von Geweben mit großer Resistenz gegenüber cytotoxischen Reizen wie Tumorzellen, ii) die Vaskularisierung scheint von der Entwicklungsstufe des Gewebes abhängig zu sein: embryonale Gewebe,

entdifferenzierte Tumorgewebe oder Vorläuferzellen eignen sich besser zur Vaskularisierung auf der CAM als adulte Gewebe oder Zwischenstufen zwischen neonatalen und adulten Geweben wie EHTs.

4.3 Der Einfluss von Thymosin β_4 auf Fibrin-EHTs

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit umfasste die Möglichkeit einer Verstärkung des angiogenetischen Reizes, den EHTs auf die Gefäßentwicklung der CAM ausüben, durch Wachstumsfaktoren. Dafür wurde Tb4 als ein als kardioprotektiver (Bock-Marquette et al. 2004) bekannter und angiogenetischer Faktor (Smart et al. 2007b) verwendet. Die folgende Hypothese wurde mittels Medium-Supplementierung mit Tb4 und anschließender EHT-Charakterisierung geprüft. **Unter dem Einfluss von Tb4 kultivierte EHTs haben ein dichteres Netz aus Kardiomyozyten und erhöhen damit den angiogenetischen Reiz, den das EHT auf die CAM auswirkt, was sich in einer stärkeren angiogenetischen Antwort der CAM auf das EHT zeigt.**

Kontraktionskraftmessungen an EHTs, die mit Tb4 behandelt wurden, zeigten eine maximale Kontraktionskraft, die 363% derjenigen der Kollagen-EHTs und 167% derjenigen der Fibrin-EHTs betrug. Analog zu den obigen Ausführungen ist eine gesteigerte Kontraktionskraft durch i) eine erhöhte Zahl an Kardiomyozyten, ii) größere Kardiomyozyten oder iii) eine ausgeprägtere Vernetzung der Kardiomyozyten zu einer funktionellen Einheit möglich.

Für die Herstellung von Fibrin-EHTs mit und ohne Tb4-Behandlung wurde dieselbe Anzahl an Zellen eingesetzt. Zahlreiche Studien weisen auf eine anti-apoptotische Wirkung von Tb4 hin, wobei einerseits die Inhibition von Caspasen-Aktivierung (Moon et al. 2007) sowie die verminderte Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien (Sosne et al. 2004) und andererseits die Aktivierung von der Proteinkinase B und einem darauffolgenden Proliferations- und Überlebenssignal in die Zelle hinein vermutet werden (Bock-Marquette et al. 2004). In EHTs könnten diese Effekte dazu führen, dass die mit Tb4-supplementierten EHTs nach der 12-tägigen Kultur mehr Kardiomyozyten enthalten bei gleichbleibendem Verhältnis zwischen Nicht-Kardiomyozyten und Kardiomyozyten als unsupplementierte Fibrin-EHTs. In diesem Fall wäre die Menge mRNA für MHC im Verhältnis zum

Haushaltsgen nicht verändert, obwohl sich im Gesamt-EHT mehr kontraktile Einheiten befinden. Mit Tb4- behandelte EHTs enthielten 162% der RNA-Menge für MHC von derjenigen der Kollagen-EHTs und 122% der RNA-Menge von derjenigen der Fibrin-EHTs. Wie oben im Vergleich zwischen Kollagen- und Fibrin-EHTs ausgeführt kann eine in etwa gleichbleibende Menge mRNA für MHC zu einer insgesamt erhöhten Menge an kontraktile Einheiten führen, wenn i) das Verhältnis zwischen Kardiomyozyten und Nicht-Kardiomyozyten in supplementierten und un-supplementierten Fibrin-EHTs gleich ist ii) das MHC-Protein weniger degradiert wird (Matsuo et al. 1998) oder die mRNA verstärkt translatiert wird (Ivester et al. 1995). Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten ein dichteres Netz an Kardiomyozyten in den mit Tb4-behandelten EHTs. Sowohl in den lichtmikroskopischen als auch in den konfokal-mikroskopischen Untersuchungen schienen die Zellen vermehrt geschichtet, dichter, aber auch größer als in un-behandelten EHTs. Da dies jedoch nicht quantifiziert worden ist, ist hierzu keine eindeutige Aussage zu treffen. Da, wie oben dargestellt, die mRNA-Messung kein guter Parameter für die Menge an MHC Protein darstellt, müsste zusätzlich die Proteinkonzentration von MHC gemessen werden. Erst dann ist eine Aussage darüber zu treffen, ob es tatsächlich mehr kontraktile Einheiten in mit Tb4-supplementierten Kardiomyozyten gibt. Pathologische Hypertrophie zeigte in Tiermodellen einen Wechsel der vorherrschenden MHC von der alpha- zur beta-Isoform. Da die hier getestete Variante der alpha-Kette entspricht, könnte eine vermehrte Expression von MHC (nämlich der beta-Isoform) übersehen worden sein. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da EHTs wie beschrieben altern und die alpha-Isoform in adultem Gewebe die vorherrschende Form ist. Daher wurde dies nicht untersucht.

Bei den Genexpressionsanalysen fiel insbesondere auf, dass die Tb4-Supplementierung die mRNA-Menge für VEGF-B drastisch erhöhte. Interessanterweise wurden gerade kürzlich myokardspezifische Effekte von VEGF-B charakterisiert: Karpanen et al. (2008) zeigten, dass die Überexpression von VEGF-B in Mäuseherzen zu einer kardialen Hypertrophie mit vergrößerten Kardiomyozyten führt. Die Expression von VEGF-B ist im Gegensatz zu VEGF-A nicht durch die Oxygenierung des Gewebes reguliert, denn dem VEGF-B Promotor fehlen hypoxieresponsive Elemente (HRE) (Nash et al. 2006). Li et al. (2008) zeigten, dass

VEGF-B eine herzspezifische Funktion bei der Revaskularisierung von ischämischen Herzgeweben zukommt, die in anderen ischämischen Geweben nicht gegeben ist (Li et al. 2008)(Li et al. 2008). Nur in ischämischen Herzen wurde die Expression von VEGF-B hochreguliert, in anderen Geweben jedoch nicht. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass VEGF-B eine wichtige Funktion im Lipid-Stoffwechsel zukommt (Karpanen et al. 2008). Diese neuen Erkenntnisse über die Funktion von VEGF-B sowie die Tatsache, dass Tb4 zu einer massiv erhöhten Expression von VEGF-B führt, suggeriert, dass die Beobachtungen zu Tb4-supplementierten EHTs auch VEGF-B vermittelt sein können, wie zum Beispiel die vermutete Größenzunahme der Kardiomyozyten. Bisher galt die Funktion von VEGF-B als relativ unbekannt, im Gegensatz zu dem Protagonisten der VEGF-Familie VEGF-A. Da VEGF-B nur an Tie-1 bindet und nicht an Tie-2, wie VEGF-A es tut, ist es wahrscheinlich, dass diese neu aufgedeckten Effekte von VEGF-B über einen bisher unbekanntem Co-Rezeptor vermittelt werden (Claesson-Welsh 2008).

Die angiogenetischen bzw. destruierenden Effekte der CAM auf das EHT blieben durch die Supplementierung der EHTs mit Tb4 unverändert. Auch die mit Tb4 behandelten Kardiomyozyten degenerierten größtenteils auf der CAM. Dennoch werden für Tb4 verschiedene anti-apoptotische Mechanismen beschrieben. Dass die Kardiomyozyten trotzdem degradierten, könnte durch eine relativ kurze Wirkdauer des Tb4 erklärt werden, denn auf der CAM wurden die EHTs nicht weiter mit Tb4 supplementiert. Der anti-apoptotische Effekt dieses Moleküls würde den Zellen auf der CAM dann nicht mehr zugute kommen. Bezüglich der Wirkdauer von Tb4 sind keine Werte bekannt. Auch was die Ausstattung der EHTs mit Endothelzellen anbelangt, war kein Unterschied zwischen Fibrin-EHTs und Tb4-Fibrin-EHTs festzustellen. Obwohl, wie in der Einleitung dargelegt, Tb4 in vorherigen Studien vielfach als Angiogenese-stimulierend (Malinda et al. 1999) beschrieben worden ist, fanden die Endothelzellen nicht vermehrt Kontakt zueinander und bildeten auch nicht vermehrt tubuläre Strukturen aus.

Die VEGF-A Expression war in mit Tb4 -behandelten EHTs geringer als in unbehandelten EHTs. Dies steht im Widerspruch zu einer Erkenntnis von Oh et al 1997, die einen stabilisierenden Effekt von Tb4 auf *Hypoxia-inducible-factor-1* (HIF-

1) fanden, und damit einhergehend eine erhöhte Expression des VEGF-A-Gens. Zusammengenommen weist dies auf einen komplizierteren Regulationsmechanismus der Expression von VEGF-A hin, oder auf eine vielgestaltigere Wirkung von Tb4 auf die HIF-1 Stabilisierung und die Expression von VEGF-A. Diese Arbeit zeigt, dass EHTs sich gut zur Untersuchung des Effektes von Tb4 auf Herzmuskelgewebe eignen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hinweise auf eine kontraktionskraftsteigernde sowie eine VEGF-B expressionsfördernde Wirkung von Tb4 gefunden. Ob beispielsweise Tb4 in die Zellen aufgenommen wird oder ob es einen Rezeptor für das Peptid gibt, sowie die Wirkungen von Tb4 unabhängig von VEGF-B, verbleiben Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

4.4 Chorioallantoismembran-Assay als Angiogenesemodell

Im Unterschied zu den vielen in der Einleitung dargelegten Anwendungen des CAM-Modells zur Untersuchung angiogenetischer Effekte wurde im Rahmen dieser Arbeit das Gefäßwachstum eher zögerlich induziert. Mit 2 µg FGF-2, sowie 300 ng Tb4, mittels eines Gelatine-Schwamms aufgebracht auf die CAM, wurde Gefäßwachstums stimuliert. Die CAM in der Nähe des Schwamms zeigte eine sequentielle Zunahme der Gefäßdichte vom ersten bis zum vierten Tag. Bei den VEGF-A-Proben erfolgte dies nicht. Bei genauem Hinsehen waren die eigentlich dünnen Kapillaren direkt um den Schwamm herum geweitet.

Analog zu der Entwicklung einiger EHTs auf der CAM waren die Schwämme nach ein paar Tagen Inkubation trocken und kleiner als zu Beginn. Die Hühnereier wurden bei 37°C und gesättigter Luftfeuchtigkeit bebrütet, was einen Wasserverlust an die Umgebungsluft unwahrscheinlich macht. Wenn die CAM eine höhere Osmolarität aufweist als das in dem Schwamm enthaltene Lösungsmittel, kann dies das Austrocknen erklären. Diesbezüglich sind keine Werte bekannt, es ist jedoch nicht auszuschließen (Domenico Ribatti, persönliche Kommunikation). Darüber hinaus kann eine Degradierung des Schwammtrabekelwerks durch invadierende Zellen als Ursache für die Größenabnahme angenommen werden. Der Gelatineschwamm besteht aus kollagenen Fasern, die durch diverse von den CAM-Zellen produzierte Proteasen abgebaut werden können. Aber auch in Fällen einer solchen „Austrocknung“ war ein Gefäßwachstum um den Schwamm herum auszumachen.

Wie ist der Unterschied in der Induzierbarkeit von Gefäßwachstum mittels VEGF-A, FGF-2 und Tb4 zu erklären? Ein Aminosäuresequenzvergleich zwischen dem zur Positiv-Kontrolle verwendeten humanen, rekombinanten VEGF-A und dem Huhn-spezifischen VEGF-A ergab eine Sequenzübereinstimmung von 65%. Die Aminosäuresequenz von Tb4 ist hingegen in beiden Spezies zu 100% identisch. Auch FGF-2 zeigte immerhin eine Sequenzübereinstimmung von 92%. Eventuell ist gerade die Rezeptorbindungsstelle des VEGF-A in beiden Spezies unterschiedlich, so dass menschliches VEGF-A schlechter an den VEGF-Rezeptor 1 oder 2 des Huhns binden kann und damit auch keinen angiogenetischen Reiz auslösen kann. Die Sequenzen von FGF-2 und Tb4 sind hingegen konserviert, so dass eine Spezies-übergreifende Rezeptor-Liganden-Bindung stattfindet. Dementsprechend wären höhere Mengen VEGF-A als FGF-2 oder Tb4 nötig um Gefäßwachstum zu induzieren.

Das verwendete Protokoll arbeitet mit der von Ribatti et al. vorgeschlagenen Applikation des angiogenetischen Wirkstoffes mittels eines vollgesogenen Gelatineschwamms und der von Wilting et al. beobachteten ausreichenden Menge an VEGF-A (Wilting et al. 1993). Da Wilting et al. 0,5-4 µg humanes rekombinantes VEGF-A 165 mittels eines ~5 mm² großen Deckgläschen auf die CAM aufbrachten, konnten sie kleinere, dezentere Reaktionen der CAM auf das VEGF-A besser beurteilen. In der Tat beschränkte sich das Gefäßwachstum auf die direkt unter dem Deckgläschen befindliche CAM, jedoch nicht auf die Areale, die nicht mit dem Deckgläschen in Verbindung waren. Mit dem Gelatineschwamm-Modell sind so diskrete Veränderungen schwer zu detektieren, da der Schwamm, anders als ein Deckgläschen, nicht durchsichtig ist. Der Vorteil dieser Applikationsform liegt jedoch darin, dass die Gefäßzellen dabei in den Schwamm hineinwachsen können. Gelatine gibt den Zellen reichlich Adhäsionsmöglichkeiten (Mattii et al. 2008) und das Trabekelnetzwerk ist großporig genug, um solch ein Wachstum zu ermöglichen. Gerade hinsichtlich der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung war es von Interesse, ob so ein vertikales Wachstum in ein Gewebekonstrukt überhaupt möglich ist.

Große Mengen VEGF-A (>3 µg) wurden in der vorliegenden Arbeit nur ein- bis zweimal ohne Erfolg getestet. In der unmittelbaren Umgebung des Schwamms war

bei bloßer Betrachtung mit dem Auge und einer 1,63-fachen Vergrößerung mit dem Stereomikroskop von oben keine größere Gefäßdichte auszumachen als in einem weiter peripher gelegenen Areal der CAM. Möglicherweise sprossen jedoch aus den präkapillären Arteriolen direkt unter dem Schwamm kleine Gefäße aus, so wie Wiltig et al. 1993 es beobachtet haben, die hier nicht detektiert wurden. Ein mit FGF-2 vollgesogener Schwamm war nach viertägiger Inkubation auf der CAM gefüllt mit Zellen. Im Schwammtrabekelwerk wurden mittels lichtmikroskopischer Untersuchungen sowie Immunfluoreszenzfärbungen rote Blutkörperchen ausfindig gemacht. Dies beweist die Fähigkeit der CAM-Gefäße, vertikal in Objekte hinein zu sprießen. Jedoch war auch hier die Anzahl an Gefäßen im Trabekelwerk nicht so hoch, als dass diese Menge ein künstliches Gewebe mit Blut versorgen könnte.

Ein Nachteil der Testung angiogenetischer Moleküle mit der Gelatineschwammethode ist, dass der Gelatineschwamm durch sein Gewicht die CAM verzerrt, jedes mal, wenn der Embryo sich bewegt. Dies führt zu Traktionen der Gefäße auf der CAM, ein ungeübtes Auge würde diese Traktionen als ein Hinwandern der Gefäße zu dem Schwamm interpretieren. Jedoch handelt es sich um ein mechanisches Anziehen und nicht um einen chemotaktischen Reiz.

Zusammenfassend lassen sich die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Eignung des CAM-Modells zur Testung angiogenetisch wirksamer Faktoren mittels des Gelatineschwammversuches wie folgt beurteilen:

- Eine deutliche angiogenetische Antwort der CAM auf einen applizierten Stoff, der mit einem Schwamm auf die CAM appliziert wurde, war nur bei sehr hohen Konzentrationen dieses Stoffes zu erreichen. Dies ist kostspielig.
- Vertikales Gefäßwachstum ließ sich mit dem Gelatineschwammversuch nachweisen.
- Mechanische Gefäßtraktionen um den Schwamm herum erschwerten das Erkennen einer wahren angiogenetischen Antwort. Um dies zu unterscheiden, gibt es Ansätze, die Verzweigungen der Gefäße in Nähe des Schwamms zu messen (Ribatti et al. 2006). Da dies zeitaufwendig ist, ist die Eignung als Screening-Methode für angiogenetische Wirksamkeit fraglich.

- Die Testung der angiogenetischen Kapazität einer Substanz lässt sich evtl. leichter mit dem Protokoll nach Wiltig et al. (1993) ausführen. Dagegen ist die Applikation von Zellen nur mit dem Protokoll nach Ribatti et al. (2006) möglich.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass sich künstlich hergestellte Herzgewebe auf Fibrinbasis von analogen Herzgeweben auf Kollagenbasis unterscheiden: Sie waren in der Herstellung besser reproduzierbar, robuster und weisen höhere Kontraktionskräfte auf. Die Kontraktionskraft war durch Behandlung mit Tb4 steigerbar. In wie weit die Behandlung mit Tb4 zu einem dichteren Netzwerk aus Kardiomyozyten führt, bleibt zu klären. Dies gilt auch für die Frage, ob die Wirkungen von Tb4 extrazellulär oder intrazellulär vermittelt werden, sowie ob die Wirkungen direkt durch Tb4 oder durch die von Tb4 induzierte Expression von VEGF-B oder anderer bislang unbekannter Faktoren bedingt sind. Dies soll zukünftig anhand kleinerer, auxoton gestretcher Fibrin-EHTs untersucht werden. Der CAM-Assay stellte sich in dieser Arbeit als ungeeignet zur Untersuchung von EHT-Vaskularisierung heraus, da Kardiomyozyten im EHT größtenteils degenerieren und das Gewebe eher zersetzt als neovaskularisiert wird. Der Frage nach dem Beitrag des in EHTs präexistierenden Gefäßnetzes zur Neovaskularisierung implantierter EHTs ist zukünftig anhand allogener Transplantationen nachzugehen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Künstliche Herzmuskelgewebe (*Engineered Heart Tissue*; EHT) eignen sich zur Gewebeersatztherapie *in vivo*. Da in implantierten EHTs zuvor perfundierte Gefäße gefunden wurden, war das Ziel dieser Arbeit, den Prozess der Vaskularisation, insbesondere der Beitrag präexistierender Endothelzellen in EHTs, zu untersuchen. Das bebrütete Hühnerei mit seinem leicht zugänglichen Gefäßnetz ist als Modell zur Angiogeneseforschung gut etabliert. Dessen Anwendbarkeit auf EHTs sollte dafür erarbeitet werden. Bisher wurden EHTs auf Kollagen-Hydrogelbasis aus Primärkulturen neonataler Rattenkardiomyozyten hergestellt. Fibrin wird als Matrix von künstlich hergestellten Geweben vielfach eingesetzt und sollte hier als Alternative zu Kollagen als Hydrogel untersucht werden. Die Wirkung von dem als kardioprotektiv und angiogenetisch wirksamen bekannten Peptid Thymosin β_4 auf EHTs wurde untersucht.

Methoden: Zunächst wurden Kollagen und Fibrin hinsichtlich ihrer Eignung als Hydrogelmatrix für EHTs miteinander verglichen. Dabei wurden EHTs grundsätzlich aus primären neonatalen Rattenkardiomyozyten, Matrigel, serumhaltigem Kulturmedium und entweder mit 0,8 mg Kollagen/EHT oder 5 mg Fibrinogen/EHT generiert. Fibrin-EHTs wurden mit Thymosin β_4 (100 ng/ml Kulturmedium) von Entwicklungstag null bis zwölf behandelt. Die Anwendung des bebrüteten Hühnereis auf EHTs wurde etabliert. Von Tag acht bis zwölf der Hühnereientwicklung und Tag zwölf bis 16 der EHT-Entwicklung wurde das EHT auf der Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis inkubiert. Anschließende Strukturanalysen mittels Paraffin-Histologie und Immunfluoreszenzfärbungen der EHT-Explantate ergaben Aufschluss über die Entwicklungen während der Inkubation. Genexpressionsanalysen und Kontraktionskraftmessungen wurden durchgeführt, um die Qualität der drei verschiedenen nativen EHT-Gruppen (Kollagen, Fibrin und Fibrin supplementiert mit Thymosin β_4) untereinander sowie im Zustand vor und nach vier Tagen Kultur auf der CAM miteinander zu vergleichen.

Ergebnisse: Die maximale Kontraktionskraft von Fibrin-EHTs war doppelt so hoch wie die der Kollagen-EHTs. Thymosin β_4 steigerte die Kontraktionskraft um weitere 67%. Fibrin-EHTs zeichneten sich durch eine bessere Reproduzierbarkeit und Robustheit gegenüber Kollagen-EHTs aus. Die Entwicklung auf der Chorioallantoismembran war in allen EHT-Gruppen ähnlich. Die meisten EHTs litten

unter den Kulturbedingungen auf der Chorioallantoismembran, was sich morphologisch und in den Genexpressionsanalysen zeigte. In den Explantaten waren in etwa 30% der Präparate gar keine Reaktionen der Chorioallantoismembran auf das EHT zu finden. Etwa 20% der Präparate enthielten kleine Strukturveränderungen an der Schnittstelle zwischen Chorioallantoismembran und EHT, die möglicherweise beginnende angiogenetische Prozesse darstellten. Die restlichen 50% der Explantate enthielten weniger diskrete Invasionen in Form von in das EHT ziehenden Kolonnen bis hin zu EHT-Zersetzungen.

Schlussfolgerungen: Mit Fibrin als Hydrogelmatrix können EHTs generiert werden, die Kollagen-EHTs in Kontraktionskraft und Reproduzierbarkeit überlegen sind. Thymosin β_4 erhöht die Kontraktionskraft von Fibrin-EHTs, die genauen Wirkungen des Peptids auf die Kardiomyozyten in EHTs sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Die Chorioallantoismembran des bebrüteten Hühnereis eignet sich nicht zur Untersuchung der Neovaskularisation in EHTs, da EHTs auf der Chorioallantoismembran größtenteils atrophieren und großflächige Zersetzungen des Gewebes die häufigste Reaktion der Chorioallantoismembran-Zellen auf das EHT darstellte.

6 Abkürzungsverzeichniss

Abb.	Abbildung
<i>anti-red-blood-cell</i>	aRBC
Bp	Basenpaare
CAM	Chorioallantois-Membran
Cm	Centimeter
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i>
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
G	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
IMG	Intussusceptives Mikrovaskuläres Wachstum
mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mN	Millinewton (1 mN=100 g cm/s ² =100 Dyn)
ms	Millisekunden
n	Anzahl
N	Mol/l H ₂ O
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ - Ionenkonzentration
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
sec	Sekunden
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TT	<i>twitch tension</i> ; Kontraktionskraft
U	Unit (Enzymeinheit)
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w/v	<i>weight/volume</i>

7 Literaturverzeichnis

- Ahmed TA, Griffith M, Hincke M (2007) Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng* 13:1469-1477
- 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* 5:103-118
- Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1975) Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol* 79:597-618
- Badamchian M, Fagarasan MO, Danner RL, Suffredini AF, Damavandy H, Goldstein AL (2001) Thymosin beta(4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock. *Int Immunopharmacol* 3:1225-1233
- Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M, Banner NR, Khaghani A, Yacoub MH (2006) Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *N Engl J Med*. 355:1873-1884
- Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, Dimairo JM, Srivastava D (2004) Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432:466-472
- Borges J, Mueller MC, Padron NT, Tegtmeier F, Lang EM, Stark GB (2003a) Engineered adipose tissue supplied by functional microvessels. *Tissue Eng* 9:1263-1270
- Borges J, Tegtmeier FT, Padron NT, Mueller MC, Lang EM, Stark GB (2003b) Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. *Tissue Eng* 9:441-450
- Borges J, Tegtmeier FT, Torío-Padrón N, Mueller MC, Stark GB (2004) Angiogenesis investigations in tissue engineering. The cylinder model on the chorioallantois membrane. *Chirurg* 75:284-290
- Britland S, Morgan H, Wojcik-Stodart B, Riehle M, Curtis A, Wilkinson C (1996) Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells. *Exp Cell Res* 228:313-325
- Brown RA, Phillips JB (2007) Cell responses to biomimetic protein scaffolds used in tissue repair and engineering. *Int Rev Cytol* 262:75-150
- Bruckner BA, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Youker KA, Radovancevic B, Connelly JH, Koerner MM, Entman ME, Frazier OH, Noon GP, Torre-Amione G (2001) Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant*. 20:457-464
- 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* 277:433-444
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439
- 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* 64:580-589

- Choi K (1998) Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol* 76:947-956
- Claesson-Welsh L (2008) VEGF-B taken to our hearts: specific effect of VEGF-B in myocardial ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1575-1576.
- Dawes CM (1975) Acid-base relationships within the avian egg. *Biol Rev Camb Philos Soc* 50:351-371
- Djonov VG, Galli AB, Burri PH (2000) Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane. *Anat Embryol (Berl)* 202:347-357
- Djonov VG, Baum O, Burri PH (2003) Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 314:107-117
- Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, Tschanz SA, Martiny-Baron G, Schenk U, Wood J, Burri PH, Hubbell JA, Zisch AH (2004) Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth. *Circ Res* 94:1124-1132
- Ehrbar M, Rizzi SC, Hlushchuk R, Djonov VG, Zisch AH, Hubbell JA, Weber FE, Lutolf MP (2007) Enzymatic formation of modular cell-instructive fibrin analogs for tissue engineering. *Biomaterials* 28:3856-3866
- Engel CS (1895) Ist die progressive perniciöse Anämie als Rückschlag in die embryonale Blutentwicklung aufzufassen? *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 44: 237-248
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schäfer H, Bishopric N, Wakatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11:683-694
- Eschenhagen T, Didié M, Münzel F, Schubert P, Schneiderbanger K, Zimmermann WH (2002) 3D engineered heart tissue for replacement therapy. *Basic Res Cardiol* 97:146-152
- Eschenhagen T, Zimmermann WH (2005) Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 97:1220-1231
- Ferrara N (1996) Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 32A:2413-2422
- Fink C, Ergün S, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *FASEB J* 14:669-679.
- Frerich B, Lindemann N, Kurtz-Hoffmann J, Oertel K (2001) In vitro model of a vascular stroma for the engineering of vascularized tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30:414-420
- Fuchs A, Lindenbaum ES (1988) The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. *Acta Anat (Basel)* 131:271-275
- 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* 98:705-712
- Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK (2005) Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol Med* 11:421-429
- Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, Bikfalvi A (2005) Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1643-1648

- Hannappel E, Leibold W (1985) Biosynthesis rates and content of thymosin beta 4 in cell lines. *Arch Biochem Biophys* 240:236-241
- Hatzopoulos AK, Folkman J, Vasile E, Eiselen GK, Rosenberg RD (1998) Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125:1457-1468
- Heerdt PM, Holmes JW, Cai B, Barbone A, Madigan JD, Reiken S, Lee DL, Oz MC, Marks AR, Burkhoff D (2000) Chronic unloading by left ventricular assist device reverses contractile dysfunction and alters gene expression in end-stage heart failure. *Circulation* 102:2713-2719
- Heino J (2007) The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 29:1001-1010
- Huff T, Rosorius O, Otto AM, Müller CS, Ballweber E, Hannappel E, Mannherz HG (2004) Nuclear localisation of the G-actin sequestering peptide thymosin beta4. *J Cell Sci* 117:5333-5341
- Ivester CT, Tuxworth WJ, McDermott PJ (1995) Contraction accelerates myosin heavy chain synthesis rates in adult cardiocytes by an increase in the rate of translational initiation. *J Biol Chem* 270:21950-21957
- Karamysheva AF (2008) Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73:751-762
- Karpanen T, Bry M, Ollila HM, Seppänen-Laakso T, Liimatta E, Leskinen H, Kivelä R, Helkamaa T, Merentie M, Jeltsch M, Paavonen K, Andersson LC, Mervaala E, Hassinen IE, Ylä-Herttua S, Oresic M, Alitalo K (2008) Overexpression of vascular endothelial growth factor-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circ Res* 103:1018-1026
- Kelm JM, Djonov VG, Hoerstrup SP, Guenter CI, Ittner LM, Greve F, Hierlemann A, Sanchez-Bustamante CD, Perriard JC, Ehler E, Fussenegger M (2006) Tissue-transplant fusion and vascularization of myocardial microtissues and macro tissues implanted into chicken embryos and rats. *Tissue Eng* 12:2541-2553
- Kemper F (1963) Chick egg embryopathy. *Arzneimittelforschung* 13:191-194
- Ko HC, Milthorpe BK, McFarland CD (2007) Engineering thick tissues--the vascularisation problem. *Eur Cell Mater* 14:1-18
- 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* 124:63-69
- Kunzi-Rapp K, Rück A, Kaufmann R (1999) Characterization of the chick chorioallantoic membrane model as a short-term in vivo system for human skin. *Arch Dermatol Res* 291:290-295
- Leene W, Duyzings MJ, van Steeg C (1973) Lymphoid stem cell identification in the developing thymus and bursa of Fabricius of the chick. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 136:521-533
- Leor J, Aboulafia-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* 102:56-61
- Levenberg S, Rouwkema J, Macdonald M, Garfein ES, Kohane DS, Darland DC, Marini R, van Blitterswijk CA, Mulligan RC, D'Amore PA, Langer R (2005) Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nat Biotechnol* 23:879-884
- 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* 119:368-375

- Li X, Tjwa M, Van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart JM, Springer ML, von Degenfeld G, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L (2008) Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1614-1620
- Lin HI, Chu SJ, Perng WC, Wu CP, Lin ZY, Huang KL (2008) Hyperbaric oxygen attenuates cell growth in skin fibroblasts cultured in a high-glucose medium. *Wound Repair Regen* 16:513-519
- Lompré AM, Schwartz K, d'Albis A, Lacombe G, Van Thiem N, Swynghedauw B (1979) Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 282:105-107
- Maas JW, Le Noble FA, Dunselman GA, de Goeij AF, Struyker Boudier HA, Evers JL (1999) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to investigate the angiogenic properties of human endometrium. *Gynecol Obstet Invest* 48:108-112
- Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, Banaudha K, Maheshwari RK, Goldstein AL, Kleinman HK (1999) Thymosin b4 accelerates wound healing. *J. Invest. Dermatol* 113:364-368
- Matsuo T, Carabello BA, Nagatomo Y, Koide M Hamawaki, M, Zile MR, McDermott PJ (1998) Mechanisms of cardiac hypertrophy in canine volume overload. *Am J Physiol* 275:65-74
- Mattii L, Battolla B, D'Alessandro D, Trombi L, Pacini S, Cascone MG, Lazzeri L, Bernardini N, Dolfi A, Galimberti S, Petrini M (2008) Gelatin/PLLA sponge-like scaffolds allow proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Macromol Biosci* 9:819-826
- McCloskey KE, Stice SL, Nerem RM (2006) In vitro derivation and expansion of endothelial cells from embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 330:287-301
- Monici M (2005) Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol Annu Rev* 11:227-256
- Moon EY, Song JH, Yang KH (2007) Actin-sequestering protein, thymosin-beta-4 (TB4), inhibits caspase-3 activation in paclitaxel-induced tumor cell death. *Oncol Res* 16:507-516
- Naito H, Melnychenko I, Didié M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T, Zimmermann WH (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114:72-78
- Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD (2006) The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). *Pulm Pharmacol Ther* 19:61-69
- Nguyen LL, D'Amore PA (2001) Cellular interactions in vascular growth and differentiation. *Int Rev Cytol* 204:1-48
- Nomi M, Atala A, Coppi PD, Soker S (2002) Principals of neovascularization for tissue engineering. *Mol Aspects Med* 23:463-483
- Norrby K (2006) In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med* 10:588-612
- Numaguchi Y, Sone T, Okumura K, Ishii M, Morita Y, Kubota R, Yokouchi K, Imai H, Harada M, Osanai H, Kondo T, Murohara T (2006) The impact of the capability of circulating progenitor cell to differentiate on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Circulation* 114:114-119
- Ogletree-Hughes ML, Stull LB, Sweet WE, Smedira NG, McCarthy PM, Moravec CS (2001) Mechanical unloading restores beta-adrenergic responsiveness and reverses receptor downregulation in the failing human heart. *Circulation* 104:881-886

- Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhäger R, McCarthy JE, Weich HA, Christ B, Alitalo K, Wiltling J (1997) VEGF and VEGF-C: Specific Induction of Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Differentiated Avian Chorioallantoic Membrane. *Dev Biol* 188:96-109
- Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR (2002) Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 71:755-781
- Patten BM (1953) Embryological stages in the establishing of myeloschisis with spina bifida. *Am J Anat.* 93:365-395
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M (2005) Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:159-178
- Ribatti D, Vacca A, Roncali L, Dammacco F (1996) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol* 40:1189-1197
- Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M (2006) The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc* 1:85-91
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-497
- Schauinsland H (1903) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Wirbeltiere. Stuttgart: Nägele
- 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
- Shimizu T, Sekine H, Isoi Y, Yamato M, Kikuchi A, Okano T (2006) Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts by the layering of cardiomyocyte sheets. *Tissue Eng* 12:499–507
- Sieminski AL, Hebbel RP, Gooch KJ (2004) The relative magnitudes of endothelial force generation and matrix stiffness modulate capillary morphogenesis in vitro. *Exp Cell Res* 297:574-584
- Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR, Riley PR (2007a) Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445:177-182
- Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR (2007b) Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis* 10:229-241
- Sosne G, Szliter EA, Barrett R, Kernacki KA, Kleinman H, Hazlett LD (2001) Thymosin b4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo. *Exp. Eye Res* 72:605–608
- Sosne G, Siddiqi A, Kurpakus-Wheater M (2004) Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1095-1100
- Stevenson LW, Miller LW, Desvigne-Nickens P, Ascheim DD, Parides MK, Renlund DG, Oren RM, Krueger SK, Costanzo MR, Wann LS, Levitan RG, Mancini D, Investigators REMATCH (2004) Left ventricular assist device as destination for patients undergoing intravenous inotropic therapy: a subset analysis from REMATCH (Randomized Evaluation of Mechanical Assistance in Treatment of Chronic Heart Failure). *Circulation* 110:975-981
- Terracciano CM, Harding SE, Adamson D, Koban M, Tansley P, Birks EJ, Barton PJ, Yacoub MH (2003) Changes in sarcolemmal Ca entry and sarcoplasmic reticulum Ca content in ventricular myocytes from patients with end-stage heart

- failure following myocardial recovery after combined pharmacological and ventricular assist device therapy. *Eur Heart J* 24:1329-1339
- Thompson WD, Campbell R, Evans T (1985) Fibrin degradation and angiogenesis: quantitative analysis of the angiogenic response in the chick chorioallantoic membrane. *J Pathol* 145:27-37
- Thurston G (2003) Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res* 314:61-68
- Torio-Padron N, Borges J, Momeni A, Mueller MC, Tegtmeier FT, Stark GB (2005) Implantation of VEGF transfected preadipocytes improves vascularization of fibrin implants on the cylinder chorioallantoic membrane (CAM) model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1643-1648.
- van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 936:426-437
- Wilting J, Christ B, Bokeloh M, Weich HA (1993) In vivo effects of vascular endothelial growth factor on the chicken chorioallantoic membrane. *Cell Tissue Res* 274:163-172
- Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TE, Masuda Y, Sutherland FW, Schoen FJ, Mayer JE Jr, Bischoff J (2004) Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:480-487
- Ye Q, Zünd G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA, Turina M (2000) Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg* 17:587-591
- Young JD, Lawrence AJ, MacLean AG, Leung BP, McInnes IB, Canas B, Pappin DJ, RD Stevenson (1999) Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids. *Nat Med* 5:1424-1427
- Zachara NE (2009) Detection and Analysis of (O-linked beta-N-Acetylglucosamine)-Modified Proteins. *Methods Mol Biol* 464:227-254
- 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* 68:106-114
- Zimmermann WH, Didié M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M, Eschenhagen T (2002a) Cardiac Grafting of Engineered Heart Tissue in Syngenic Rats. *Circulation* 106:151-157
- Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Münzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002b) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90:223-230
- Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didié M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12:452-458
- Zisch AH, Lutolf MP, Ehrbar M, Raeber GP, Rizzi SC, Davies N, Schmökel H, Bezuidenhout D, Djonov VG, Zilla P, Hubbell JA (2003) Cell-demanded release of VEGF from synthetic, biointeractive cell ingrowth matrices for vascularized tissue growth. *Faseb J* 17:2260–2262

8 Anhang

8.1 Substanzen

Agarose	Invitrogen, Deutschland
Anilin zur Synthese (C ₆ H ₇ N)	Merck, Deutschland
Anilinblau, wasserlöslich C.I.: 42755	Merck, Deutschland
Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistologie	s. Tab. 4
Aprotinin aus der bovinen Lunge Produktnummer: A1153	Sigma Chemical Co., USA
Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	Pharmacia & Upjohn GmbH, Deutschland
Ascorbinsäure	Merck, Deutschland
Azokarmin G, C.I.: 50085	Merck, Deutschland
Betaisodona Lösung	Mundipharma GmbH, Deutschland
<i>BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix</i>	Becton, Dickinson and Company, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Chemical Co., USA
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	Sigma Chemical Co., USA
Betaisodona-Lösung	
Calciumchlorid (CaCl ₂ • 2 (H ₂ O)), (MG 147,02 g/mol)	Carl Roth, Deutschland
Carbogengas (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde AG, Deutschland
<i>Chick embryo extract</i> , Hühnerembryonenextrakt, CEE	eigene Herstellung
Citronensäure (zur Reinigung der Organbäder)	JT Baker, Niederlande
Deoxyribonuklease (DNase) II, Typ V	Sigma Chemical Co., USA
Diethylpyrocarbonat	Merck, Deutschland
Difco™ Trypsin 1:250	Becton, Dickinson and Company, USA
DMEM (Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium) (D-Glucose 1 g/l 3,7 g/l NaHCO ₃) F0415	Biochrom, Deutschland
DNA ladder, 100 bp	NEB, USA
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Pulver (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃)	Invitrogen, Deutschland
Eosin G, gelblich C.I.: 45380	Merck, Deutschland
Erythrosin B, C.I.: 45430	Merck, Deutschland
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth, Deutschland
Ethanol	Apotheke Roth, Deutschland
Ethanol 99%, vergällt mit 1% Methylethylketon	Walter-CMP, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung, wässrig, 1%	Fluka, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA; Titriplex® III)	Merck, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS), 0,1 µm steril filtriert	Gibco, Deutschland
Humanes rekombinantes FGF-2	RD Systems, USA
Fibrinogen aus bovinem Plasma Prduktnummer: F4753	Sigma Chemical Co., USA
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde Gas, Deutschland

Formalin Solution Roti Histofix 4%	Carl Roth, Deutschland
Gelatine Schwamm	Johnson Johnson, Deutschland
D(+)-Glucose-Monohydrat, (MG 198,17 g/mol)	Merck, Deutschland
Glycerol	Sigma Chemical Co, USA
Goldorange G, C.I.Nummer: 16230	Merck, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Deutschland
[2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethansulfonsäure] (HEPES)	Sigma Chemical Co., USA
Histol	Roth, Deutschland
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck, Deutschland
Immersionöl, Immersol™ 518 N	Carl Zeiss, Deutschland
Isopropranolol	Merck, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl), (MG 74,56 g/mol)	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Deutschland
Kohlendioxid (CO ₂)	Linde Gas, Deutschland
Loading dye, 6x	Fermentas, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Deutschland
Minimum Essential Medium-Earle (MEM-Earle) Flüssig (1 g/l D-Glucose, 2,2 g/l NaHCO ₃ , ohne Glutamin)	GIBCO-BRL, Deutschland
Mowiol 4-88	Calbiochem, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (0,01M) pH 7,4	Sigma Chemical Co., USA
Penicillin/Streptomycin (100x; P/S)	Gibco-BRL, Deutschland
Pferdeserum	Gibco-BRL, Deutschland
Phosphate Buffered Saline ohne Calciumchlorid und ohne Magnesiumchlorid (PBS; -CaCl ₂ , -MgCl ₂), pH 7,4, 10x	Invitrogen, Deutschland
Phosphorwolframsäure (H ₃ [P(W ₃ O ₁₀) ₄])	Merck, Deutschland
Proteinase K	Quiagen, USA
Thrombin aus bovinem Plasma, Produktnummer: T7513	Sigma Chemical Co., USA
Thymosin β ₄ (ab62087)	Abcam, Vereinigtes Königreich
Tissue freezing medium (Tissue Tec®)	Leica, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminmethan (Tris Base, Trizma®Base)	Merck, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris HCl)	Promega, USA
Triton-X 100	Fluka, Deutschland
Trypanbau Lösung	Sigma Chemical Co., USA

Trypsin, Difco 250	BD, USA
Ziegenserum	GIBCO-BRL, Deutschland

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

8.2 Lösungen und Puffer

Anilinalkohol: 96% Ethanol 100 ml
Anilinöl 0,1 ml

Anilinblau-Orange Essigsäure: G- wasserlösliches 0,5 g
Anilinblau 2 g
Orange G 100 ml
Aqua dest. 8 ml
Eisessig

Die Lösung kochen und nach dem Abkühlen durch ein weichen Filter filtrieren.

Antikörper-Lösung: BSA 1%
Triton X 100 0,5%
NaN₃ Spatelspitze
in TBS 0,05 mol/l, pH 7,45

Azokarmin: Azokarmin G 0,1 g
Aqua dest. 100 ml
Eisessig 1 ml

Azokarminlösung aufkochen lassen und nach dem Ankühlen durch ein weichen Filter filtrieren. Danach Eisessig hinzufügen.

Block-Lösung: Ziegenserum 10%
BSA 1%
Triton X 100 0,5%
NaN₃ Spatelspitze
in TBS 0,05 mol/l, pH 7,45

CaCl₂-Stammlösung 2,25 M: CaCl₂ • 2 (H₂O) 165,57 g
Aqua bidest. ad 500 ml

CBFHH: KCl 5,36 mM
MgSO₄ • 7 (H₂O) 70,81 mM
Glucose 5,55 mM
KH₂PO₄ 0,44 mM
Na₂HPO₄ • (H₂O) 70,34 mM
HEPES 20 mM
NaCl 136,9 mM
in Aqua ad iniectabilia

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 wurde die Lösung durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert. Zur Herstellung wurden Stammlösungen benutzt, die mit Aqua ad iniectabilia angesetzt und autoklaviert wurden. Die Glucose und HEPES-Stämme, die nicht autoklavierbar sind, wurden durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert. Stammlösungen und CBFHH wurden bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert

Diethylpyrocarbonat-Wasser 0,1%(DEPC-H₂O):	Diethylpyrocarbonat Aqua ad iniectabilia	1 ml ad 1000 ml
--	---	--------------------

Das DEPC wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren gelöst und anschließend autoklaviert.

10x DMEM:	10x DMEM Pulver Aqua ad iniectabilia	665 mg 5 ml
------------------	---	----------------

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert.

DNase-Arbeitslösung:	FKS-R (aktiv) DNase-Stammlösung P/S P/S CBFHH	1,7 ml 0,6 ml 0,5 ml ad 50 ml
-----------------------------	---	--

Die Lösung wurde an jedem Zellpräparationstag frisch hergestellt (unter sterilen Bedingungen) und auf Eis gelagert.

DNase-Stammlösung:	DNase (806 U/mg) PBS (-Ca ²⁺ , -Mg ²⁺)	100 mg 50 ml
---------------------------	--	-----------------

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

2x EHT Medium:	10x DMEM Pferdeserum (inaktiviert) Hühnerembryonenextra kt P/S	1,0 ml 1,0 ml -> 20% (V/V) 0,2 ml -> 4% (V/V) 0,1 ml -> 2% (V/V) ad 5 ml
-----------------------	---	---

Aqua ad iniectabilia

Vor Herstellung der EHTs frisch angesetzt.

EHT-Medium: Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
(DMEM D-Glucose 1 g/l 3,7 g/l NaHCO₃)
10% (v/v) Pferdeserum (inaktiviert)
2% (v/v) Hühnerembryonenextrakt
1% (v/v) P/S

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt und dann bei 4°C gelagert.

Eosin-Lösung 0,1%:	Eosin	0,5 g
	Aqua dest.	ad 500 ml

dunkel lagern

Essigsaurer Alkohol:	Eisessig	1 ml
	96% Alkohol	100 ml

Ethanol 70% (v/v) zur Desinfektion:	Ethanol 99% vergällt mit	70 ml
	1% Methylethylketon	ad 100 ml
	Aqua bidest.	

FKS (inaktiviert):

1 h im Wasserbad bei 56°C bei mehrmaligem Schwenken inaktiviert und dann bei 4°C gelagert.

Glucose 0,55 M:	Glucose, wasserfrei	100 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und dann bei 4°C gelagert

HEPES 0,2 M:	HEPES	47,66 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und dann bei 4°C gelagert.

KM-Medium: Minimum Essential Medium
(MEM-Earle; 2,2 g/l NaHCO₃)
FKS (inaktiviert) 10% (v/v)
P/S 1% (v/v)
BrdU 1% (v/v) (10 mM)

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt und dann bei 4°C gelagert

MgCl₂-Stammlösung 1,05 M:	MgCl ₂ • 6 (H ₂ O)	106,83 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Mowiol:	Glycerol	6,0 g
	Mowiol 4-88	2,4 g
	Aqua ad iniectabilia	6 ml

Tris-HCl 0,2 mol/l, pH 12 ml
8,5

Mowiol in Glycerol und Wasser durch mehrstündiges Rühren gelöst, anschließend Zugabe von Tris-HCl und Inkubation bei 53°C im Schüttelinkubator bis zur Lösung des Mowiols. Dann Zentrifugation für 20 min bei 5000 g zur Abtrennung ungelöster Partikel, Lagerung bei -20°C.

NKM: Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
(DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃)
10% (v/v) FKS-R (inaktiviert)
1% (v/v) P/S
1% (v/v) L-Glutamin

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt und dann bei 4°C gelagert

Pferdeserum, inaktiv

Aktives Pferdeserum wurde bei mehrmaligem Umschwenken 1 h im Wasserbad auf 56 °C erhitzt. Nach Aliquotierung unter sterilen Bedingungen Lagerung bei -20 °C.

Phosphate Buffered Saline (- CaCl₂, -MgCl₂) 0,01 M: PBS (-CaCl₂, -MgCl₂), 100 ml
10x ad 1000 ml
Aqua ad iniectabilia

Die Lösung wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

5% Phosphorwolframsäure: Phosphorwolframsäure 5 g
Aqua dest 100 ml

Stamm I für Tyrode-Lösung: NaCl 175 g
(0,2 mM Ca²⁺) KCl 10 g
CaCl₂-Stamm 2,22 ml
25 ml
MgCl₂-Stamm ad 1000 ml
Aqua bidest.

Lagerung bei 4°C.

Stamm II für Tyrode-Lösung: NaHCO₃ 50 g
Aqua bidest. ad 1000 ml

Lagerung bei 4°C.

Stamm III für Tyrode-Lösung: NaH₂PO₄ (H₂O) 5,8 g
Aqua bidest. ad 1000 ml

Lagerung bei 4°C.

TAE 50x (2 M): Tris base 242 g
Essigsäure 57,1 ml
EDTA (0,5 M) pH 8,0 100 ml
Aqua bidest. ad 1000 ml

TBS 0,05 M: Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt.	Tris-Cl (1 M) NaCl Aqua bidest.	25 ml (0,05 M) 4,5 g (0,9% m/V) ad 500 ml
Tris HCl (0,2 M): Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt.	Tris Base Aqua bidest.	2,42 g ad 100 ml
Trypsin-Arbeitslösung:	Trypsin-Stammlösung DNase-Stammlösung P/S CBFHH	1,3 ml 0,6 ml 0,5 ml ad 50 ml

Die Lösung wurde an jedem Zellpräparationstag frisch hergestellt (unter sterilen Bedingungen) und auf Eis gelagert.

Trypsin-Stammlösung (100 mg/ml):	Trypsin CBFHH	700 mg 7 ml
---	------------------	----------------

Das Trypsin wurde bei 4 °C mindestens 12 h rotierend gelöst und vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Herstellung der modifizierten Tyrode-Lösung:	Stamm I Stamm II Stamm III Glucose Na ₂ EDTA Ascorbinsäure Aqua bidest.	40 ml 38 ml 10 ml 1000 mg 18,6 mg 50 mg ad 1000 ml
---	--	--

8.3 Hilfsmittel und Geräte

ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, USA
Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories, USA
Analysenwaage, Modell Genius	Sartorius, Deutschland
Autoklav	Wesarg, Medizintechnik, Deutschland
Brutschränke mit CO ₂ -Zufuhr (Zellkultur), Modell Hera Cell 240	Heraeus, Deutschland
Bio Imaging Systems (Chemi Genius2)	Syngene, Vereinigtes Königreich
Centrifuge/Vortex Combi-spin FVL-2400N	Peqlab, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm und Ø 13 mm	Marienfeld, Deutschland
Digital-pH-Meter	Knick, Deutschland
Digitalwaage, Modell Ohaus Precision Advanced	Ohaus, USA
Einbettungsgefäße	Polyscience, USA
Einwegspritzen, Injekt 2 ml, 10 ml, 20 ml	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Eismaschine, Modell Scotsman AF-10	Scotsman Ice Systems, USA

Elektrischer Stimulator, Modell ST.8.2	Ingenieurbüro G. Jäckel, Deutschland
Faltenfilter Ø 240 mm	Schleicher & Schuell, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera	Carl Zeiss, Deutschland
Folie zur Abdeckung des Hühnereiinkubators	Bastelbedarf
Gefriertisch EG1150C	Leica, Deutschland
Glasgefäße	Schott, Deutschland
Glasschalen	Roth, Deutschland
Heißblock, EG1120	Leica, Deutschland
Heißschrank	
Heizplatte, FMI EHE-3501	Föhr Medical Instruments GmbH, Deutschland
Hühnereiinkubator	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Instrumentenschale mit Deckel	Roth, Deutschland
Kippwippe, Modell SM	Sarstedt, Deutschland
Konfokales <i>Laser Scanning</i> Mikroskop, LSM 510 Meta auf Axiovert 100	Carl Zeiss, Deutschland
Kraftaufnehmer	Ingenieurbüro G. Jäckel Hanau, Deutschland
Kryotom CM 3050S	Leica, Deutschland
Kühlschrank +4 bis +8 °C, Modell <i>profiline</i>	Liebherr, Deutschland
Kühltruhe -20 °C, Modell <i>Economy</i>	Liebherr, Deutschland
Kühltruhe -80 °C	Kryotec, Deutschland
Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200	Beckman Instruments Inc., USA
Kulturschalen	Nunc, Deutschland
Kunststoffschläuche	Roth, Deutschland
Kupferwannen	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Kurzzeitmesser, mechanisch	Roth Deutschland
Laserdruck (schwarz-weiß), Modell <i>HP LaserJet 4300 PCL 6</i>	Hewlett-Packard (USA)
Luftpumpe	KNF Neuberger, Deutschland
Magnetrührer, Modell <i>COMBIMAG RET</i>	Janke & Kunkel, Deutschland
Metallgitter	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Metallhaken	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Mikroskop für Phasenkontrastaufnahmen	Carl Zeiss, Deutschland

mit Kamera, Modell <i>Axioplan</i>	
Mikroskop, Labovert	Leitz, Deutschland
Mikrotom, RM 2125RT	Leica, Deutschland
Mikrowelle	SHARP, Deutschland
Multiply® PCR-Einzelgefäße 0,2 ml	Sarstedt, Deutschland
Nanodrop	Thermo scientific, USA
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG "Assistent", Deutschland
Objektträger	Marienfeld, Deutschland
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Deutschland
Objektträgerkasten	Roth, Deutschland
Organbäder	Glasbläserei Brunswieg, Hamburg, Deutschland
Parafilm	American National, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH, Deutschland
PCR-Gerät <i>GeneAmp® PCR System 9700</i>	Applied Biosystems, USA
96 und 384 <i>Well Multiply®</i> -PCR-Platten	Sarstedt, Deutschland
Phasische Dehnapparatur	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
pH-Meter	Knick GmbH, Deutschland
Pipetten (serologisch), 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Deutschland
Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl	Sarstedt, Deutschland
Pipetten, 10 ml , <i>wide tip with plug</i>	Becton Dickinson Labware, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Pipettierhilfen, Modell <i>accu-jet® pro</i>	BRAND, Deutschland
Plastikreagiergefäße (0,5, 1,5 und 2 ml)	Sarstedt, Deutschland
Plexiglasbox	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Polytron® Stativ-Dispergiergerät	Kinematica, Schweiz
Präparationsbesteck	Hammacher Instrumente, Deutschland
Präparationsbesteck	Hammacher, Deutschland
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße, konisch	Falcon, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Roth, Deutschland
Reizelektroden	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Rotationsmikrotom, Leica RM 2125 RT	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland
Schüttelrad	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische

	Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Silikondocht	Roth, Deutschland
Skalpells, sterile Skalpellschneide	Bayha, Deutschland
Stereomikroskop SV6 mit KL 1500 LCD Kaltlichtquelle	Carl Zeiss, 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
Teflonscheiben	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Teflonzylinder	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Thermomixer	Eppendorf, Deutschland
Ultrazentrifuge Centricon T-2170	Kontron Instruments, Deutschland
Ultrazentrifuge, Modell <i>Optima L-90K</i> mit Rotor <i>SW40 Ti</i>	Beckman Coulter, Deutschland
VA-Drähte	Small parts, Inc., USA
Vibratom VT 1000S	Leica, Deutschland
Vortex Typ REAX 1	Heidolph, Deutschland
Vortex, Typ <i>Reax 200</i>	Heidolph, Deutschland
Waage, OHAUS GT410	Florham Peak, USA
Waage, PM 480 Delta Range	Mettler Instruments, Deutschland
Wärmeschrank (zur Anwärmung von Zellkulturmedien usw.)	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Wasserbad	GfL m.b.H., Deutschland
Wasserbad	Medax Nagel GmbH, Deutschland
Wasserbad, Modell <i>C20 CS</i> , für die Kontraktionsexperimente	Lauda, Deutschland
Zellkulturschalen, Cell+ Qualität (Ø 3,5 cm, 6 cm, 10 cm, 15 cm)	Sarstedt, Deutschland
Zellsieb (100 µm), Nylon	BD Falcon, USA
Zentrifuge, Modell <i>5810 R</i>	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge, Modell <i>EBA 12 R</i>	Hettich, Deutschland
Zentrifuge, Modell <i>Rotana/RP</i>	Hettich, Deutschland
Zentrifuge, Modell <i>Universal 30 RT</i>	Hettich, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 250 ml	Becton, Dickinson and Company, Deutschland
Zentrifugierröhrchen 15 ml, 50 ml,	Sarstedt, Deutschland

9 Danksagung

Für die Vergabe des Themas, die damit verbundene Aufnahme in die Arbeitsgruppe der Experimentellen Pharmakologie, die inhaltlichen sowie materiellen Voraussetzung dieser Doktorarbeit und die konstruktiv kritische Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen. Insbesondere danke ich für die Unterstützung der Reise zum Kongress *Heart Failure 2009*.

Mein besonderer, mit diesen Worten nicht annähernd ausreichend beschriebener Dank gilt Dr. Arne Hansen für die vielen experimentellen Ideen, den roten Faden und die ständigen Ermutigungen mit denen er mich während der Fertigstellung dieser Arbeit fortwährend motiviert hat.

Alexandra Eder danke ich vor allem für den „Fibrin-Aufschwung“. Aber auch für tatkräftige Unterstützung, pragmatisches Denken und viel „know-how“ in der täglichen Laborarbeit, die ich als Medizindoktorandin sehr zu schätzen wusste und weiß.

Marianne Flato danke ich für die Anleitung der Zellpräparation, die vielen EHTs und ebenso die Unterstützung in der täglichen Laborarbeit.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern und Mitdoktoranden in der Pharmakologie für viel methodische Unterstützung, die Weitergabe ihrer Erfahrung in vielen Anwendungen sowie die herzliche Stimmung die stets in diesem Labor herrscht. Dieser Dank gilt insbesondere Dr. med. Thomas Rau.

Insbesondere Bülent Aksehirlioglu danke ich für die Bereitstellung der vielen „Eigenanfertigungen“.

Meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung während der Arbeit, sowie emotionalen Halt in kritischen Phasen. Letzterer Dank gilt insbesondere auch Martin, der mir stets mit weisem Rat beiseite stand. Weiterhin danke ich meinem Vater, Dr. med. Alfred Bönstrup für die Hilfe bei der Korrektur.

Meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Freund Martin und allen anderen Freunden danke ich für die schöne Zeit außerhalb des Labors ohne die die Aufrechterhaltung stabiler Nerven während der experimentellen Phase nicht möglich gewesen wäre.

10 Lebenslauf

Name: Marlene Bönstrup

Geboren am: 29.11.1985

Geburtsort: Hamburg

Eltern: Dr. Alfred Bönstrup
Irene Negendank-Bönstrup

Schule: Peter-Petersen-Grundschule 1992-1996

	Peter-Petersen-Gesamtschule	1996-2001
	Mill Hill School, England	2001-2002
	Gymnasium-Grootmoor	2002-2004
Studium:	Humanmedizin, Universität Hamburg	seit 2004
	Physikum	2006
	Staatsexamen	2010

11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift: