

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

(Direktor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen)

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Künstliche Herzgewebe aus humanen embryonalen Stammzellen als
Testsystem für Arzneistoffe**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

Vorgelegt im Department Chemie der Fakultät für

Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

der Universität Hamburg

von

Sebastian Schaaf

Hamburg, Juli 2011

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Tag der Disputation: 14. Oktober 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Humane Embryonale Stammzellen (hESC)	1
1.2	Charakterisierung von hESC	3
1.2.1	Pluripotenz und deren Nachweis	4
1.2.2	Molekulare Grundlagen der Pluripotenz	5
1.3	Herz	8
1.4	Herzrhythmusstörungen	11
1.4.1	LQT-Syndrom	13
1.4.2	Arrhythmien durch Arzneimittel	15
1.5	Regenerative Medizin	17
1.6	Engineered Heart Tissue – Künstliche Herzgewebe	20
1.7	Parameter der automatisierten Messung	23
1.7.1	Frequenz	23
1.7.2	Kraft	24
1.7.3	T1 (Kontraktionszeit)	24
1.7.4	T2 (Relaxationszeit)	24
1.7.5	CV (Kontraktionsgeschwindigkeit)	24
1.7.6	RV (Relaxationsgeschwindigkeit)	24
1.7.7	CV/RV	24
1.8	Embryoidkörperchen (EBs)	25
1.9	Kardiomyozyten aus Stammzellen	25
1.10	Y-27632	27
1.11	Charakterisierung der getesteten Substanzen	28
1.11.1	Chinidin	28
1.11.2	Sertindol	28
1.11.3	Cisaprid	29
1.11.4	Procainamid	29
1.11.5	E-4031	29
1.11.6	Thioridazin	29
1.11.7	Dofetilid	30
1.11.8	Ibutilid	30
1.11.9	Amiodaron	30
1.11.10	Verapamil	31
1.11.11	Ampicillin	31
1.12	Ziel der Arbeit	32

2	Material und Methoden	33
2.1	Humane embryonale Stammzellen	33
2.2	Zellkultur Stammzellen	33
2.2.1	Konditioniertes Medium (CM)	34
2.3	Embryoidkörperchen (EBs)	34
2.4	Differenzierung von hESC in Kardiomyozyten	35
2.5	RNA Präparation und Quantitative Real-Time PCR	35
2.6	Sequenzierung von PCR-Produkten	36
2.7	Immunfluoreszenz	36
2.7.1	Zellkultur	36
2.7.2	EHTs	36
2.8	Histologie	37
2.9	Dissoziation der EBs	37
2.10	Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	37
2.11	Engineered Heart Tissue (EHT)	38
2.12	Elektrophysiologie	39
2.13	Automatisierte Messung	40
2.14	Calcium-Konzentrationswirkungskurve	41
2.15	Sympathische und Parasympathische Stimulation	41
2.16	Messungen von Substanzen	41
2.17	Elektrische Stimulation	42
2.18	Auswertung der Schlagmuster	42
2.18.1	Auswertung nach irregulären Ereignissen	42
2.18.2	Analyse der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen	42
2.19	Statistik	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Etablierung der Zellkultur von humanen embryonalen Stammzellen	44
3.2	Herstellung von Embryoidkörperchen	45
3.3	Differenzierung in Kardiomyozyten	48
3.4	Genexpression während der Differenzierung	52
3.5	Exkurs: Expression von Troponin in hESC	54
3.6	Analyse der differenzierten EBs: FACS	55
3.7	Analyse der differenzierten EBs: Immunfluoreszenz	58
3.8	Künstliche Herzgewebe aus humanen embryonalen Stammzellen	59
3.9	Analyse der EHTs: Hämatoxylin-Eosin-Färbung	60
3.10	Analyse der EHTs: Immunfluoreszenz	60
3.11	Genexpression in EHTs und EBs	62
3.12	Elektrophysiologie	64

3.13	Funktionelle Analyse der EHTs	66
3.13.1	Messungen der Kontraktilität	66
3.13.2	Calcium-Konzentrationswirkungskurve	66
3.13.3	Reaktion auf sympathische und parasymphatische Stimulation	68
3.13.4	Negative Inotropie – Effekt von Verapamil	69
3.13.5	Verhältnis von Kraft und Frequenz	70
3.13.6	Stabilität der EHTs über den Messzeitraum	71
3.14	Einfluss von Substanzen mit arrhythmogenem Potential	73
3.14.1	Auswertung der gemessenen Parameter	73
3.14.2	Auswertung nach irregulären Ereignissen	85
3.14.3	Analyse der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen	87
4	Diskussion	100
4.1	Zellkultur von Stammzellen	100
4.2	Embryoidkörperchen und Differenzierung	102
4.3	Exkurs: Expression von Troponin in hESC	105
4.4	EHTs	106
4.4.1	Reifung	108
4.5	Parameter der automatisierten Messung	110
4.5.1	Einfluss der Substanzen	114
4.6	Auswertung nach irregulären Ereignissen	116
4.6.1	Einfluss der Substanzen	118
4.7	Analyse der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen	119
4.7.1	Einfluss der Substanzen	119
4.8	Gemeinsame Auswertung	120
4.8.1	Substanzen	120
4.8.2	Fazit	123
4.8.3	Vergleich mit bisherigen Systemen	125
4.9	Engpässe bei der Anwendung	126
4.10	Flussdiagramm	127
4.11	Ausblick	128
5	Zusammenfassung	131
6	Summary	133
7	Literatur	135
8	Anlage	142
8.1	Abkürzungen	142
8.2	Zusätzliche Informationen	143

8.2.1	Rohdaten zur Messung von E-4031	143
8.2.2	Messung der kontraktilen Calcium-Antwort bei vorgegebener Frequenz	143
8.2.3	Sympathische und Parasympathische Stimulation bei vorgegebener Frequenz	144
8.3	Material und Methoden	147
8.3.1	Medien für die Zellkultur	147
8.3.2	Lösungen	148
8.3.3	Hilfsmittel und Geräte	149
8.3.4	Immunfluoreszenz/ FACS	149
8.3.5	Proteine	150
8.3.6	Zellkultur	150
8.3.7	Substanzen	150
8.3.8	Zusätzliche Methoden	151
8.3.9	Primer	153
8.4	Sicherheitsinformationen	154
8.4.1	H-Sätze	155
8.4.2	P-Sätze	156
9	Veröffentlichungen	159
10	Danksagung	162

1 Einleitung

1.1 Humane Embryonale Stammzellen (hESC)

Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die nicht vollständig ausdifferenziert sind und sich theoretisch unbegrenzt teilen können. Sie sind das Ausgangsmaterial für die embryonale Entwicklung und für alle regenerationsfähigen Organe im adulten Organismus, wie zum Beispiel Haut, Haare oder Schleimhäute. Man unterscheidet unipotente, multipotente, pluripotente und totipotente Stammzellen, außerdem embryonale und adulte Stammzellen.

Unipotente Stammzellen kommen im adulten Organismus vor, sie können sich in nur einen für die jeweilige Stammzelle spezifischen Zelltyp differenzieren. Beispiele dafür sind die Stammzellen der Keratinozyten in der Haut, mit deren Hilfe die Haut sich ständig selbst erneuert, oder die spermatogonialen Stammzellen, aus denen Spermien entstehen.

Multipotente Stammzellen kommen ebenso im adulten Organismus vor. Wie der Name bereits suggeriert, kann sich dieser Zelltyp in mehr als einen anderen Zelltyp differenzieren. Prominentes Beispiel sind die CD-34-positiven Stammzellen im Knochenmark, welche als Reservoir sowohl für die myeloische als auch für die lymphatische Linie der Hämatopoese dienen. Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten gehen also aus derselben Zellpopulation hervor.

Totipotente Zellen sind Zellen, aus denen ein kompletter, lebensfähiger Organismus hervorgehen kann. Bei Säugetieren trifft dies nur auf die Zygote und auf die Zellen des Embryos im 2- oder 4-Zell-Stadium zu. Für andere Organismen stellen totipotente Zellen einen regulären Weg der Vermehrung dar, beispielsweise können aus den Sporen von Pilzen wieder ganze Pilze heranwachsen. Pluripotente Stammzellen sind, ebenso wie totipotente Zellen, in der Lage, sich in alle drei Keimblätter (Endo-, Meso- und Ektoderm) und damit in jede Zelle des Körpers zu differenzieren. Der Unterschied zwischen totipotenten und pluripotenten Zellen von Säugetieren besteht in der Fähigkeit, extraembryonales Gewebe in der Placenta zu bilden, welches für den Embryo die Voraussetzung für die weitere Entwicklung ist, da es unter anderem die Nährstoffversorgung übernimmt.

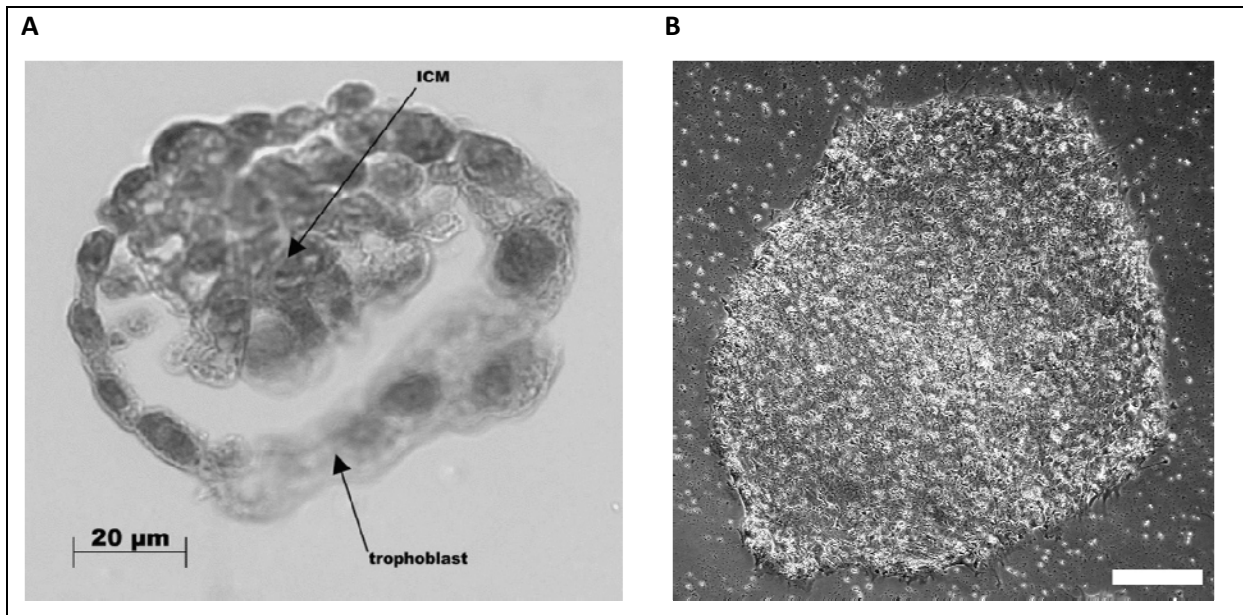


Abbildung 1: (A) Muriner Embryo im Blastozysten-Stadium, ICM: innere Zellmasse (Koestenbauer et al. 2006), (B) Kolonie von undifferenzierten hESC, Maßstab 200 µm.

Pluripotente Zellen findet man in humanen Embryonen nur bis zum Blastozysten-Stadium, also vor der Gastrulation (Abbildung 1). Im adulten Menschen konnten bisher keine pluripotenten Zellen nachgewiesen werden. Zelllinien von humanen embryonalen Stammzellen (hESC) werden aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen (Thomson et al. 1998; Reubinoff et al. 2000). Der pluripotente Status dieser Zellen wird *in vitro* künstlich aufrecht erhalten, so dass es kein echtes Korrelat *in vivo* gibt, abgesehen von den wenigen Zellen der inneren Zellmasse. HESC wachsen in Petrischalen und können *in vitro* über viele Passagen expandiert werden. Die für die Herstellung benötigten Embryonen werden aus dem Überschuss rekrutiert, der bei einer künstlichen Befruchtung entsteht und von den Paaren gespendet wird. Da der Embryo zerstört werden muss, um die innere Zellmasse in Kultur zu nehmen, und dabei ein potentiell lebensfähiges menschliches Wesen vernichtet wird, wird seit der Entstehung der ersten menschlichen embryonalen Stammzelllinien über die Erschaffung und Verwendung von hESCs in der Forschung debattiert. In Deutschland ist aufgrund dieser ethischen Kontroverse die Erschaffung von neuen humanen embryonalen Stammzelllinien generell verboten und Import und Forschung nur nach Genehmigung durch das Robert-Koch-Institut erlaubt (Stammzellgesetz). Zusätzlich wurde eine Stichtag-Regelung eingeführt, welche den Import und die Verwendung nur von solchen Zelllinien erlaubt, die vor dem Stichtag (zurzeit 1. Mai 2007) generiert wurden. So soll verhindert werden, dass Wissenschaftler in Deutschland die Zelllinien im Ausland als Auftragsarbeit herstellen und importieren lassen. Allerdings lässt die Verwendung von

humanen, pluripotenten Zellen in der Forschung neue Ideen zu. Im Feld der regenerativen Medizin sind durch die Verwendung dieser Zellen völlig neue Möglichkeiten entstanden. Vor allem degenerative Erkrankungen mit permanentem Verlust bestimmter Gewebe sind theoretisches Ziel neuer Therapien.

1.2 Charakterisierung von hESC

Humane embryonale Stammzellen zeichnen sich durch einige besondere Eigenschaften aus, die sie in der Summe von anderen Zellen unterscheiden. Morphologisch erkennt man Stammzellen an einem kleinen Verhältnis von Zytoplasma zu Nukleus (Abbildung 1 B). Im undifferenzierten Stadium übernehmen Stammzellen keine spezialisierte Funktion, im Gegensatz zu differenzierten Zellen wie Muskel- oder Nervenzellen, und benötigen daher keine umfassende Protein-Ausstattung. Eine weitere Eigenschaft, welche die Arbeit mit hESCs als Zelllinie erst möglich macht, ist das ständige Wachstum. Dieser Status wird durch die Zellkulturbedingungen künstlich aufrecht erhalten, wobei ständiges Wachstum und der undifferenzierte Zustand eng miteinander verknüpft sind. Mit voranschreitender Differenzierung hört auch das Wachstum der Zellen auf. Humane embryonale Stammzellen haben also die Eigenschaft, sich selbst zu erneuern (*self-renewal*). Diese Eigenschaft verlieren sie auch nach vielen Passagen (>100) nicht, sie altern also nicht wie primäre Zellen in Kultur. Ein Signal für das Alter einer Zelle ist die Länge der Telomere an den Enden der Chromosomen. Mit jeder Zellteilung verkürzen sich diese, bis die Zelle ab einer bestimmten Länge aufhört sich zu teilen. Das Enzym Telomerase stellt verkürzte Telomere wieder her und wirkt damit dem Alterungsprozess entgegen. Stammzellen zeichnen sich durch eine erhöhte Expression und Aktivität der Telomerase aus (Thomson et al. 1998). Werden hESC über viele Passagen in Kultur gehalten, steigt die Wahrscheinlichkeit für chromosomale Aberrationen. Dies ist oft der limitierende Faktor, weshalb Stammzellen in der Regel nicht länger als etwa 150 bis 200 Passagen kultiviert werden.

Stammzellen exprimieren außerdem einige Proteine und Zucker-Strukturen, über die sie per Immunfärbung von anderen Zelltypen unterschieden werden können, also zum Beispiel per Immunhistochemie, Immunfluoreszenz oder FACS-Analyse. Einige solcher Zucker-Strukturen befinden sich an der Oberfläche der Zellen und dienen so als Oberflächenmarker (*stage specific embryonic antigen* SSEA-3/4, *tumor rejection antigens* TRA-1-60, TRA-1-81). Die

Transkriptionsfaktoren Oct-4 (POU5F1) und Nanog (NANOG) befinden sich im Zellkern (Carpenter et al. 2003) und können per Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden (Abbildung 13). Ein weiterer Assay für den Nachweis von pluripotenten Zellen basiert auf der Expression von alkalischer Phosphatase.

1.2.1 Pluripotenz und deren Nachweis

Die mit Abstand wichtigste Eigenschaft von humanen embryonalen Stammzellen ist die Pluripotenz. Sie ist definiert als die Eigenschaft der Zellen, sich in jeden Zelltyp des Körpers differenzieren zu können. Es werden verschiedene Methoden unterschieden, um Pluripotenz nachzuweisen (Jaenisch & R. Young 2008).

Die am wenigsten stringente Methode ist die ungerichtete Differenzierung *in vitro* (zum Beispiel im Embryoidkörperchen-Modell) und die nachfolgende Analyse anhand der Expression von Genen, die spezifisch für bestimmte Gewebe sind. Nach der ungerichteten Differenzierung sollten Zellen aus allen drei Keimblättern nachweisbar sein. Der nächste Schritt ist die Eigenschaft der Zellen, Teratome zu bilden. Dazu werden die zu testenden Zellen einer Maus injiziert, üblicherweise in den Oberschenkelmuskel. Aus pluripotenten Zellen entsteht nach einigen Wochen ein Teratom, welches Zellen aus allen drei Keimblättern enthält.

Die nächste Methode zum Nachweis von Pluripotenz besteht in der Bildung von Chimären. Dazu werden die zu testenden Zellen in einen Embryo im Blastozysten-Stadium injiziert. Aus diesem Embryo wächst ein Hybrid heran, welcher aus Zellen des Embryos und den injizierten Zellen besteht. Zellen aus beiden Quellen müssen zufällig im Tier verteilt sein (Chimäre) und in allen Geweben vorkommen (M. J. Evans & Kaufman 1981). Für die nächste Stufe wird geschaut, ob in diesen Chimären Zellen in der Keimbahn vorkommen, die aus den injizierten Zellen entstanden sind.

Der letzte und am meisten stringente Test wird an tetraploiden Blastozysten durchgeführt. Dazu werden zwei diploide Embryonen im Zwei-Zell-Stadium miteinander verschmolzen. Diese tetraploiden Embryonen reifen nur noch bis zur Blastozyste, aber nicht weiter, sie sind in ihrer Entwicklung also stark eingeschränkt und nicht überlebensfähig. Wenn einer solchen

Blastozyste nun pluripotente Zellen injiziert werden, entsteht daraus ein Tier, welches keine Chimäre ist, sondern komplett aus den injizierten Zellen hervorgegangen ist (Nagy et al. 1990). Dies ist zurzeit der ultimative Beweis für Pluripotenz.

Zum Nachweis von Pluripotenz im humanen System werden aus offensichtlichen ethischen Gründen nur die ersten beiden Methoden (Differenzierung *in vitro* und Bildung von Teratomen in der Maus) genutzt. Seit einiger Zeit können auch Microarray-Analysen des Transkriptoms und epigenetische Untersuchungen (siehe unten) zur Identifikation von Stammzellen genutzt werden.

1.2.2 Molekulare Grundlagen der Pluripotenz

Auf genetischer Ebene ist Pluripotenz vor allem durch die Expression von drei Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet: Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*, POU5F1), Sox-2 (*sex determining region Y-box 2*, SOX2) und Nanog (NANOG). Diese drei Transkriptionsfaktoren bilden zusammen das regulatorische Grundgerüst, welches den pluripotenten Status aufrecht erhält. Sie regulieren einerseits ihre eigene Expression, andererseits auch die der anderen beiden Gene herauf, im Sinne einer autoregulatorischen positiven Feedback-Schleife. Weiterhin regulieren sie eine Vielzahl von Genen, die mit Pluripotenz zusammenhängen, so dass von einem Netzwerk gesprochen werden kann, in dessen Zentrum Oct-4, Sox-2 und Nanog stehen (Abbildung 2). Während Gene, die wichtig sind für die Pluripotenz (wie zum Beispiel andere Transkriptionsfaktoren, Gene in Signalwegen wie FGF2 oder Gene, die für die Zellteilung wichtig sind) vermehrt exprimiert werden, wird die Expression von Genen, die mit der Differenzierung in verschiedene Zelltypen in Verbindung gebracht werden, aktiv unterdrückt. Es konnte beobachtet werden, dass Oct-4, Sox-2 und Nanog größtenteils an die Promotoren derselben Gene binden, und dass die Bindungsstellen an den betroffenen Genen oftmals überlappen. Sie induzieren bzw. reprimieren ihre Ziel-Gene also nicht individuell, sondern in konzertierter Weise, indem sie Komplexe bilden. Das regulatorische Netzwerk ist nur in pluripotenten Zellen aktiv und wird mit dem Einsetzen der Differenzierung schnell abgeschaltet (Jaenisch & R. Young 2008; Boyer et al. 2005; Chambers & Tomlinson 2009).

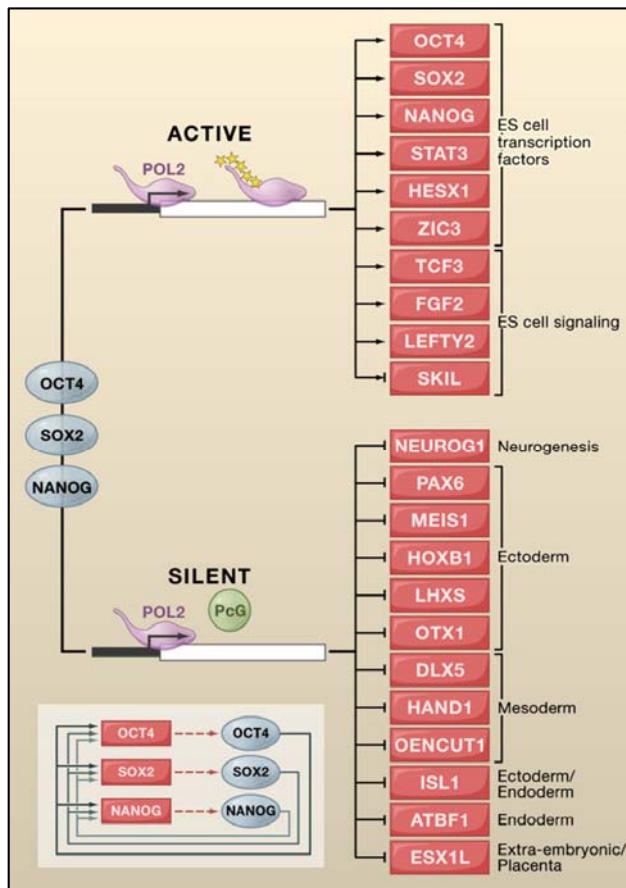


Abbildung 2: Model zur Regulation der Pluripotenz, die von Oct-4, Sox-2 und Nanog aktivierten Gene dienen der Aufrechterhaltung der Pluripotenz (active), die unterdrückten Gene (silent) dienen der Differenzierung; unten links ist die autoregulatorische Feedback-Schleife von Oct-4, Sox-2 und Nanog gezeigt; POL2: RNA Polymerase II (Jaenisch & R. Young 2008).

Epigenetische Veränderungen tragen ebenso zur differentiellen Expression bei wie die Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Nanog. Vor allem die aktive Unterdrückung von Genen wird von Oct-4, Sox-2 und Nanog über Histonmodifikationen vermittelt. Während in undifferenzierten Stammzellen die Promoterregionen generell eher nicht methyliert sind, trägt deren Methylierung zum *Silencing* von nicht benötigten Genen in terminal differenzierten Zellen bei (Laurent et al. 2010). Für die Differenzierung entscheidende Gene dürfen in undifferenzierten Zellen aber nicht komplett abgeschaltet werden, sondern müssen schnell verfügbar sein, sobald die Zelle anfängt zu differenzieren. Dies wird nicht über Promoter-Methylierung erreicht, sondern über bivalente

Histonmodifikationen (Gan et al. 2007). Die über *polycomb-group* (PcG) Proteine vermittelten heterochromatischen Histonmodifikationen (z. B. Histon 3 Lysin 27 Methylierung) unterdrücken die Genexpression, während euchromatische Histonmodifikationen (z. B. Histon 3 Lysin 4 Methylierung) das Gegenteil bewirken. In der Summe der Effekte sind die Gene still, können aber schnell exprimiert werden. Das Gen T, welches für den Transkriptionsfaktor Brachyury kodiert, der für die mesodermale Differenzierung wichtig ist, liegt in undifferenzierten Stammzellen bivalent modifiziert vor (Golob et al. 2008).

Die epigenetische Modifikation von POU5F1 ist zu einem Qualitätsmerkmal von undifferenzierten Stammzellen geworden. In undifferenzierten Stammzellen ist die

Promoter-Region von POU5F1 nicht methyliert. In terminal differenzierten Zellen hingegen findet man eine deutliche DNA-Methylierung in der Promoter-Region von POU5F1. Diese durch *de-novo* Methylierung entstandene Modifikation kann aber erst einige Tage nach Einsetzen der Differenzierung identifiziert werden. Die schnelle Regulation wird über heterochromatische Histonmodifikationen vermittelt, vor allem Deacetylierung von Histon 3 Lysin 9 und Lysin 14, Methylierung von Histon 3 Lysin 9 und Demethylierung von Histon 3 Lysin 4 (Feldman et al. 2006). Diese unterschiedliche Methylierung der Promoter-Region von POU5F1 kann zur Identifikation pluripotenter Zellen genutzt werden.

Der pluripotente Status von hESCs wird außerdem über die Aktivierung und Suppression einiger Signalwege unterstützt. FGF2 (*fibroblast growth factor 2, basic*) wird daher dem Medium zugesetzt, um die Stammzellen zu stabilisieren. Es werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, wie genau FGF2 auf die Zellen wirkt. Zum einen scheint es eine indirekte Wirkung über eine Subpopulation von Zellen in der Kultur zu geben, die durch FGF2 Signale vermehrt Proteine wie TGF- β (*transforming growth factor beta*), Activin A oder IGF (*insulin like growth factor*) produzieren und ins Medium abgeben. Dies erklärt auch, dass die Verwendung von konditioniertem Medium die Kokultur ersetzen kann. Weiterhin wird eine direkte, positive Wirkung von FGF2 auf die Expression von NANOG über den Smad2/3 Signalweg diskutiert. Proteine der TGF- β Familie wie TGF- β 1 und Activin A spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für den pluripotenten Status, sie wirken ebenfalls über Smad2/3 Signale (James et al. 2005). Signalwege über Proteine der BMP Familie (*bone morphogenic protein*) und der WNT Familie werden hingegen vor allem mit der Differenzierung in Verbindung gebracht. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich humane embryonale Stammzellen in diesen Aspekten deutlich von murinen unterscheiden, welche LIF (*leukemia inhibitory factor*) und BMP-4 im Medium für ihre Proliferation benötigen (Übersicht bei: Lanner & Janet Rossant 2010; Ng & Surani 2011; Jaenisch & R. Young 2008).

1.3 Herz

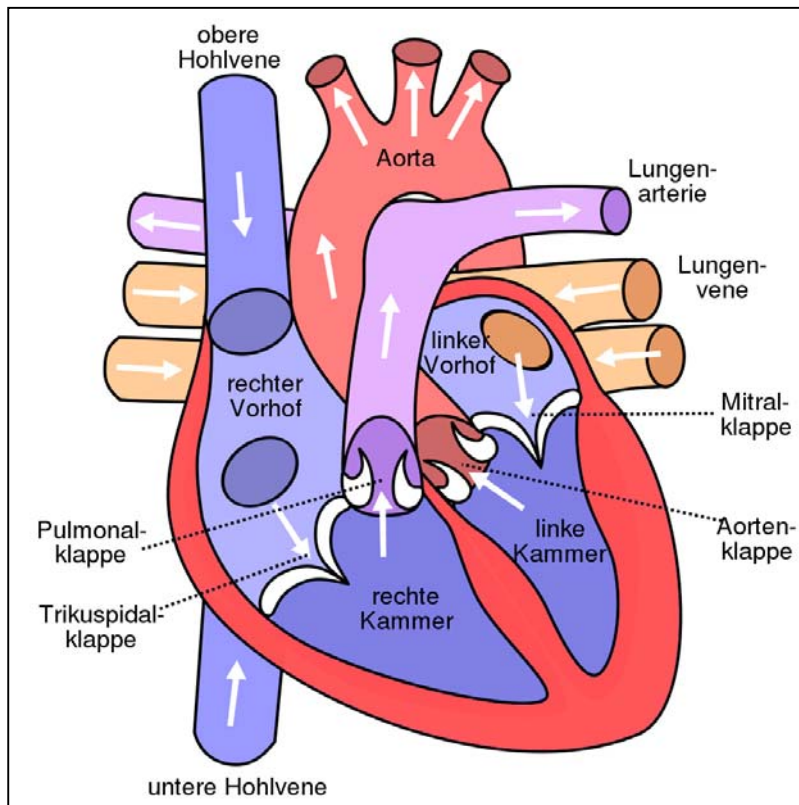


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anatomie des menschlichen Herzens, Quelle: Internet.

Das Herz liefert den Druck, welcher den Blutkreislauf antreibt. Anatomisch kann das Herz in vier Teile gegliedert werden: Das rechte und das linke Herz mit jeweils einem kleineren Vorhof (Atrium) und einer größeren Kammer (Ventrikel). Das rechte Herz sorgt für die Oxygenierung des Blutes über die Lunge, das linke Herz versorgt den gesamten Körper mit oxygeniertem Blut (Abbildung 3). Damit das

Herz den Blutkreislauf aufrecht erhalten kann, ist eine physiologische, koordinierte Kontraktion erforderlich. Diese wird über ein System von spezialisierten Herzmuskelzellen ermöglicht, welche Erregungen in Form von Aktionspotentialen sowohl fortleiten als zum Teil auch bilden können (Erregungsleitungssystem).

Ein Teil der Kardiomyozyten entwickelt sich zu Schrittmacherzellen und bildet den Sinusknoten, von dem die Erregung unter physiologischen Bedingungen ausgeht. Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof im Bereich der Mündung der oberen Hohlvene. Als erstes greift die Erregung auf das Vorhofmyokard über und führt zu dessen Kontraktion und damit zur Füllung des Ventrikels mit Blut (Diastole). Von dort wird sie über den atrioventrikulären Knoten und das His-Purkinje-System ins Arbeitsmyokard weitergeleitet und führt zur zeitlich versetzten Kontraktion (Systole). Spontan depolarisieren können Zellen des Sinusknoten, des AV-Knotens und des His-Purkinje-Systems, und zwar mit absteigenden Frequenzen. So ist ein hierarchisches, sicheres System vorhanden, in dem jeweils das System mit der höchsten Frequenz die Kontraktion des Herzens koordiniert. Voraussetzung für

Depolarisationswellen, die sich unidirektional ausbilden, ist eine Phase direkt nach der Erregung, in der die Zellen nicht wieder erregt werden können (Refraktärzeit). Außerdem müssen Atrium und Ventrikel elektrisch isoliert sein, die Erregung läuft nur über den AV-Knoten.

Das Membranpotential einer Zelle wird über die Konzentration von positiv (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) und negativ (Cl^-) geladenen Ionen intra- und extrazellulär bestimmt (Nernst-Gleichung). Im Ruhezustand liegt das Membranpotential einer Herzmuskelzelle bei etwa -80 mV. Während der elektrischen Erregung steigt das Membranpotential sprunghaft an, erreicht kurzzeitig positive Werte (etwa 30 mV) und sinkt dann nach einer Plateauphase wieder auf den Ausgangszustand ab. Damit eine solche Erregung möglich ist, kommt in Kardiomyozyten eine Vielzahl von verschiedenen Ionenkanälen vor, die über ihre spezifischen Eigenschaften die Ionenströme lenken.

Die Depolarisation einer Zelle (Aktionspotential) des Arbeitsmyokards läuft in 5 Phasen ab (Abbildung 4):

Phase 0: Durch einen elektrischen Reiz wird das Schwellenpotential der spannungsabhängigen Natriumkanäle überschritten (etwa -70 bis -75 mV), diese öffnen sich und durch den Einstrom von Na^+ (I_{Na}) depolarisiert die Zelle. Nach etwa 1-2 ms schließen die Natriumkanäle wieder, das Membranpotential liegt dann bei ca. +30 mV. Dieser *overshoot* ist wichtig, um benachbarte Zellen über das Schwellenpotential zu depolarisieren und so die Erregung zu übertragen.

Phase 1: Die schnellen Natriumkanäle schließen und es kommt zur teilweisen Repolarisation durch Kaliumauswärtsströme (I_{to}). Durch die Depolarisation öffnen sich die L-Typ Calciumkanäle.

Phase 2: Durch den depolarisierenden Einwärtsstrom von Calcium ($I_{\text{Ca, L}}$) entsteht die für das Arbeitsmyokard so charakteristische Plateauphase des Aktionspotentials.

Phase 3: Die Calciumkanäle schließen sich und repolarisierende, auswärtsgerichtete Kaliumströme (I_{Kr} und I_{Ks}) setzen ein. Dadurch kommt es zur kompletten Repolarisation des Membranpotentials (Repolarisationsphase).

Phase 4: In dieser Ruhephase bleibt das Membranpotential konstant. Verantwortlich sind einwärts gleichrichtende Kaliumströme (I_{K1}). Die Zelle ist bereit für das nächste Aktionspotential.

Die Refraktärzeit gliedert sich in die absolute und die relative Refraktärzeit (Abbildung 4 B). Sie ergibt sich aus dem Zustand der Natriumkanäle, die drei verschiedene Zustände kennen. In Phase 4 des Aktionspotentials sind sie im Ruhezustand (R). In Phase 0 wechseln sie in den offenen Zustand (O). In Phase 1 und 2 befinden sie sich in einem inaktiven Zustand (I). In Phase 3 wechseln sie vom inaktiven Zustand in den Ruhezustand, den sie in Phase 4 wieder vollständig erreichen. Sind die Natriumkanäle inaktiv, können sie auch von sehr starken Strömen nicht aktiviert (geöffnet) werden. Dies ist die absolute Refraktärzeit. In der relativen Refraktärzeit befindet sich ein Teil der Kanäle noch im inaktiven Zustand, ein Teil bereits im Ruhezustand. Ein Reiz, der jetzt auf die Zelle trifft, löst ein Aktionspotential aus, welches allerdings kürzer und schwächer ist als ein normales Aktionspotential, da nicht alle Natriumkanäle für die Depolarisation verfügbar sind.

Eine Erregungswelle benötigt vom Sinusknoten bis zu den Purkinje-Fasern etwa 100 ms, die Refraktärzeit beträgt hingegen etwa 200 – 400 ms. So wird garantiert, dass unter normalen Bedingungen eine Erregung jede Zelle nur einmal erreicht.

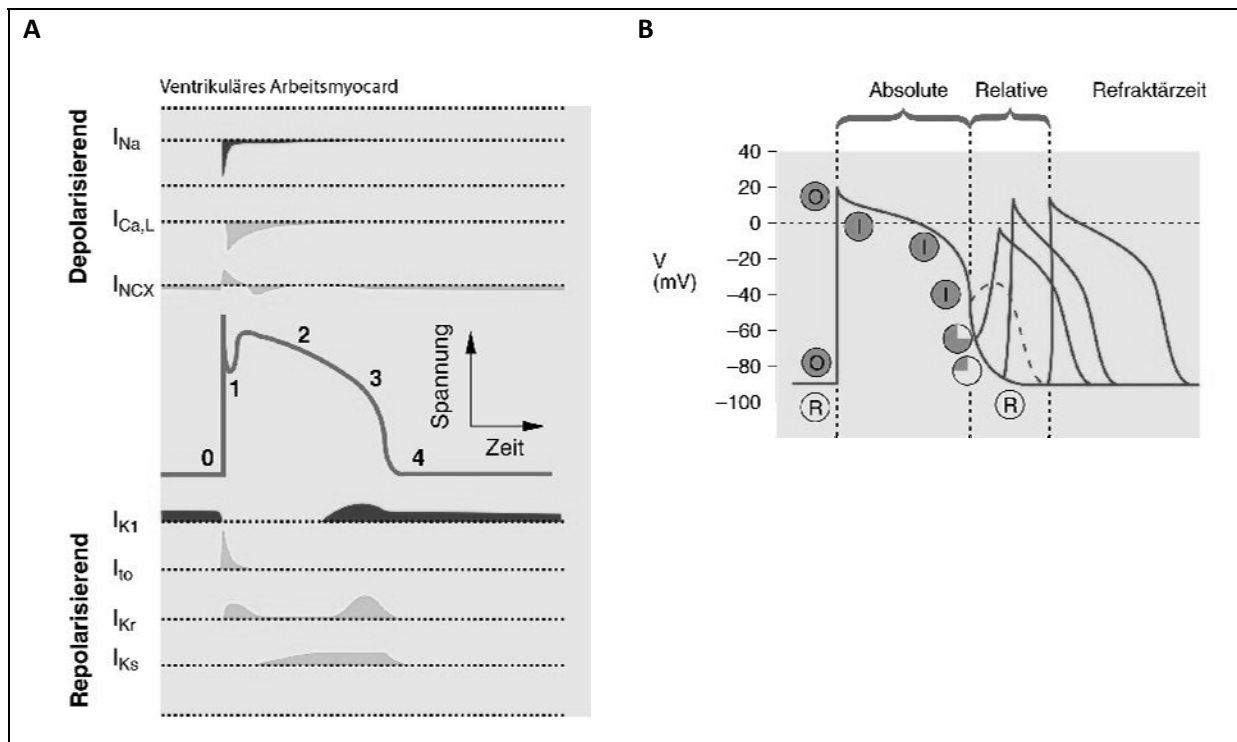


Abbildung 4: (A) Phasen des Aktionspotentials und wichtige Ionenströme im Arbeitsmyokard, (B) Absolute und relative Refraktärzeit, Zustände der Natriumkanäle: R – Ruhezustand, O – offen, I – inaktiv, Quelle: Aktories, K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, München, 10. Auflage, 2009.

1.4 Herzrhythmusstörungen

Herzrhythmusstörungen entstehen entweder durch Beeinflussung der Erregungsbildung, der Erregungsleitung oder durch Zunahme der räumlichen Dispersion der Repolarisation. Diese Unterteilung ist als modellhafte Vorstellung anzusehen, in der klinischen Realität treten Arrhythmien hauptsächlich in gemischten Formen auf. Alle unterstützen jedoch die Theorie der kreisenden Erregung (*reentry*, Wiedereintritt), einer Erregungswelle, die nicht ausläuft, sondern immer wieder auf nicht refraktäres, erregbares Myokard trifft. Dadurch kommt es zu unkoordinierten Kontraktionen, welche die Pumpleistung des Herzens stark beeinträchtigen oder komplett zum Erliegen bringen.

Störungen der Erregungsbildung haben ihre Ursachen typischerweise nicht in makroskopischen, anatomischen Veränderungen des Herzens, sondern auf molekularer Ebene. Man kann hier frühe und späte Nachdepolarisationen unterscheiden. In beiden Fällen kommt es zu einem Aktionspotential, welches außerhalb des normalen Sinusrhythmus liegt und von der Zelle des Arbeitsmyokards selbst generiert wird. Frühe Nachdepolarisationen (*early after depolarisations – EAD*) werden durch eine gestörte Repolarisation verursacht. Es

kommt zu einer Verbreiterung des Aktionspotentials, entweder bedingt durch verminderte repolarisierende Kaliumströme (I_{Kr} und I_{Ks}), oder durch verringerte Inaktivierung von Natriumströmen (I_{Na}). Im Elektrokardiogramm machen sich diese Veränderungen an einer verlängerten QT-Zeit bemerkbar (LQT-Syndrom, Abbildung 5). Es kann durch einen Wiedereintritt der Erregung zu anfallsartigen ventrikulären Tachykardien kommen, die im EKG charakteristische Muster zeigen (Spitzenumkehrtachykardie, *Torsades de pointe*). Ventrikuläre Arrhythmien stellen ein großes Risiko für den plötzlichen Herztod dar.

Die Ursachen für späte Nachdepolarisationen (*late after depolarisations – LAD*) können in Mutationen im Ryanodinrezeptor liegen. Aber auch eine Überladung des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) mit Calcium (durch Hypercalcämie) oder ein gestörter Calcium-Stoffwechsel bei Herzinsuffizienz kann die Rate an spontanen Calcium-Freisetzungen ins Cytosol erhöhen (*calcium sparks*). Dieses cytosolische Calcium wird über den Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) aus der Zelle befördert, wodurch es zu einem Natrium-Einstrom mit daraus folgender Depolarisation kommt. Ist diese hoch genug, kann das Schwellenpotential erreicht werden und es kommt zum arrhythmischen Aktionspotential. Im ungünstigen Fall wird so eine neue Erregungswelle gestartet und es kommt zum Wiedereintritt (*reentry*) und so zu ventrikulären Tachykardien.

Störungen der Erregungsleitung führen häufig zu kreisenden Erregungen (*reentry*) und sind die Ursache von komplexen, tachykarden Arrhythmien. Sie entstehen, wenn eine Erregungswelle auf nicht mehr absolut refraktäres Myokard trifft und so eine erneute Erregung auslöst. Oft sind Infarkt Narben die Ursache, da sich in deren Randgebiet die Erregung langsamer ausbreitet und sich um den Infarktkern eine kreisende Erregung bilden kann. Aber auch andere anatomische Veränderungen des Herzens können kreisende Erregungen begünstigen, wie zum Beispiel die dilatative Kardiomyopathie (längere Wege begünstigen kreisende Erregungen), mikroskopische und molekulare Anpassungen bei Herzinsuffizienz oder die mangelnde Isolierung von Atrium und Ventrikel (angeborenes Wolff-Parkinson-White-Syndrom). Bradykarde Störungen der Erregungsleitung haben ihre Ursache in mangelnder Überleitung, entweder vom Sinusknoten in den Vorhof (sinoatrialer Block, *sick sinus syndrome*) oder vom Vorhof in den Ventrikel (atrioventrikulärer Block).

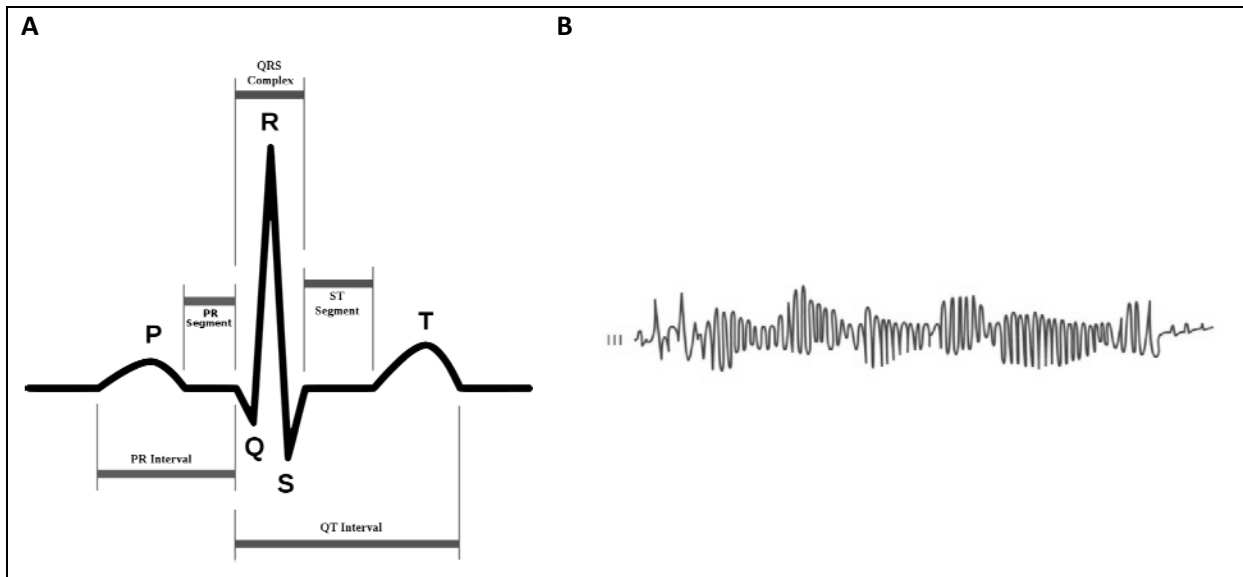


Abbildung 5: (A) schematische Darstellung des QT-Intervalls, (B) Torsades de pointe Arrhythmie, Quelle: Aktories, K., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, München, 10. Auflage, 2009.

Die Zunahme der elektrischen Inhomogenität (Dispersion) ist die Ursache für einen dritten Mechanismus für Arrhythmien. Unter physiologischen Bedingungen besteht bereits ein Unterschied in der Repolarisationsgeschwindigkeit zwischen Endo- und Epikard. Subendokardiale Kardiomyozyten haben im Gegensatz zu subepikardialen Kardiomyozyten ein längeres Aktionspotential, einen geringeren Kalium-Strom vom Typ I_{to} und damit eine geringere Repolarisationsreserve. Wird nun die Repolarisation durch Einflüsse wie Ischämie oder repolarisationshemmende Substanzen verändert, können die Unterschiede zwischen subendokardialen und subepikardialen Kardiomyozyten so groß werden, dass Wiedereintritt und kreisende Erregungen begünstigt werden.

1.4.1 LQT-Syndrom

Unter dem hereditären LQT-Syndrom versteht man eine erblich bedingte Erkrankung, die zu einer verlängerten QT-Zeit führt. Inzwischen werden zehn verschiedene Subtypen (LQT1 bis LQT10) voneinander unterschieden, die auf Mutationen in unterschiedlichen Genen basieren (Roden 2008). LQT1, LQT2 und LQT3 sind die drei häufigsten und bedeutendsten Typen (Tabelle 1), LQT4 bis LQT10 sind selten. LQT1 wird durch eine Mutation in der porenformenden α -Untereinheit des Kaliumkanals $K_{v7.1}$ (KCNQ1) verursacht, bei LQT2 ist der Kaliumkanal $K_{v11.1}$ (KCNH2, *human ether-a-go-go related gene* - hERG) betroffen. Diese beiden Kanäle leiten den größten Teil der repolarisierenden Kaliumströme I_{Kr} ($K_{v11.1}$, *inward delayed rectifier, rapid*) und I_{Ks} ($K_{v7.1}$, *inward delayed rectifier, slow*). Durch die Mutation

kommt es zum teilweisen Funktionsverlust, zum verminderten I_{Kr} bzw. I_{Ks} und so zur verlangsamten Repolarisation. Bei LQT3 ist der spannungsabhängige Natriumkanal $Na_v1.5$ (SCN5A) mutiert. Durch diese Veränderung öffnet der Kanal über die schnelle Aufstrich-Phase (Phase 0, Abbildung 4) hinaus bis in die Plateau-Phase (Phase 2) hinein und sorgt so für eine weiterlaufende Depolarisation (I_{Na}) der Zelle, obwohl die Repolarisation bereits eingesetzt hat. Dadurch wird die Repolarisation verlangsamt und das Aktionspotential wird breiter.

Die verlängerte QT-Zeit kann als Prädisposition verstanden werden. Viele Patienten, die ein LQT-Syndrom haben, leben über lange Zeit symptomfrei. Oftmals erfahren sie erst durch ein routinemäßig durchgeführtes Elektrokardiogramm von ihrer Erkrankung. Andere Risikofaktoren für das Auftreten von gefährlichen Rhythmusstörungen sind Calciumüberladung durch erhöhten Sympathikus-Tonus (also meistens durch Sport) und durch Überdosierung von Digitalis-Präparaten. Außerdem sind hier strukturelle Herzerkrankungen zu nennen, vor allem durch Anpassungen des Herzens bei Herzinsuffizienz („erworbenes LQT-Syndrom“). Schließlich besitzen viele Arzneistoffe als unerwünschte Wirkung eine Affinität zu Kaliumkanälen (vor allem den hERG-Kanal) und können daher zu verlängerter QT-Zeit führen. Addieren sich diese Risikofaktoren, steigt die Wahrscheinlichkeit für schwere Arrhythmien bis hin zum plötzlichen Herztod.

Die Inzidenz des hereditären LQT-Syndroms liegt bei geschätzten 1:7000, wobei die Dunkelziffer hoch sein dürfte, da ein symptomfreies LQT-Syndrom nur selten diagnostiziert wird. Es wird geschätzt, dass das LQT Syndrom, bzw. der plötzliche Herztod, zu etwa 3000 bis 4000 Todesfällen pro Jahr in den USA führt (*National Heart and Lung Institute, US Department of Health*).

Subtyp	LQT1	LQT2	LQT3
Gen	KCNQ1	KCNH2 (hERG)	SCN5A
Effekt	Verminderter I_{Ks}	Verminderter I_{Kr}	Verlängerter I_{Na}
Trigger für Arrhythmien	Emotionaler oder physischer Stress, Schwimmen, Tauchen	Emotionaler oder physischer Stress, plötzliche laute Geräusche	Ruhe, Schlaf
EKG (Ruhe)	Breite T-Welle	Niedrige T-Welle mit Kerbe	Lange, isoelektrische ST-Strecke
QT Änderung durch Anstrengung	Keine Verkürzung	Normal	Supranormal

Tabelle 1: Übersicht über die drei häufigsten Subtypen des LQT-Syndroms, modifiziert nach Roden (2008).

1.4.2 Arrhythmien durch Arzneimittel

Der hERG-Kanal (*human ether-a-go-go related gene*) besitzt die ungewöhnliche Eigenschaft, mit sehr vielen Substanzen zu interagieren. Eine Vielzahl von sowohl chemisch, als auch pharmakologisch sehr heterogenen Arzneistoffen zeigt eine Affinität zum hERG-Kanal und blockiert den Ionenstrom konzentrationsabhängig. Klinisch werden Substanzen nach ihrer Eigenschaft evaluiert, Torsades de pointe (TdP) Arrhythmien zu verursachen (Tabelle 2). Ventrikuläre Tachykardien, vor allem Torsades de pointe Arrhythmien, waren in den letzten Jahren die häufigste Ursache, weshalb Arzneimittel vom Markt genommen wurden (Roden 2004).

Die Inzidenz von arzneimittelinduzierten TdP-Arrhythmien lag in Frankreich von 1999 bis 2005 bei etwa 11 pro Million Einwohner und pro Jahr. Die Dunkelziffer ist allerdings hoch, da viele Patienten versterben, bevor sie ein Krankenhaus erreichen, und diese Fälle den Pharmakovigilanzsystemen verborgen bleiben (Molokhia et al. 2008). Zwischen 5 und 20% dieser Fälle tragen zusätzlich eine Mutation des hereditären LQT Syndroms (Roden 2008).

Inzwischen müssen neu entwickelte Substanzen auf ihre proarrhythmische Kardiotoxizität geprüft werden, unabhängig vom eigentlichen pharmakologischen Ziel („*S7B Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals*“, U.S. Food And Drug Administration, www.fda.gov). Dazu wird im frühen Entwicklungsstadium die Affinität der Substanzen zum hERG-Kanal bestimmt. Dies geschieht in sogenannten hERG-Assays: Patch-Clamp Untersuchungen am hERG-Kanal-exprimierenden, heterologen Zellsystem. Dieser Test ist sehr sensitiv, gleichzeitig aber beschränkt auf die porenformende α -Untereinheit der hERG-Kanals, da nur diese exprimiert wird. Die Komplexität von Kardiomyozyten oder Herzgewebe wird nicht abgebildet, so dass Einflüsse auf verschiedene Ionenkanäle verborgen bleiben. In späteren Entwicklungsstadien werden zusätzliche Untersuchungen an isolierten Purkinje-Fasern von Kaninchen und telemetrische Untersuchungen an Hunden, Affen oder Schweinen zur Einschätzung des arrhythmogenen Potentials durchgeführt. Bei diesen Spezies verläuft die Repolarisation des Aktionspotentials ähnlich wie beim Menschen. Es wird bei diesen Untersuchungen überprüft, ob sich unter Einfluss der zu testenden Substanz das Aktionspotential verlängert (isolierte Purkinje-Fasern vom Kaninchen) oder ob sich die QT-Zeit im EKG verlängert

(Telemetrie). Diese Untersuchungen machen Tiertötungen notwendig bzw. sind Tierversuche und daher nicht unumstritten, sowohl aus ethischen als auch aus pekuniären Gründen. Kleinere Tiere, speziell Mäuse und Ratten, sind aufgrund ihrer vom Menschen sehr unterschiedlichen Ionenkanal-Ausstattung für diesen Zweck nicht geeignet (Abbildung 8). Der hauptsächliche Strom während der Repolarisierung von murinen Kardiomyozyten ist nicht I_{Kr} und I_{Ks} , sondern der transiente Kalium-Auswärtsstrom I_{to} . (Nerbonne et al. 2001; Royer et al. 2005).

Die Überprüfung von Substanzen an Tieren ist notwendig, da der Zusammenhang zwischen Blockade des hERG-Kanals, Verlängerung des QT-Intervalls und Torsades de pointe Arrhythmien nicht so eindeutig ist, wie die theoretischen Überlegungen es vermuten lassen. Einige Substanzen, die im Labor eine hohe Affinität zum hERG-Kanal aufweisen, zeigen in der Klinik ein geringes Risiko, Torsades de pointe Arrhythmien zu verursachen haben. Ein prominentes Beispiel für diesen Fall ist der Calciumkanalblocker Verapamil (Redfern et al. 2003). Außerdem korreliert das relative Risiko für Arrhythmien nur unzureichend mit der relativen Affinität zum hERG-Kanal (Mirams et al. 2011).

Substanzklasse	Arzneimittel
Antiarrhythmika	Amiodaron, Disopyramid, Dofetilid*, Ibutilid*, Procainamid*, Chinidin, Sotalol
Antibiotika	Clarithromycin, Sparfloxacin*, Erythromycin
Antiprotozoika	Pentamidin, Chloroquin, Halofantrin*
Antihistaminika	Astemizol*, Terfenadin
Neuroleptika	Thioridazin, Mesoridazin*, Haloperidol, Pimozid, Chlorpromazin, Droperidol
Prokinetika	Cisaprid*, Domperidon
Opioide	Levomethadol*, Methadon

Tabelle 2: Substanzen, welche zu Torsades de pointe Arrhythmien führen, * in Deutschland nicht im Handel (nach www.qtdrugs.org, University of Arizona / Arizona CERT).

Um die individuellen Unterschiede für das Risiko zu erklären, eine Torsades de pointe Arrhythmie zu entwickeln, gibt es die Theorie der Repolarisierungs-Schwelle. Das Risiko hängt demnach nicht nur von der Substanz und dem Ausmaß der hERG-Blockade ab, sondern auch von anderen betroffenen Ionenkanälen (Natrium- und Calciumkanäle), vom Elektrolytstatus, von Bradykardie und Tachykardie, vom Geschlecht, von kongenitalen Erkrankungen (LQT-Syndrom), von strukturellen Herzerkrankungen und von weiteren Faktoren (Justo et al. 2005). Während einzelne Risikofaktoren noch nicht zu einer Arrhythmie führen, kann beim gleichzeitigen Vorliegen mehrerer Risikofaktoren die Repolarisierungs-Schwelle überschritten und eine Arrhythmie ausgelöst werden. Tests an

gesunden Probanden eignen sich also nicht, um das arrhythmogene Potential einer Substanz einzuschätzen. Laut Redfern und Kollegen kann ein Arzneistoff als sicher eingestuft werden, wenn zwischen der therapeutischen Konzentration und der $IC_{50}(hERG)$ ein Faktor von mindestens 30 liegt (Redfern et al. 2003).

Insgesamt muss man feststellen, dass es noch kein ausreichend valides Testsystem zur präklinischen Beurteilung vom arrhythmogenen Potential von Arzneimitteln gibt. Ein wesentlicher Kritikpunkt an den heutzutage vorgeschriebenen präklinischen Tests ist die Tatsache, dass kein Testsystem auf humanen Kardiomyozyten basiert und damit die elektrophysiologische Komplexität dieser Zellen abbildet. Für die Entwicklung neuer Arzneimittel stellt dies ein schwerwiegendes Problem dar. Denn sowohl zu restriktive Testsysteme (hERG-Assays) bedeuten wirtschaftlichen Schaden, wenn Kandidaten nicht weiter entwickelt werden, die in der Klinik kein arrhythmogenes Potential gezeigt hätten, als auch zu wenig restriktive Testsysteme. Wenn sich erst in der klinischen Verwendung zeigt, dass eine Substanz das Risiko für Arrhythmien signifikant erhöht, bedeutet die Einschränkung der Zulassung bzw. die Marktrücknahme nicht nur wirtschaftlichen Schaden für die Firma, sondern auch einen Glaubwürdigkeitsverlust. Beispiele aus der jüngsten Vergangenheit sind Astemizol, Thioridazin, Terfenadin und Clobutinol.

1.5 Regenerative Medizin

Viele häufige Erkrankungen sind degenerative Erkrankungen, sie entstehen durch das Absterben bestimmter Zelltypen und dem irreversiblen Funktionsverlust von Organen. Morbus Parkinson zum Beispiel wird durch den Verlust dopaminergener Neurone in der Substantia nigra verursacht, beim Insulin-pflichtigen Diabetes mellitus produzieren die β -Zellen im Pankreas keine ausreichenden Mengen Insulin mehr. Auch Herzinfarkt, Schlaganfall, Verletzungen der Wirbelsäule und viele Typen von Blindheit und Taubheit gehen auf den Verlust von Zellen zurück, die der Körper nicht ersetzen kann. Bisher gibt es keine kurativen Behandlungen für solche Erkrankungen, man kann lediglich die Symptome behandeln und die Progredienz der Erkrankung vermindern. Die Idee der regenerativen Medizin ist es, die betroffenen Zellen, wie zum Beispiel pankreatische β -Zellen, in der Petrischale zu züchten, dem Patienten zu transplantieren und die Krankheit damit zu lindern bzw. zu heilen. Die Entdeckung von humanen pluripotenten Stammzellen bildet die

Grundlage dieser Vision, da man aus ihnen theoretisch jeden menschlichen Zelltyp in unbegrenzten Mengen erschaffen kann.

Auch bei einem Myokardinfarkt kommt es zur Degeneration (Nekrose) von kardialen Gewebe infolge einer verminderten Perfusion der Herzkranzgefäße. Ursächlich sind in den meisten Fällen Thromben, die sich an arteriosklerotischen Plaques bilden und Herzgefäße verschließen. Etwa 35% der akuten Myokardinfarkte verlaufen innerhalb der ersten 24 h tödlich, 2009 war dies die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland). Auch wenn der akute Infarkt überlebt wurde, gibt es eine Reihe von möglichen Komplikationen, welche die Lebenserwartung der betroffenen Personen deutlich reduzieren. Vor allem Arrhythmien und Herzinsuffizienz durch Anpassungs-Prozesse (*remodeling*) sind hier zu nennen. In späten Stadien kann betroffenen Patienten nur durch die Transplantation eines Spenderherzens geholfen werden. Da Spenderherzen jedoch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, gibt es eine Reihe experimenteller Ansätze, Infarkt-geschädigte Herzen durch die Applikation von Stammzellen wieder herzustellen (Möllmann et al. 2010; Zimmermann et al. 2004; Zimmermann & Eschenhagen 2007).

Im Tierversuch konnte schon vor einiger Zeit gezeigt werden, dass sich aus embryonalen Stammzellen Kardiomyozyten herstellen lassen und dass sich diese in geschädigte Herzen implantieren lassen (Klug et al. 1996). Diese Transplantation von Zellen führte zu neuen Kardiomyozyten in geschädigtem Gewebe, mit Zell-Zell-Kontakten, elektrischer Kopplung und verbesserter Funktion (Behfar et al. 2007). Mit Kardiomyozyten, welche aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnen wurden, konnte im Infarkt-Modell in der Maus gezeigt werden, dass sich nach Transplantation der Zellen das Infarktgebiet verkleinert, die Vaskularisierung zunimmt und sich die Funktion verbessert (van Laake et al. 2007; Laflamme et al. 2007). Aufgrund dieser positiven, wenn auch nicht unumstrittenen Ergebnisse, wurden auch einige Studien an Menschen durchgeführt. Hier durften allerdings aus Sicherheitsgründen (Teratogenität) keine Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen verwendet werden, sondern hauptsächlich Knochenmarksstammzellen oder Endothel-Vorläuferzellen (*endothelial progenitor cells – EPC*). Die größten Studien sind BOOST, ASTAMI, REPAIR-AMI und LEUVEN-AMI (Übersicht bei Möllmann et al. 2010). Bei diesen Studien wurden also keine Kardiomyozyten transplantiert und es gibt auch keinen

Anhaltspunkt dafür, dass die transplantierten Zellen zu Kardiomyozyten differenzieren. Die Ergebnisse sind daher enttäuschend, auch wenn es insgesamt einen Trend zu einer leichten Verbesserung der gemessenen Parameter (Ejektionsfraktion, enddiastolisches Volumen, Infarktgröße) gibt. Der Mechanismus, wie es zur leichten Verbesserung kommt, bleibt insgesamt unklar.

Verschiedene Mechanismen werden diskutiert, um die positiven Effekte vor allem im Tiermodell zu erklären. Da in keinem Experiment bisher große Mengen an Kardiomyozyten im Infarktgebiet als neue Population zu finden waren, ist die mechanische Leistung der implantierten Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht verantwortlich. Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass parakrine Effekte der neuen Zellen für verminderte Fibrose, vermehrte Vaskularisierung und vermindertes Remodeling verantwortlich sind. So können auch die positiven Effekte nach der Implantation von Knochenmarksstammzellen beim Menschen erklärt werden.

Ein weiterer Ansatz, neue Zellen in ein geschädigtes Herz zu bringen, ist die Verwendung von im Labor gefertigten, künstlichen Herzmuskel-Konstrukten (*engineered heart tissue – EHT*), welche auf die Infarkt Narbe genäht werden können. Der Vorteil besteht darin, dass man bereits *ex vivo* ein kontraktiles Gewebe züchtet (Eschenhagen et al. 1997) und dieses Gewebe wie ein Pflaster genau auf den geschädigten Teil des Herzens aufbringen kann. Im Gegensatz zur Applikation von Zellen in vereinzelter Form kann man Menge und Ausmaß genau bestimmen. Im Tiermodell wurden bereits *proof-of-principle* Versuche durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass EHTs am Herzen anwachsen und die funktionellen Parameter von ischämiegeschädigten Herzen verbessern (Zimmermann, Didié, et al. 2002; Zimmermann et al. 2004; Naito et al. 2006; Zimmermann et al. 2006). Die hier verwendeten EHTs wurden bisher aus neonatalen Kardiomyozyten der Ratte hergestellt. Um diese Ergebnisse also auf den Menschen zu übertragen, muss eine andere Quelle für Zellen gefunden werden. Embryonale Stammzellen, oder auch induziert pluripotente Zellen (iPS) bieten sich hier an, da sie theoretisch in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen, und man Kardiomyozyten aus ihnen gewinnen kann (Kehat et al. 2001; Zwi et al. 2009).

Das wahrscheinlich größte Hindernis für den Einsatz von aus Stammzellen abgeleiteten Zellen ist die Sicherheit. Die Pluripotenz ist in dieser Betrachtung Fluch und Segen zugleich, da sie auch das Risiko für neoplastische Ereignisse birgt (Teratomentwicklung). Es ist daher ein bemerkenswerter Fortschritt, dass die amerikanische FDA (*food and drug administration*) 2010 die Erlaubnis für die erste Studie am Menschen erteilt hat, bei der aus humanen embryonalen Stammzellen gewonnene Zellen zum Einsatz kommen (*GRNOPC1 clinical trial*, Geron Corporation, USA). Die Zellen werden im Labor zu neuronalen Vorläuferzellen differenziert und Menschen injiziert, die kurze Zeit vorher ein Wirbelsäulentrauma erlitten haben und daher querschnittsgelähmt sind. Die Hoffnung ist, dass diese Vorläuferzellen im Rückenmark des Patienten die beschädigten Nervenzellen ersetzen und so die Lähmung teilweise oder ganz aufgehoben werden kann.

1.6 Engineered Heart Tissue – Künstliche Herzgewebe

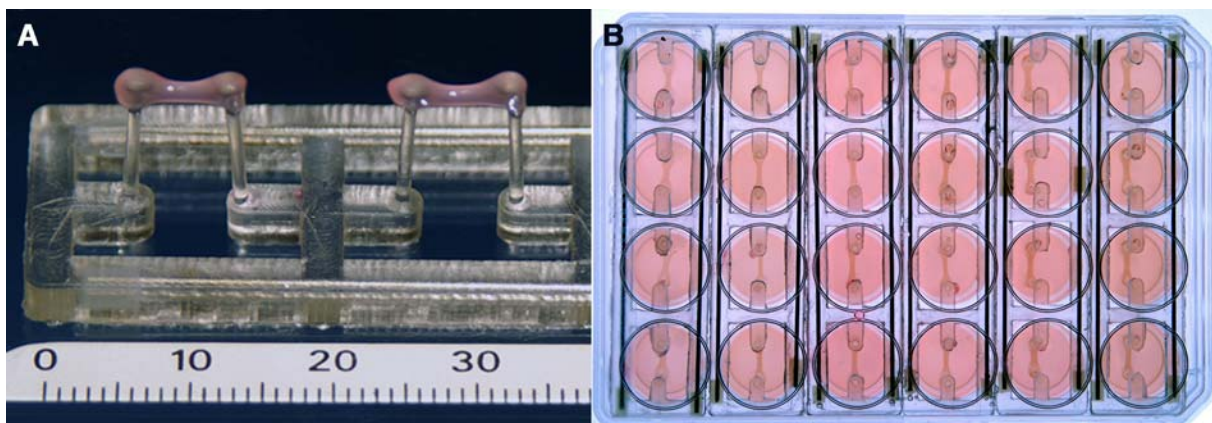


Abbildung 6: (A) Zwei künstliche Herzgewebe (EHTs) zwischen jeweils zwei Silikonstäbchen, (B) Zellkulturplatte mit 24 EHTs von oben (6 Silikonmatten mit jeweils 4 EHTs).

Künstliche Herzgewebe (*engineered heart tissue – EHT*) sind in der Petrischale erzeugte Gewebe von etwa 1 cm Größe, die Eigenschaften vom Myokard besitzen. Sie bestehen aus einer Matrix und den Kardiomyozyten, die sich in der Matrix verteilen und zu einem Netzwerk anwachsen. Ursprünglich wurde Kollagen als Matrix eingesetzt, seit einiger Zeit hat sich aber Fibrin als Matrix durchgesetzt (Hansen et al. 2010). EHTs kontrahieren spontan, reagieren auf sympathische (Isoprenalin) und parasymphatische (Carbachol) Reize, reagieren auf Veränderungen der extrazellulären Calcium-Konzentration und zeigen erhöhte Kraft nach erhöhter Vorspannung (Frank-Starling Mechanismus; Eschenhagen et al. 1997; Zimmermann, K Schneiderbanger, et al. 2002).

Die Fibrin-basierten EHTs werden von unserer Arbeitsgruppe seit einigen Jahren nicht mehr im Ring-Format hergestellt, sondern als Streifen (Abbildung 6). Da sie zusätzlich kleiner sind und so weniger Zellen benötigen, können die Fibrin-basierten EHTs in 24-Well Zellkulturschalen hergestellt und gehalten werden. Es können so relativ große Stückzahlen schnell und einfach hergestellt werden. Zusätzlich ist es möglich, die 24-Well Zellkulturschale automatisiert zu filmen und hierüber die Kontraktilität der EHTs auszuwerten. Dazu wurde ein System entwickelt, welches aus einem kleinen Inkubator besteht, der Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO₂-Gehalt reguliert und mit einem Glasdach versehen ist. Über diesem Glas ist eine Kamera an einem XYZ-Achsensystem aufgehängt, die jedes EHT abfährt und filmt. Eine eigens für dieses System entwickelte Software (CTMV, Pforzheim) übernimmt die Steuerung der Kamera und die Auswertung der Filme. Diese Software arbeitet mit Figur-Erkennung, so dass jedes EHT in Echtzeit ausgewertet werden kann, ohne dass man es in irgendeiner Weise manipulieren oder auch nur anfassen muss (Abbildung 7 C). Da zusätzlich alle Parameter der Silikon-Stäbchen, wie Länge, Stärke und der Youngsche Modul (Elastizitätskoeffizient), bekannt sind, kann aus dem Ausmaß der Deflektion die entwickelte Kraft berechnet werden (siehe auch 2.13). Basierend auf der Darstellung der Kraftentwicklung über der Zeit erfolgt die Berechnung von verschiedenen Parametern, welche die Kontraktionen genau charakterisieren (siehe Kapitel 1.7).

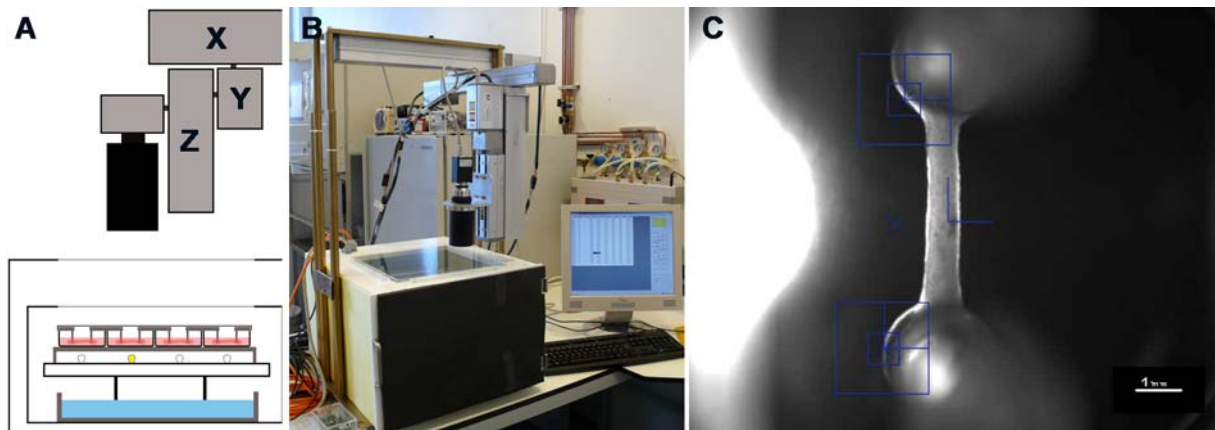


Abbildung 7: (A) Schematische Darstellung der Messanlage, X, Y und Z kennzeichnen die drei Achsen, an die Z-Achse ist die Kamera montiert, (B) Foto der Messanlage, (C) EHT in der Messanlage, in blau die Positionen der automatischen Figurerkennung, Maßstab 1 mm.

Mit diesen EHTs werden zwei Ziele verfolgt. Zum einen der *in vivo* Einsatz auf Infarktgeschädigten Herzen, zum anderen der *in vitro* Einsatz in der prädiktiven Toxikologie und bei der Entwicklung von neuen Arzneimitteln. Für die Implantation werden etwas größere EHTs hergestellt, die direkt auf das Herz von Ratten oder Mäusen genäht werden können. So kann die Verbindung von Kardiomyozyten aus dem EHT mit denen vom Myokard untersucht werden. Weiter fortgeschritten ist die Arbeit zur prädiktiven Toxikologie. Wie bereits erwähnt, wird ein Testsystem benötigt, um das proarrhythmische Potential von Substanzen in einer möglichst frühen Phase der Entwicklung zu bestimmen. Die EHTs können hier einen wertvollen Beitrag leisten, denn sie bieten einige Vorteile gegenüber bisher verwendeten Testsystemen. Sie bestehen aus einem Zellverbund, der auch als Ganzes gemessen und ausgewertet wird. Es wird also nicht nur der direkte Einfluss auf den hERG-Kanal (bzw. dessen α -Untereinheit) gemessen wie im hERG-Kanal Assay, sondern der Einfluss auf das kontraktile Verhalten des gesamten EHTs. Der Einfluss auf alle Ionenkanäle der Kardiomyozyten kann prinzipiell erfasst werden, ebenso wie ein Einfluss auf die elektrische Kopplung der Zellen. Andere, eventuell sogar unbekannte proarrhythmische Wirkmechanismen von Testsubstanzen, können erkannt werden. Im Gegensatz zu Messungen, die auf Tierversuchen basieren (isolierte Purkinje-Fasern vom Kaninchen, Telemetrie an Hunden), stehen EHTs einfach, günstig und in größeren Stückzahlen zur Verfügung, so dass Messungen an 10 oder 20 EHTs parallel möglich sind. Die Auswertung geschieht automatisiert, schnell und einfach, so dass die Messung von vielen biologischen

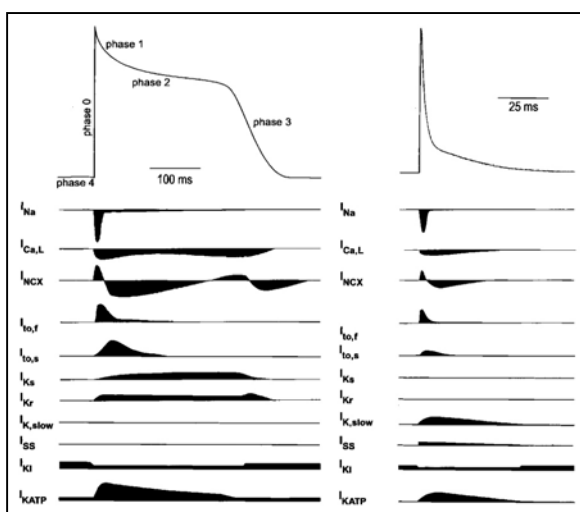


Abbildung 8: Ionenströme im humanen (links) und im murinen (rechts) Arbeitsmyokard (Nerbonne et al. 2001).

Replikaten nur wenig Aufwand bedeutet (Hansen et al. 2010).

Der größte Nachteil ist der verwendete Zelltyp. Neugeborene Ratten wurden bisher als Zellquelle eingesetzt, da sie in großen Stückzahlen zur Verfügung stehen und die Zellen einfach zu präparieren sind. Da sich Mäuse und Ratten jedoch in ihrer Charakteristik der Ionenkanäle vom Menschen unterscheiden (Abbildung 8), läuft man Gefahr, wichtige proarrhythmische

Effekte zu übersehen und dafür andere, irrelevante proarrhythmische Effekte zu detektieren, die im Menschen eventuell keine Rolle spielen. Vor allem die Tatsache, dass bei Mäusen und Ratten weder I_{Kr} noch I_{Ks} Ströme für die Repolarisation zuständig sind, sondern hauptsächlich I_{to} , stellt ein großes Problem dar. Die Beeinflussung genau dieser Ströme hat beim Menschen häufig schwere Arrhythmien zur Folge (Kapitel 1.4).

Hier kommen nun wieder Stammzellen ins Spiel. Da man aus humanen embryonalen Stammzellen Kardiomyozyten herstellen kann, bieten sich diese als Zellquelle für die EHTs an. So können theoretisch toxikologische Untersuchungen am menschlichen Gewebe durchgeführt werden.

1.7 Parameter der automatisierten Messung

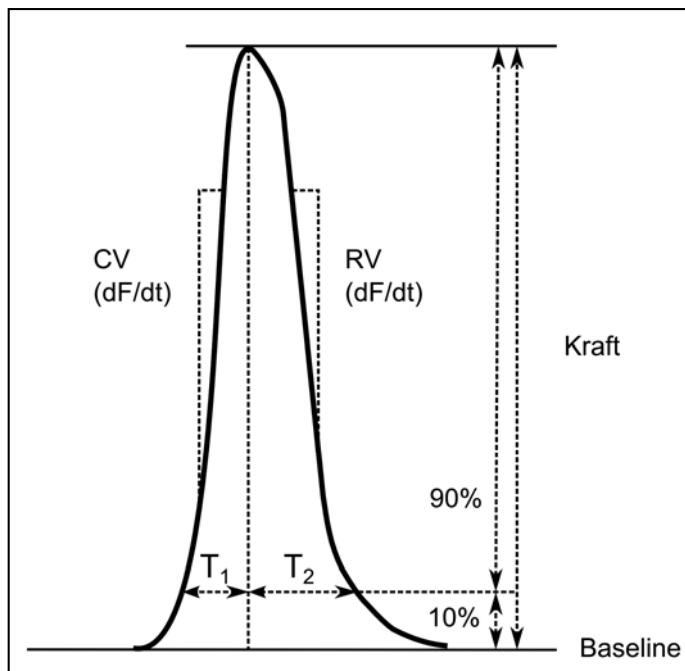


Abbildung 9: (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Parameter, die automatisch errechnet werden, CV= Kontraktionsgeschwindigkeit, RV= Relaxationsgeschwindigkeit, T1= Kontraktionszeit, T2= Relaxationszeit.

Die Messanlage misst die Distanz zwischen zwei automatisch erkannten Positionen im EHT (Abbildung 7 C) über die Zeit und rechnet sie in Kraft um (Formel siehe Kapitel 2.13). Aus diesen Rohdaten kann die Software eine Reihe von weiteren Parametern errechnen, welche die Kontraktionen der EHTs besser beschreiben bzw. überhaupt erst in Zahlen ausdrücken und damit vergleichbar machen. Eine Übersicht über die Parameter ist in Abbildung 9 dargestellt.

1.7.1 Frequenz

Die Frequenz wird als Kontraktionen pro Minute angegeben (*beats per minute* – BPM).

1.7.2 Kraft

Die Kraft ist die Differenz zwischen der Grundlinie und dem Maximum der Kontraktion. Die Kraft wird für jede Kontraktion berechnet, der angegebene Wert ist der Mittelwert. Die Einheit ist mN.

1.7.3 T1 (Kontraktionszeit)

Als Kontraktionszeit wird die Zeit angegeben, die das EHT benötigt, um von 10% der maximalen Kraft vollständig zu kontrahieren. Die Kontraktionszeit wird für jede Kontraktion berechnet, der angegebene Wert ist der Mittelwert. Die Einheit ist ms.

1.7.4 T2 (Relaxationszeit)

Als Relaxationszeit wird die Zeit angegeben, die das EHT braucht, um von der maximalen Kraft auf 10% der maximalen Kraft zu entspannen. Die Relaxationszeit wird für jede Kontraktion berechnet, der angegebene Wert ist der Mittelwert. Die Einheit ist ms.

1.7.5 CV (Kontraktionsgeschwindigkeit)

Die Kontraktionsgeschwindigkeit (*contraction velocity – CV*) ist ein Maß für die Steilheit der Kontraktion. Sie wird errechnet aus der positiven Veränderung der Kraft über der Zeit. Zur Berechnung der Kontraktionsgeschwindigkeit wird die Messung in 30 bis 60 Intervalle eingeteilt und der maximale Wert für jedes Intervall bestimmt. Der angegebene Wert ist der Mittelwert aller Intervalle. Die Einheit ist mN/s.

1.7.6 RV (Relaxationsgeschwindigkeit)

Die Relaxationsgeschwindigkeit (*relaxation velocity – RV*) ist ein Maß für die Steilheit der Relaxation. Sie wird errechnet aus der negativen Veränderung der Kraft über der Zeit. Zur Berechnung der Kontraktionsgeschwindigkeit wird die Messung in 30 bis 60 Intervalle eingeteilt und der maximale Wert für jedes Intervall bestimmt. Der angegebene Wert ist der Mittelwert aller Intervalle. Die Einheit ist mN/s.

1.7.7 CV/RV

Das Verhältnis von Kontraktions- zu Relaxationsgeschwindigkeit ist ein Maß für die Symmetrie einer Kontraktion. Je größer der Wert, desto steiler ist die Kontraktion im Verhältnis zur Relaxation, und desto mehr ist die Kontraktion im Diagramm nach vorne geneigt. Der ausgegebene Wert hat keine Einheit.

1.8 Embryoidkörperchen (EBs)

Embryoidkörperchen (*embryoid bodies* – EBs) sind ein Format zur Differenzierung von embryonalen Stammzellen bzw. pluripotenten Zellen allgemein. Ursprünglich wurden EBs aus pluripotenten Zellen der Maus (Keimzellkarzinom-Zellen oder später murine embryonale Stammzellen) hergestellt (Martin & M J Evans 1975). EBs sind kleine kugelförmige Zellaggregate von unter 100 bis mehreren 1000 Zellen, die sich in Suspension und nicht adhären entwickeln. Daher müssen sie in Zellkulturschalen gehalten werden, welche eine Oberfläche haben, an denen keine Zellen anhaften können (zum Beispiel Petrischalen für die Bakterienkultur oder spezielle Zellkulturschalen mit ultra-niedriger Zelladhäsion). EBs weisen einen gewissen Grad an Organisation auf, die äußeren Zellen haben andere Eigenschaften als die Zellen im Zentrum (Ungrin et al. 2008). Diese dreidimensionale Umgebung soll die embryonale, also die natürliche Umgebung von pluripotenten Zellen nachahmen, und diese so differenzieren lassen. Die zeitliche Abfolge der Differenzierung im EB läuft vergleichbar mit der embryonalen Entwicklung ab, so sind zum Beispiel hämatopoetische Vorläufer oder Vorläufer von Endothelzellen zu ähnlichen Zeitpunkten im EB und im Embryo der Maus nachweisbar (Keller 1995). Die Differenzierung der EBs läuft ungerichtet ab, es entstehen Zellen aus allen drei Keimblättern. Die Differenzierung im EB-Format kann mit Wachstumsfaktoren beeinflusst werden, daher sind EBs eine Voraussetzung für zahlreiche Differenzierungsprotokolle.

1.9 Kardiomyozyten aus Stammzellen

Um aus humanen embryonalen Stammzellen Kardiomyozyten zu differenzieren, wurden verschiedene Protokolle entwickelt. Das älteste Protokoll sieht die Differenzierung über Embryoidkörperchen (*embryoid bodies* – EBs) vor, zusammen mit ausgewählten Chargen von fetalem Kälberserum (Kehat et al. 2001). Auf diese Weise konnten in 8,1% der EBs spontan kontrahierende Bereiche beobachtet werden. Durch die spontane und ungerichtete Differenzierung in diesem Protokoll sind die Voraussetzungen, die eine Zelle in die kardiale Richtung differenzieren lassen, nur selten gegeben. In Co-Kultur mit endodermalen END2-Zellen, bzw. mit END2-konditioniertem Medium, konnten 30% schlagende EBs beobachtet werden (Mummery et al. 2003; X. Q. Xu et al. 2008). Ein anderer Ansatz zeigt die Differenzierung von hESC als Zellschicht anhand der Wachstumsfaktoren Activin A und BMP-4 (*bone morphogenic protein 4*). Über 30% der Zellen entwickelten sich zu

Kardiomyozyten (Laflamme et al. 2007). Das am weitesten entwickelte Protokoll setzt wieder EBs voraus, welche in drei Stufen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren behandelt werden (Yang et al. 2008; Kattman et al. 2011). Die Zusammensetzung dieser Wachstumsfaktoren und deren zeitliche Abfolge basiert auf den Erkenntnissen, welche Wachstumsfaktoren in der frühen Embryonalentwicklung von Bedeutung sind. Durch embryologische Untersuchungen, vor allem an Maus und Zebrafisch, kann ein recht genaues Bild gezeichnet werden, welche Faktoren und Signalwege für frühe kardiale Entwicklung *in vivo* verantwortlich sind (Abbildung 10). Es ist nicht überraschend, dass das Protokoll, welches sich an der natürlichen Entwicklung der Zellen orientiert, die höchste Anzahl an Kardiomyozyten generiert. Das Ergebnis sind Zellpopulationen mit einem Anteil von 40-50% an Kardiomyozyten.

Zellsystem	Autor	Prinzip	Ergebnis
EBs	Kehat et al. 2001	Ausgewählte Chargen FCS	8,1% kontrahierende EBs
Zellschicht	Mummery et al. 2003	Co-Kultur mit END2-Zellen	Kontrahierende Zellaggregate in 35% der Wells (12-Well Format)
EBs	Xu et al. 2008	END2-konditioniertes Medium	Über 60% kontrahierende EBs
Zellschicht	Laflamme et al. 2007	Activin A und BMP-4	Über 30% Kardiomyozyten
EBs	Yang et al. 2008 Kattman et al. 2011	Wachstumsfaktoren in 3 Stufen (Activin A, BMP-4, FGF-2, DKK-1, VEGF)	40-50% Kardiomyozyten

Tabelle 3: Übersicht über verschiedene Protokolle zur kardialen Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen.

Für die frühe Entwicklung der Zellen in die mesodermale Richtung und für die spätere Entwicklung in kardiale Zellen sind insbesondere die Signalwege um Proteine der TGF- β Superfamilie Activin A und BMP-4 (*bone morphogenetic protein 4*) und um Proteine der WNT-Familie wichtig. Der erste Schritt der kardialen Differenzierung ist das Mesoderm. *In vivo* bildet sich aus der Blastozyste vor der Gastrulation eine *primitive streak (PS)* genannte Population aus. Signale der TGF- β Superfamilie, speziell Activin A und BMP-4 induzieren diesen Schritt. Ebenfalls wichtig für die mesodermale Differenzierung sind WNT/ β -Catenin Signale, vor allem die über WNT3A induzierte kanonische WNT-Signalkaskade. Aus dieser mesodermalen, Brachyury-positiven Population entwickeln sich nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch die Zellen der hämatopoetischen Linie. Hier sind wieder WNTs involviert, und zwar führt eine Aktivierung der WNT-Signale zur Differenzierung in hämatopoetische Zellen. Auf die Entwicklung von Kardiomyozyten bezogen bedeutet dies, dass WNT eine biphasische Rolle spielt. Für die frühe mesodermale Entwicklung ist WNT notwendig, die spätere kardiale Entwicklung verhindert es. Um dieser Tatsache *in vitro* Rechnung zu tragen, kann der

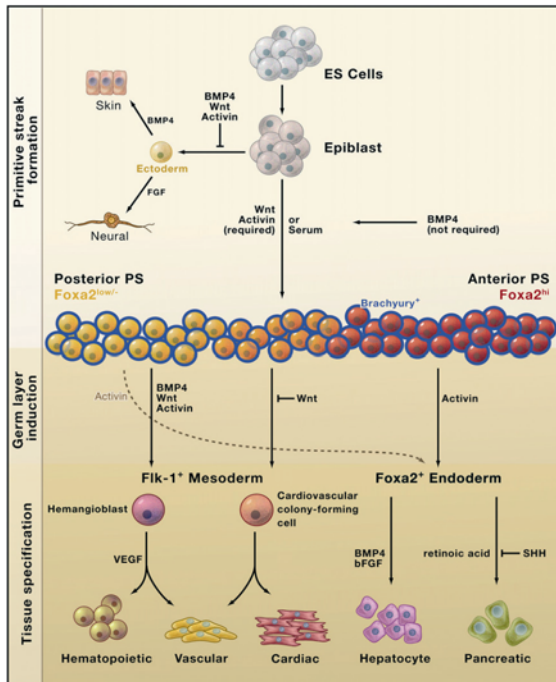


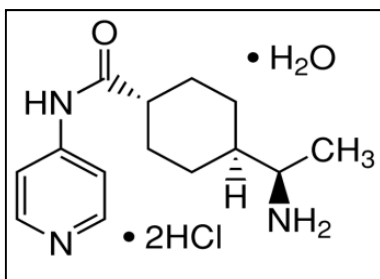
Abbildung 10: Übersicht über die Differenzierung von embryonalen Stammzellen (Murry & Keller 2008).

WNT-Signalweg mit dem Protein DKK-1 (Dickkopf) blockiert werden (Yang et al. 2008; Murry & Keller 2008; Kattman et al. 2007).

Wichtige Zwischenstufen bei der kardialen Differenzierung sind also Brachyury-positive Zellen, die das Mesoderm bzw. die *primitive streak* Population widerspiegeln. Kurz darauf entwickeln sich daraus Zellen, die den VEGF-Rezeptor (*vascular endothelial growth factor receptor*, KDR) und den PDGF-Rezeptor (*platelet derived growth factor receptor*, PDGFR2) exprimieren. Diese gelten als frühe kardiale Vorläufer (Murry & Keller 2008; Kattman et al. 2011). Im weiteren Verlauf der

Differenzierung können dann kardial-spezifische Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden wie der *homeodomain*-Faktor NKX2-5 (CSX), der *zinc-finger* Transkriptionsfaktor *GATA binding protein 4* (GATA4) und die T-box Faktoren TBX-5 (TBX5) und Isl-1 (ISL1). Kardiomyozyten erkennt man auf molekularbiologischer Ebene unter anderem an der Expression von sarkomerischen Proteinen wie α -MHC (MYH6, *myosin heavy chain, alpha*), β -MHC (MYH7, *myosin heavy chain, beta*) oder den kardialen Troponinen T und I (cTNT/ TNNT2, cTNI/ TNNI3).

1.10 Y-27632



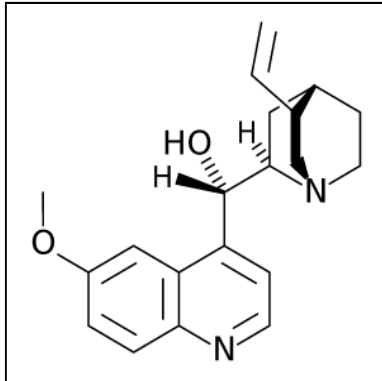
Y-27632 ist ein spezifischer Inhibitor der Rho assoziierten *coiled coil* Kinasen ROCK-I und ROCK-II. Da Rho eine Schlüsselrolle in Signalkaskaden von vielen verschiedenen Zelltypen einnimmt, wurden zahlreiche Versuche zu den Effekten von Y-27632 unternommen (Ishizaki et al. 2000).

Vor allem bestimmte Subtypen der Apoptose scheinen über Rho-Signalwege reguliert zu sein, darunter die Anoikis genannte Apoptose, die Zellen nach Vereinzeln untergehen lässt. Anoikis spielt auch bei humanen embryonalen Stammzellen eine Rolle, denn diese Zellen reagieren sehr empfindlich auf Vereinzeln, was ein Problem bei bestimmten

Zellkulturtechniken darstellt. Speziell dieser Vorgang kann bei hESCs mit Y-27632 inhibiert werden, so dass eine wesentlich verbesserte Überlebensrate der hESC nach Vereinzlung die Folge ist (Watanabe et al. 2007).

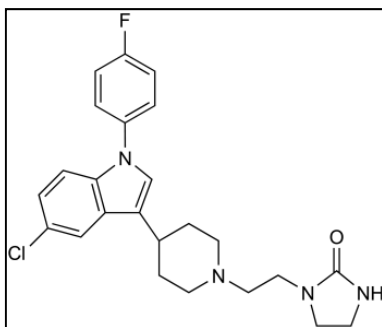
1.11 Charakterisierung der getesteten Substanzen

1.11.1 Chinidin



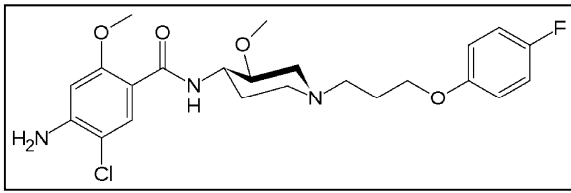
Ursprünglich wurde Chinidin (und Chinin) in der Rinde des Chinarindenbaums nachgewiesen, auch heute wird es noch daraus gewonnen und zusätzlich semi-synthetisch aus Chinin hergestellt. Chinidin ist ein Klasse Ia Antiarrhythmikum (Natriumkanalblocker) und eine extrem unspezifische Substanz (*dirty drug*). Neben Natrium-Kanälen besitzt Chinidin eine Affinität zu Calcium-Kanälen, zu Acetylcholinrezeptoren und zum hERG-Kanal ($IC_{50} = 0,49 \mu M$). Therapeutische Plasmakonzentrationen liegen zwischen 5 und 10 μM , Symptome der Intoxikation fangen bei etwa 20 μM an (Redfern et al. 2003). Damit ist die therapeutische Breite sehr gering, Chinidin wird aus diesem Grund kaum noch eingesetzt.

1.11.2 Sertindol



Sertindol gehört in die Gruppe der atypischen Neuroleptika. Es zeigt Affinitäten zum D_2 , $5-HT_2$ und α_1 Rezeptor. Dieser Arzneistoff wurde kurz nach Markteinführung wieder zurückgezogen, da er Herzrhythmusstörungen verursacht. Inzwischen wurde Sertindol als Medikation der zweiten Wahl wieder zugelassen. Mit einer IC_{50} von 14 nM ist Sertindol ein potenter Inhibitor des hERG-Kanals, die therapeutische Konzentration an freiem Sertindol liegt unter 1 nM (Rampe et al. 1998; S. L. Wong et al. 1997).

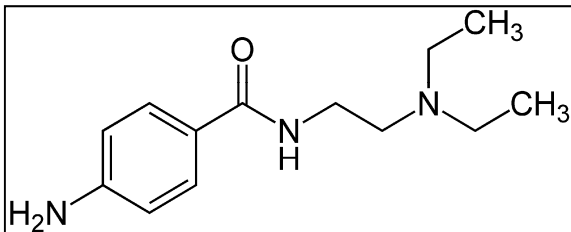
1.11.3 Cisaprid



Cisaprid gehört in die Gruppe der Prokinetika. Es ist ein Agonist am 5-HT₄ Rezeptor (IC₅₀= 52 nM) und ein Antagonist am 5-HT₃ Rezeptor (Taniyama et al. 1991). Die

IC₅₀(hERG) wird mit 9,4 nM angegeben, damit ist auch Cisaprid ein sehr potenter Inhibitor des I_{Kr} (Toga et al. 2007). Cisaprid (Propulsin®, Alimix®) wurde im Juni 2000 wegen des Risikos von Herzrhythmusstörungen mit tödlichem Ausgang vom Markt genommen.

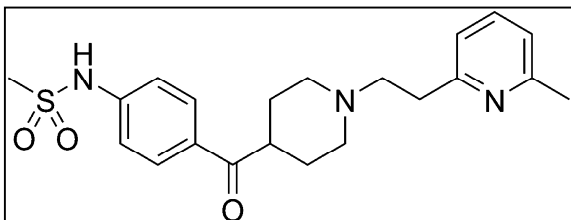
1.11.4 Procainamid



Procainamid ist ein Antiarrhythmikum der Klasse 1A, also ein Natriumkanalblocker. Im Gegensatz zu den USA ist es in Europa nicht mehr im Handel. Die Affinität zum hERG-Kanal wird mit einer IC₅₀ von 139 µM angegeben, die

therapeutische Plasmakonzentration liegt bei 17 bis 35 µM (Ridley et al. 2003).

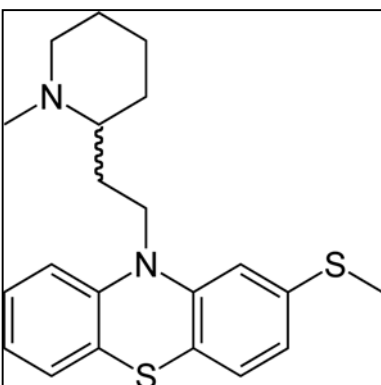
1.11.5 E-4031



E-4031 blockiert selektiv den hERG-Kanal (I_{Kr}) und wird daher bei Untersuchungen im Labor als Referenz eingesetzt. Mit einer IC₅₀ (hERG-Kanal) von 7,7 nM ist diese Substanz

ein potenter Inhibitor des I_{Kr} (Zhou et al. 1998). Ursprünglich wurde E-4031 als Klasse III Antiarrhythmikum konzipiert, aber klinisch nie eingesetzt.

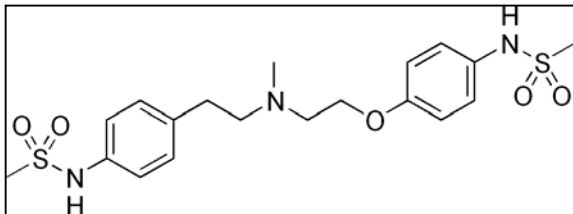
1.11.6 Thioridazin



Thioridazin gehört zur Gruppe der klassischen Neuroleptika mit mittlerer Wirkstärke und gilt als unspezifische Substanz mit zahlreichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Es wurden Affinitäten zu adrenergen Rezeptoren (α₁), zu Dopamin und Serotonin (5-HT₂) Rezeptoren, zu muskarinischen Acetylcholin Rezeptoren (M₁) und zu Histamin (H₁) Rezeptoren festgestellt. Die IC₅₀(hERG) liegt

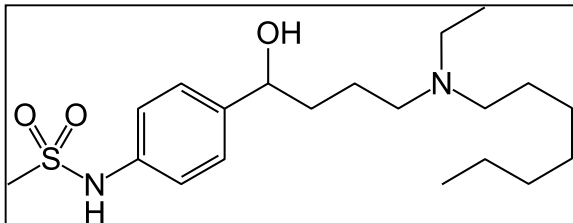
laut Redfern und Kollegen bei einer Konzentration von 30 nM (Redfern et al. 2003). Andere Gruppen geben deutlich andere Werte an, so liegen die $IC_{50}(hERG)$ laut Drolet und Kollegen bei 1,25 μM und nach Tie und Kollegen bei 1,07 μM (Drolet et al. 1999; Tie et al. 2000; Pacher & Kecskemeti 2004). Thioridazin ist in Deutschland im Handel.

1.11.7 Dofetilid



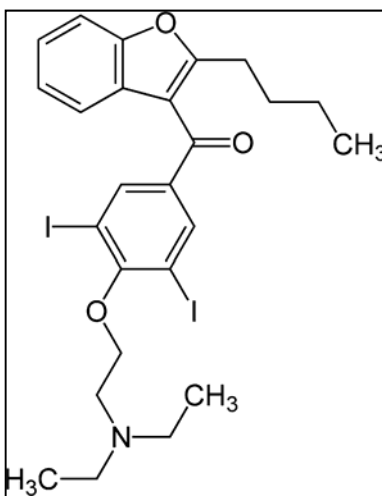
Dofetilid ist ein Antiarrhythmikum der Klasse III nach Vaughan/Williams und führt zu einer Verlängerung der QT-Zeit. Es blockiert spezifisch den hERG-Kanal und damit den repolarisierenden Kaliumstrom I_{Kr} . Die $IC_{50}(hERG)$ liegt bei einer Konzentration von 3 nM (Redfern et al. 2003). Dofetilid ist in Deutschland nicht zugelassen.

1.11.8 Ibutilid



Ibutilid ist ein Antiarrhythmikum der Klasse III nach Vaughan/Williams und führt zu einer Verlängerung der QT-Zeit. Es blockiert spezifisch den hERG-Kanal und damit den repolarisierenden Kaliumstrom I_{Kr} . Die $IC_{50}(hERG)$ liegt bei einer Konzentration von 10 nM (Redfern et al. 2003). Ibutilid ist in Deutschland nicht zugelassen.

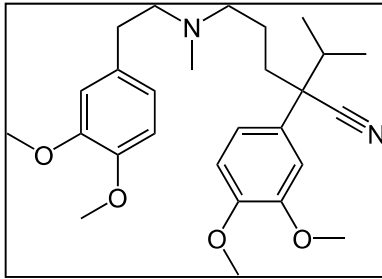
1.11.9 Amiodaron



Amiodaron wird zu den Antiarrhythmika der Klasse III nach Vaughan/Williams gezählt. Neben der Blockade von Kaliumkanälen, welche für die Aktionspotential-verlängernde Wirkung verantwortlich ist, zeigt Amiodaron auch eine Affinität zu zahlreichen anderen Strukturen, darunter Natrium-Kanäle, Calcium-Kanäle und α - und β -adrenerge Rezeptoren („Klasse I bis IV Antiarrhythmikum“). Bemerkenswert ist die lange Halbwertszeit, die durch Anreicherung im Fettgewebe weit über 100 Tage betragen

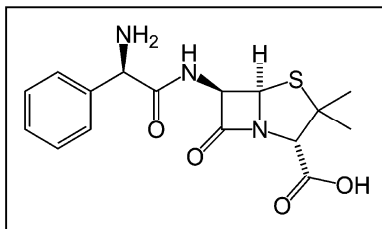
kann. Die $IC_{50}(hERG)$ liegt bei ca. 1 μM (Redfern et al. 2003).

1.11.10 Verapamil



Verapamil ist ein Calciumkanalblocker und wird zur Klasse IV der Antiarrhythmika nach Vaughan/Williams gezählt. Es blockiert hauptsächlich L-Typ Calcium-Kanäle und wirkt so *in vivo* vor allem auf Strukturen mit Calcium-getragenen Aktionspotentialen, wie Sinus- und AV-Knoten. Es besitzt aber auch eine negativ inotrope Wirkung. Die IC_{50} (hERG) liegt bei ca. 200 nM (Redfern et al. 2003).

1.11.11 Ampicillin



Das β -Lactam Antibiotikum Ampicillin dient in diesen Versuchen als Negativkontrolle. Es wird nicht mit Störungen des Herzrhythmus oder Ähnlichem in Verbindung gebracht.

Substanz	Ziel	IC_{50}/EC_{50}	IC_{50} (hERG)	Quelle
Chinidin	Natriumkanäle	1-3 μ M*	490 nM	(Redfern et al. 2003)
Sertindol	D ₂	0,45-7,4 nM	14 nM	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (Rampe et al. 1998) (S. L. Wong et al. 1997)
	5-HT ₂	0,2-0,85 nM		
	α_1	0,33-3,4 nM		
Cisaprid	5-HT ₄	Ca. 15 nM	9,4 nM	(Brattelid et al. 2004) (Toga et al. 2007)
Procainamid	Natriumkanäle	811 μ M	139 μ M	(Sheldon et al. 1987)
E-4031	hERG	-	7,7 nM	(Zhou et al. 1998)
Thioridazin	5-HT ₂	18-60 nM	33,2 nM 1,07 μ M 1,25 μ M	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (Pacher & Kecskemeti 2004)
	D ₁	17-80 nM		
	D ₂	2,8-60 nM		
	α_1	17-65 nM		
	H ₁	99 nM		
	M ₁	2-106 nM		
Dofetilid	hERG	-	3 nM	(Redfern et al. 2003)
Ibutilid	hERG	-	10 nM	(Redfern et al. 2003)
Amiodaron	hERG, α , β , Ca ²⁺	0,3-1 nM*	1 μ M	(Redfern et al. 2003)
Verapamil	L-Typ Calciumkanal	30-100 nM*	200 nM	(Redfern et al. 2003)
Ampicillin	Transpeptidase	-	-	-

Tabelle 4: Übersicht über die Eigenschaften der in dieser Arbeit getesteten Substanzen. Ziel beschreibt das primäre pharmakologische Ziel, IC_{50}/EC_{50} die dazugehörige mittlere inhibitorische bzw. mittlere effektive Konzentration, *= therapeutische Konzentration.

1.12 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, künstliche Herzgewebe aus humanen Zellen herzustellen, diese zu charakterisieren und auf ihre Eignung in einem Assay für Kardiotoxizität zu testen. Idealerweise können so in Zukunft Aussagen über die zu erwartenden unerwünschten Wirkungen von Substanzen getroffen werden, die noch in der Entwicklung sind.

Um dieses Ziel zu erreichen, mussten im ersten Schritt Protokolle zur Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen in Kardiomyozyten etabliert werden. Diese Protokolle mussten so effektiv sein, dass die Ausbeute und der prozentuale Anteil an humanen Kardiomyozyten ausreichend sind, um daraus humane EHTs herzustellen. Nach der Charakterisierung konnte dann der Einfluss von proarrhythmischen Substanzen getestet werden. Es sollte erarbeitet werden, welche Parameter sich unter diesem Einfluss verändern, wie man diese auswerten kann und welche ausschlaggebend sind. Als Vergleich sollten die aus hERG-Kanal Assays bekannten IC_{50} Werte dienen.

2 Material und Methoden

Eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Materialien, Substanzen und Geräte mit Angaben von Herstellern und Katalognummern ist im Anhang (Kapitel 8.2) zu finden. Dort sind auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien für die Zellkultur beschrieben.

2.1 Humane embryonale Stammzellen

Für diese Arbeit wurden hauptsächlich humane embryonale Stammzellen der Linie hES2.R26 verwendet (Irion et al. 2007). Weitere Linien, mit denen Experimente durchgeführt wurden, sind hES2 (Reubinoff et al. 2000), H1, H7 und H9. Die Linie hES2 wurde in Singapur hergestellt (ES Cell International Pte Ltd., Singapur), die Linien H1, H7 und H9 (Thomson et al. 1998) in den USA (National Stem Cell Bank, WiCell Research Institute). Die Einfuhr und alle Arbeiten mit humanen embryonalen Stammzellen wurden gemäß den deutschen Gesetzen beantragt und genehmigt (36. Genehmigung des RKI vom 20.01.2009, Erweiterung der Genehmigung am 02.03.2009, AZ 1710-79-1-4-39 01/09).

Die Linie hES2.R26 ist eine genetisch modifizierte Zelllinie. Sie ist für das Einbringen von Genen per Cre-Rekombinase vorbereitet und enthält daher ein mit loxP-Sequenzen markiertes RFP-Gen (*red fluorescent protein*) im ROSA26 Lokus (Irion et al. 2007). Für die Verwendung der Zelllinie im Rahmen dieser Arbeit war diese Modifikation nicht von Bedeutung.

2.2 Zellkultur Stammzellen

Für die Zellkultur der hESCs als Kokultur auf einem *feeder layer* wurden embryonale Fibroblasten aus Mäusen (*mouse embryonic fibroblasts* – MEF, Stamm CF-1) in Passage 3 mit Mitomycin C (10 µg/ml, 2,5 h) mitotisch inaktiviert und in einer Konzentration von 20000/cm² ausgesät. Nach 24 h konnten die hESCs auf die angewachsene Zellschicht gebracht werden und mit hESC Medium versorgt werden.

Für die Zellkultur der hESCs ohne murine Fibroblasten (C. Xu et al. 2001) wurden die Zellkulturschalen mindestens 30 min vor der Passage mit Matrigel™ beschichtet. Das Matrigel™ wurde dazu auf Eis aufgetaut und 1:60 in DMEM/F-12 verdünnt. In jedes Well (ca.

10 cm²) wurde 1 ml pipettiert, verteilt und in einen Inkubator mit 37° C gestellt. Nach etwa 30 min hat sich auf dem Kunststoff ein Matrigel™-Film gebildet. Die Stammzellen wuchsen dann direkt auf der beschichteten Zellkulturschale und wurden mit konditioniertem Medium (CM, siehe Kapitel 2.2.1) versorgt.

Bei beiden Methoden wurde das Medium täglich gewechselt (2,5 ml pro Well im 6-Well Format). Die Zellen sollten auf keinen Fall komplett konfluent wachsen, da sie in diesem Fall anfangen spontan zu differenzieren. Für die Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Kollagenase (1 mg/ml) für 5 bis 20 min inkubiert, bis die Ränder der Kolonien anfangen sich abzulösen. Danach wurde wieder vorsichtig mit PBS gewaschen, die Zellen mit 2 ml konditioniertem Medium versetzt und mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst. Die Fragmente wurden durch Trituration auf eine geeignete Größe zerkleinert und auf mit Matrigel™ beschichtete Zellkulturschalen bzw. auf die mit inaktivierten MEFs bewachsenen Zellkulturschalen verteilt. Passagiert wurde im Verhältnis 1:2 bis 1:6. Die Zellen der Linie hES2 wurden während der ersten 24 h nach der Passage mit Y-27632 (10 µM) versetzt.

2.2.1 Konditioniertes Medium (CM)

Embryonale Fibroblasten aus Mäusen (Stamm: CF-1) wurden in Passage 3 mit Mitomycin C (10 µg/ml, 2,5 h) mitotisch inaktiviert, mit Trypsin von der Oberfläche abgelöst, gezählt und in einer Konzentration von 60000/cm² ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen täglich mit 70 ml hESC Medium pro T175 Zellkulturflasche versorgt, wobei das alte (konditionierte) Medium in 50 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und bei -80° C eingefroren wurde. Je nach Bedarf wurde Medium aufgetaut, mit zusätzlich 5 ng/ml FGF2 versetzt und mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

Für die Kultur der Zelllinie hES-2 wurden zusätzlich 10 ng/ml FGF2 zugesetzt. Außerdem wurde das Medium nach der Passage für die ersten 24 h mit Y-27632 (10 µM) versetzt.

2.3 Embryoidkörperchen (EBs)

Die Ausarbeitung eines Protokolls zur Herstellung von EBs war ein wichtiger Teil dieser Arbeit und ist daher bei den Ergebnissen (Kapitel 3.2) zu finden.

2.4 Differenzierung von hESC in Kardiomyozyten

Die Ausarbeitung eines Protokolls zur Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen in Kardiomyozyten war ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit und ist daher bei den Ergebnissen (Kapitel 3.3) zu finden.

2.5 RNA Präparation und Quantitative Real-Time PCR

Als Probe für die Gewinnung von RNA wurden 200 bis 500 μ l von der EB Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (200 g, 2 min). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet im Lysis-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) aufgenommen und eingefroren bei -80° C. Um RNA Proben aus EHTs zu gewinnen, wurde das EHT in 350 μ l Lysis-Puffer aufgelöst. Um die großen Proteinmengen der Fibrinmatrix zu entfernen, wurde 20 μ l Proteinase K zugesetzt und solange bei 56° C unter Bewegung (350 RPM) inkubiert, bis keine Reste vom EHT mehr zu erkennen waren. Direkt vor der weiteren Aufarbeitung wurde ein zweiter Proteinase K Verdau durchgeführt, es wurden 10 μ l zugesetzt und für 10 min inkubiert (56° C, Schüttler 350 RPM). Alle Proben wurden eingefroren und alle Proben für einen Lauf wurden gleichzeitig aufgearbeitet. Die RNA wurden aus den Proben mit dem RNeasy Kit (Qiagen) gemäß der Anleitung gewonnen und aufgereinigt. Eluiert wurde mit 30 μ l Wasser. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde per NanoDrop Spektrophotometer bestimmt. Es wurden entweder 200 oder 500 ng RNA in cDNA mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) umgeschrieben. Die qPCR wurde mit SYBR-Green (Fermentas) gemäß der Anleitung in 10 μ l Ansätzen durchgeführt, jede Probe wurde dreifach bestimmt. Die Triplikate wurden manuell geprüft und Ausreißer (Abweichungen von über einem CT Wert) von der Auswertung ausgeschlossen. Das Referenz-Transkript war in allen Versuchen Glucuronidase-beta (GUSB). Zur Auswertung wurde erst der Δ CT-Wert berechnet, also die Differenz zwischen dem CT-Wert des Ziel-Gens und des Referenz-Gens (GUSB). Dann wurde der $\Delta\Delta$ CT-Wert berechnet, also die Differenz vom Δ CT-Wert der Probe und eine Kontrolle. Die Kontrollen waren in allen Untersuchungen die undifferenzierten Stammzellen (=d0). Aus dem $\Delta\Delta$ CT-Wert wurde schließlich der Faktor (F) der Veränderung nach folgender Formel berechnet:

$$F = 2^{\Delta\Delta CT}$$

Für diese Formel wurde eine perfekte Amplifikation um den Faktor 2 in jedem Zyklus vorausgesetzt. Die Messung wurde an einem AbiPrism7000HT durchgeführt. Amplifiziert wurde über 40 Zyklen, CT-Werte von 35 oder höher wurden gleich 35 gesetzt (*cut-off*). Zur Qualitätskontrolle wurden nach der Amplifikation Schmelzkurven erstellt.

2.6 Sequenzierung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung wurden die Ansätze der qPCR nach dem Lauf direkt mit Ladebuffer (6x Puffer: 30% Glycerol; 0,25% Bromphenolblau; Wasser) versetzt, über ein Agarose-Gel (1%) aufgereinigt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert. Reinheit und Menge der DNA wurden per NanoDrop® bestimmt. Für die Sequenzierung wurden die Proben an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

2.7 Immunfluoreszenz

2.7.1 Zellkultur

Die Zellen wuchsen entweder auf Objektträgern mit Zellkulturkammer (*chamberslide*) oder auf Gelatine-beschichteten Deckgläschen. Dazu wurden die Deckgläschen für eine Stunde mit 0,1%iger Gelatine-Lösung bei 37° C inkubiert und abgesaugt, bevor die Zellen ausgesät wurden. Die angewachsenen Zellen wurden mit Formaldehyd-Lösung (Histofix®) für 10 min fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h mit Blockierlösung bei Raumtemperatur behandelt. Der erste Antikörper, in Antikörperlösung verdünnt, wurde 2 h lang auf den Proben gelassen, danach wurde dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Der zweite Antikörper wurde ebenfalls in Antikörperlösung verdünnt, gegebenenfalls mit DRAQ5®, DAPI bzw. Phalloidin-Alexa 488 versetzt und für 1 h auf den Proben gelassen. Danach wurden die Proben dreimal für 10 min gewaschen und mit FluoroMount-G zum Betrachten fixiert.

2.7.2 EHTs

Die EHTs wurden mit Formaldehyd-Lösung (Histofix®) über Nacht fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend für mindestens 6 h blockiert. Der erste Antikörper, in Antikörperlösung verdünnt, wurde über Nacht auf den Proben gelassen. Danach wurde mit PBS über Nacht gewaschen, wobei das PBS in der ersten Stunde mehrmals gewechselt wurde. Der zweite Antikörper wurde ebenfalls in Antikörperlösung verdünnt, gegebenenfalls mit DRAQ5®, DAPI bzw. Phalloidin-Alexa 488 versetzt und über Nacht auf den Proben gelassen. Abschließend

wurde wieder mit PBS über Nacht gewaschen. Alle Inkubationen über Nacht erfolgten bei 4° C. Zum Betrachten wurden die EHTs auf Objektträger mit Vertiefung transferiert, mit PBS überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Alle Bilder wurden mit einem Zeiss LSM 510 Meta aufgenommen.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Alpha Aktinin	1:800	Goat-anti-mouse Alexa-488	1:800
Troponin T	1:25	Goat-anti-mouse Alexa-546	1:800
Vimentin	1:50	Goat-anti-rabbit Alexa-488	1:800
Connexin-43	1:250	Goat-anti-rabbit Alexa-546	1:800
Oct-4	1:200	Goat-anti-rat NL-557	1:200
		Phalloidin-Alexa-488	1:60
		DRAQ5	1:1000

Tabelle 5: Übersicht über die Konzentrationen der Antikörper für die Immunfluoreszenz, weitere Informationen zu den Antikörpern unter 8.3.4.

2.8 Histologie

Die EHTs wurden mit Formalin (Histofix®) über Nacht bei 4° C fixiert, danach gewaschen und von den Stäbchen entfernt. Zur besseren Ausrichtung der EHTs im Paraffinblock wurden sie in Agarose eingegossen. Entwässerung, Einbetten in Paraffin und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE) wurden gemäß von Standard-Protokollen vom Institut für Neuropathologie am UKE durchgeführt.

2.9 Dissoziation der EBs

Die Ausarbeitung eines Protokolls zur Dissoziation der EBs war wichtiger Bestandteil dieser Arbeit und ist daher bei den Ergebnissen (Kapitel 3.5) zu finden.

2.10 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Die EBs wurden wie oben beschrieben in einzelne Zellen dissoziiert. Die Zellen wurden fixiert und permeabilisiert mit BD Cytofix/ Cytoperm™ Lösung für intrazelluläre FACS Analyse (BD Biosciences 554722), dann mit Blockierlösung inkubiert. Die Färbung wurde durchgeführt mit einem anti- α -Aktinin Antikörper (1:800) als primärem Antikörper und Alexa fluor® 488 (1:400, Goat-anti-mouse) als sekundärem Antikörper in Antikörperlösung. Die Daten wurden an einem BD FACSCanto II Flow Cytometer gewonnen, und mit der BD FACSDiva Software 6.0 analysiert.

2.11 Engineered Heart Tissue (EHT)

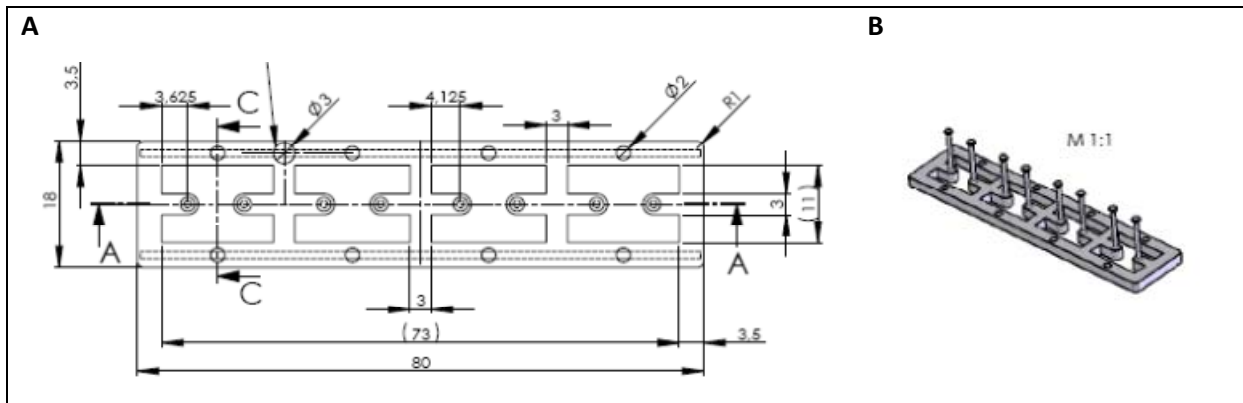


Abbildung 11: (A) Schematische Darstellung der Geometrie der Silikonhalterungen (Angaben in mm), (B) Silikonhalterung von der Seite dargestellt (Quelle: Siltec GmbH & Co. KG 2009).

EBs wurden an Tag 15 bis 20 wie oben beschrieben in einzelne Zellen dissoziiert. Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von 6×10^5 Zellen pro $90 \mu\text{l}$ eingestellt und mit bovinem Fibrinogen (5 mg/ml), Aprotinin (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Matrigel (100 $\mu\text{l}/\text{ml}$) und Y-27632 (10 mM) versetzt. DMEM (2x konzentriert) wurde in gleicher Menge hinzugefügt um die Zellsuspension isotonisch zu halten. Die Gussformen wurden mit Hilfe von Positiv-Formen aus Teflon hergestellt. Dazu wurden die Teflon-Formen in eine 24-Well Zellkulturschale platziert und 1,6 ml einer Agarose-Lösung (2% in PBS) wurden in die Wells gegeben. Nach dem Aushärten der Agarose wurden die Teflon-Formen entfernt, um so eine Negativ-Gussform aus Agarose mit den Ausmaßen 12x3x4 mm freizugeben. Als nächstes wurden die Silikonmatten (Abbildung 11) mit den Silikonstäbchen so platziert, dass jeweils zwei Stäbchen in die Gussformen ragten. Die Zellsuspension wurde vor dem Gießen mit 3 μl Thrombin versetzt, dann wurden pro EHT 100 μl (entsprechend 6×10^5 Zellen) in jede Gussform pipettiert (Abbildung 12).

Für die Polymerisation wurden die Konstrukte für 2 h in einen Inkubator gestellt, außerdem wurden 300 μl EHT Medium auf jedes Konstrukt gegeben, um sie später besser aus der Gussform lösen zu können. Die ausgehärteten Konstrukte wurden mit den Silikonmatten aus der Gussform herausgezogen, in eine neue 24-Well Zellkulturschale platziert und mit 1,5 ml EHT Medium versorgt. Der Inkubator war auf 40% Sauerstoff, 7% Kohlendioxid und 95% Luftfeuchtigkeit eingestellt. Das Medium wurde jeweils montags, mittwochs und freitags gewechselt. Y-27632 (10 μM) wurde dem Medium während der ersten 24 h zugesetzt. Die Silikonmatten wurden von Jäger Gummi und Kunststoff GmbH & Co. KG und Siltec GmbH hergestellt (Hansen et al. 2010).

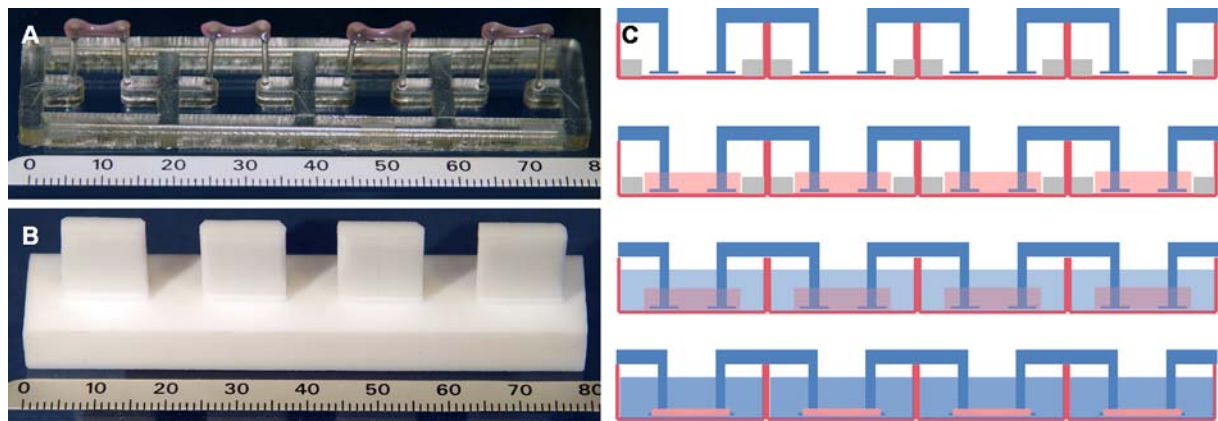


Abbildung 12: (A) EHTs zwischen Silikonstäbchen, (B) Teflon-Formen, (C) Schematische Darstellung der EHT-Herstellung. Erste Reihe: Agarose-Gussformen (grau) mit Silikon-Matten und Stäbchen, die in die Gussformen reichen. Zweite Reihe: Der Mastermix wurde in die Gussformen pipettiert. Dritte Reihe: Die Silikonstäbchen waren nun im polymerisierten Fibrin verankert und das Konstrukt konnte in eine neue Zellkulturschale überführt werden und mit Medium versorgt werden. Vierte Reihe: Nach etwa zehn Tagen ist der Fibrinblock zu einem Streifen aus künstlichem Gewebe kondensiert.

2.12 Elektrophysiologie

Die elektrophysiologischen Untersuchungen an den EHTs wurden in Kooperation mit dem Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten (Prof. Korth) von Dr. Marco Mewe durchgeführt.

Zur Bestimmung des Aktionspotentials der Kardiomyozyten in EBs und EHTs wurden diese mittels zweier Klammern in einem doppelkammerigen Organbad befestigt. Die EHTs wurden zunächst in einer modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (in mM: 115 NaCl, 4,7 KCl, 1,2 KH_2PO_4 , 1,2 MgSO_4 , 1,2 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , 10 D-Glukose) unter kontinuierlicher Carbogenbegasung (95% O_2 , 5% CO_2) zur Gewährleistung des pH-Wertes von 7,3-7,4 äquilibriert. Während dieses Schritts wurden zusätzlich Chymotrypsin (0,0025%, Sigma-Aldrich) und Kollagenase CLS Typ II (0,2 mg/ml, 65 units/ml; Worthington, NY) zugegeben, um den Zugriff auf die Kardiomyozyten in der Fibrinmatrix zu erleichtern. Nach einstündiger Enzymeinwirkung konnten spontane Aktionspotentiale mit "scharfen" Elektroden (Widerstand 20-25 $\text{M}\Omega$ bei Füllung mit einer 3 M KCl-Lösung) gemessen werden. Platindrähte wurden zur elektrischen Stimulation (Rechteckimpulse für 4 ms bei 1 Hz und einer überschwelligigen Reizintensität) der Kardiomyozyten bzw. EHTs verwendet. Die transmembranöse elektrische Aktivität wurde mit einem elektrometrischen Verstärker (Model 773; World Precision Instruments, New Haven, CT) aufgenommen und bei 1 kHz

mittels eines 16-bit A/D Interfaces digitalisiert. Die Dauer des Aktionspotentials (*action potential duration*, APD) wurde bei einer Repolarisierung von 80% (APD₈₀) aufgenommen und gemessen. Die Datenakquisition und –analyse erfolgte mit Hilfe eines ISO-3 Multitasking *patch-clamp* Programms (MFK, Niedernhausen, Deutschland). Die weitere Datenauswertung wurde mit dem Programm SigmaPlot 11.0 durchgeführt.

2.13 Automatisierte Messung

Die Kontraktilität der EHTs wurde in einer eigens hergestellten Anlage gemessen. Ein Inkubator mit automatisch regulierten Werten von Kohlendioxid, Luftfeuchtigkeit und Temperatur wurde mit einem Glasdeckel versehen. Über diesem Glas ist eine Kamera (Basler A 602f-2) an einem dreidimensionalen Achsensystem (IAI Corporation) angebracht, so dass die Kamera jedes EHT anfahren und fokussieren kann (Abbildung 7). Unter jedem Well wurde eine LED angebracht, die mit der Aufnahme synchronisiert das EHT beleuchtete. Die Kamera, Achsen und die LEDs wurden von einer speziell dafür angefertigten Software gesteuert (Consulting Team Machine Vision, Pforzheim), welche auch die Analyse der Filme übernahm. Für die Analyse wurde per Figureerkennung die Distanz der beiden Enden des jeweiligen EHTs ausgewertet. Die Distanz wurde mit folgender Formel in Kraft umgerechnet (Vandenburgh et al. 2008):

$$F = \frac{3\pi ER^4 \delta}{4L^3}$$

- F = Kraft (mN)
- E = Elastizitätskoeffizient (Youngscher Modul)
- R = Radius der Silikonstäbchen (mm)
- L = Länge der Silikonstäbchen (mm)
- δ = Ablenkung der Stäbchen (mm)

Aus den Rohdaten Kraft und Zeit konnten weitere Parameter wie Frequenz (bpm, „BPM“), Kraft (mN, „F“) Kontraktionszeit (ms, „T1“), Relaxationszeit (ms, „T2“), relative Verkürzung (% „FS“), Kontraktionsgeschwindigkeit (mN/s, „CV“) und Relaxationsgeschwindigkeit (mN/s, „RV“) berechnet werden. Am Ende jeder Messung wurde ein Report generiert, in dem alle

Ergebnisse aufgeführt sind. Als Qualitätskontrolle wurden Bilder von jedem aufgenommenen Video mit den Markierungen der Figurerkennung eingefügt, ebenso wie ein Graph in dem die Kraft über der Zeit aufgetragen war. Außerdem wurden alle Parameter für die Auswertung angegeben.

Der von der Software ausgegebene Graph zeigt die Rohdaten als rote Linie, die gefilterten Werte (Gaußsche Glättung) in blau und markiert zusätzlich jede erkannte Kontraktion, welche mit in die Auswertung fließt, mit einem grünen Quadrat.

2.14 Calcium-Konzentrationswirkungskurve

Der Einfluss von extrazellulären Calciumkonzentrationen wurde in Mess-Medium bestimmt, welches mit Calcium-freien DMEM angesetzt wurde. Die Kontraktilität wurde zu Anfang des Experiments bestimmt (Ausgangslage), dann wurden die EHTs mit Mess-Medium inkubiert, welches auf 0,2 mM Ca^{2+} eingestellt worden ist. Nach 20 min wurde die Kontraktilität gemessen und durch die Zugabe von Calciumchlorid-Lösung die nächsthöhere Konzentration eingestellt. Nach 20 min Inkubation wurde wieder gemessen und die nächsthöhere Konzentration eingestellt. Es wurden folgende Calciumkonzentrationen gemessen: 0,2; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2 und 3,0 mM.

2.15 Sympathische und Parasympathische Stimulation

Der Einfluss von Isoprenalin und Carbachol wurde bei submaximalen Calciumkonzentrationen von 0,6 mM gemessen. Dazu wurde wieder Calcium-freies Mess-Medium mit Calciumchlorid auf 0,6 mM Ca^{2+} eingestellt und die EHTs für 20 min inkubiert. Die EHTs wurden gemessen, Isoprenalin (100 nM) wurde zugefügt und nach 20 min Inkubation wurde wieder gemessen. Carbachol (10 μM) wurde hinzugefügt und nach weiteren 20 min wurde gemessen.

2.16 Messungen von Substanzen

Alle Substanzen wurden in Mess-Medium und kumulativ gemessen. Dazu wurden die EHTs in 1,5 ml Mess-Medium überführt und für 1 h inkubiert, um Temperatur und Gas-Konzentrationen zu äquilibrieren. Dann wurde die Referenzmessung durchgeführt (Ausgangslage) und die erste Konzentration der zu messenden Substanz zugefügt. Die EHTs

wurden mindestens 30 min inkubiert, bevor die nächste Messung durchgeführt wurde. Mit allen weiteren Konzentrationen wurde ebenso verfahren, das Medium wurde nicht gewechselt. Zum Auswaschen der Substanzen wurden die EHTs kurz (~5 min) in PBS gewaschen und dann in EHT-Medium überführt. Die gewonnenen Messwerte waren gepaart, jede Konzentration und jedes EHT wurden relativ in Bezug auf die eigene Referenzmessung ausgewertet.

2.17 Elektrische Stimulation

Für die elektrische Stimulation der EHTs (*pacings*) wurden Elektroden aus Platindraht neben jedem zu stimulierenden EHT angebracht. Der Versuchsaufbau ist limitiert auf die Messung und Stimulation von vier EHTs in einem Aufbau. Diese vier EHTs wurden an einen elektrischen Impulsgeber angeschlossen, bei dem unter anderem die Parameter Spannung, Dauer und Frequenz der Impulse einstellbar waren. Die EHTs waren für die Messung nicht perfundiert, daher wurde jedes EHT nie länger als insgesamt 2 min ohne Wechsel des Mediums stimuliert. Die EHTs waren einzeln ansteuerbar. Zusätzlich wurde dem Medium Acetylcystein (100 μ M) zugesetzt. Standardeinstellungen waren: Spannung 10 V und Impulsdauer 10 ms.

2.18 Auswertung der Schlagmuster

2.18.1 Auswertung nach irregulären Ereignissen

Die Ausarbeitung eines Protokolls zur Auswertung nach irregulären Ereignissen war ein wichtiger Teil dieser Arbeit und ist daher bei den Ergebnissen (Kapitel 3.14.2) zu finden.

2.18.2 Analyse der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen

Die Ausarbeitung eines Protokolls zur Auswertung nach der Regelmäßigkeit der Kontraktionen war ein wichtiger Teil dieser Arbeit und ist daher bei den Ergebnissen (Kapitel 3.14.3) zu finden.

2.19 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, sind alle Werte und Fehler als Mittelwerte und Standardabweichung angegeben. Um signifikante Änderungen zu bestimmen, wurde je nach Umstand ein gepaarter oder ungepaarter t-Test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde

$\alpha=0,05$ gewählt, entsprechend wurden signifikante Unterschiede mit einem (*) in den Darstellungen gekennzeichnet.

Eine Ausnahme bildet die Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen (3.14.2). Die Längen der Intervalle sind nicht normalverteilt, daher wurde als Maß für die Streuung die Differenz des 10. und 90. Perzentils (Interdezilen-Abstand) berechnet. Um die Unterschiede zwischen Gruppen von EHTs vor und nach Intervention zu berechnen, wurden Mann-Whitney-U-Tests (ungepaart, nicht-parametrisch) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha=0,05$ gewählt, entsprechend wurden signifikante Unterschiede mit einem (*) in den Darstellungen gekennzeichnet.

Die Messungen von EHTs mit verschiedenen Konzentrationen von Substanzen waren immer gepaarte Messungen, da dasselbe EHT mehrmals hintereinander gemessen wurde. Da die EHTs untereinander in den absoluten Messwerten erheblich schwankten, wurden die Werte für jedes EHT auf die eigene Referenzmessung relativiert. Zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden wurde der t-Test mit den absoluten Messwerten durchgeführt. EHTs, welche innerhalb der Messperiode keine Kontraktionen zeigten, oder deren Kontraktionen den Schwellenwert für die Kraft nicht überschritten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Zellkultur von humanen embryonalen Stammzellen

Die Handhabung von humanen embryonalen Stammzellen als Zellkultur ist anspruchsvoller als die Handhabung von anderen, immortalisierten Zelllinien wie CHO Zellen (*chinese hamster ovary*) oder HEK-293 Zellen (*human embryonic kidney*), da sie bei falscher Behandlung spontan und irreversibel differenzieren. Differenzierte Kolonien sind für die weitere Kultivierung verloren und müssen von der Zellkulturschale entfernt werden.

Folgende Linien von hESCs konnten in der Zellkultur etabliert werden:

- H1 (Thomson et al. 1998)
- H7 (Thomson et al. 1998)
- H9 (Thomson et al. 1998)
- hES2 (Reubinoff et al. 2000)
- hES2.R26 (Irion et al. 2007)

Alle Zelllinien wurden anfangs auf murinen Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts – MEFs*) kultiviert und dann auf die Fibroblasten-freie Zellkulturmethode (C. Xu et al. 2001) umgestellt. Für die Kokultur der Stammzellen auf MEFs wurden Fibroblasten der Mauslinie CF-1 ständig parallel in Kultur gehalten. Da die MEFs in Passage 4 verwendet werden mussten, wurden Aliquots in Passage 2 eingefroren und nach Bedarf aufgetaut, in der Regel ein bis zweimal pro Woche. Nachdem die MEFs konfluent gewachsen waren (Passage 3), wurden sie mit Mitomycin C mitotisch inaktiviert, abgelöst, gezählt und in definierter Zahl ausgesät (Passage 4). Nach 24 h waren sie bereit für die Kokultur mit Stammzellen (Abbildung 13 D). Für die Fibroblasten-freie Kultur wurden die Stammzellen in Zellkulturschalen gehalten, die vorher mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Matrigel™) beschichtet wurden (Abbildung 13 E). Zur Versorgung der Zellen wurde Stammzellmedium verwendet, welches zuvor für 24 h auf MEFs war und so konditioniert wurde. Die Konditionierung des Mediums wurde chargenweise durchgeführt, das Medium eingefroren und nach Bedarf aufgetaut.

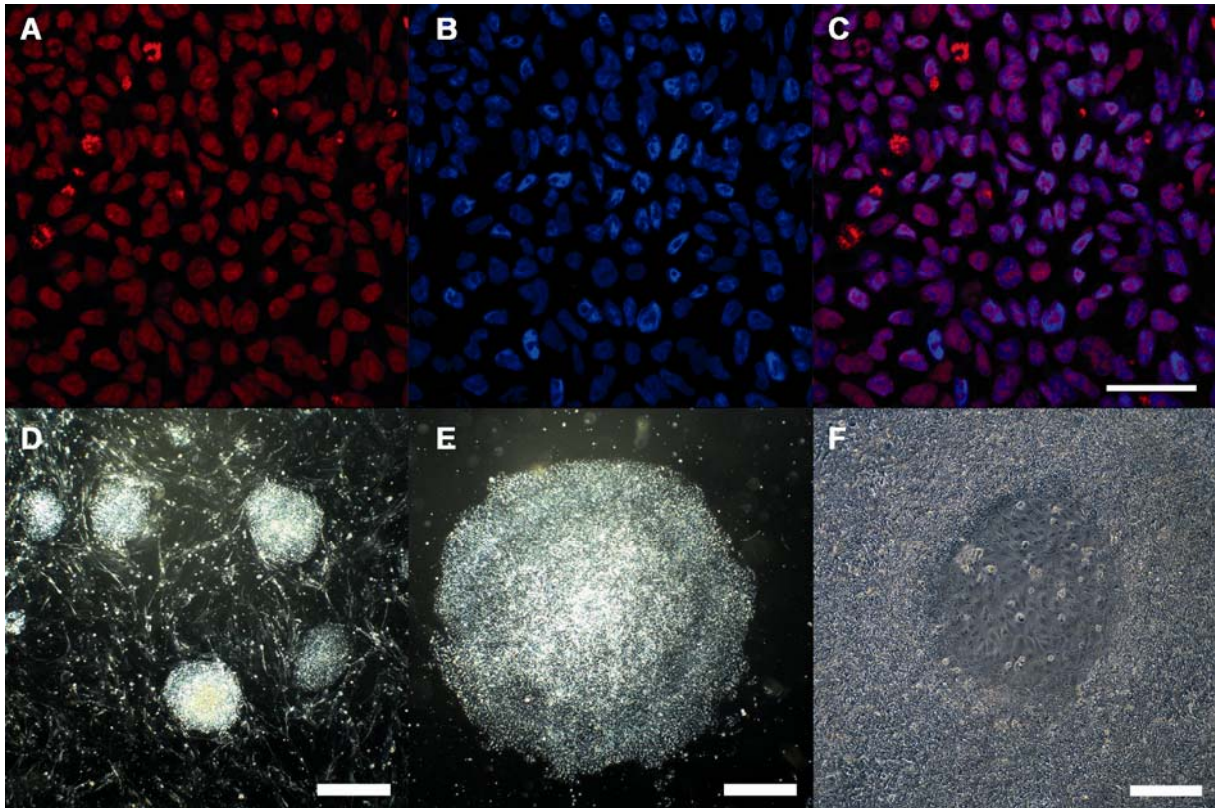


Abbildung 13: (A) bis (C) Immunfluoreszenz von undifferenzierten hESC, (A) rot: DNA (DRAQ5), (B) blau: Oct-4, (C) Überlagerung, Maßstab 50 μm , (D) Kolonien von undifferenzierten hESCs auf MEFs, Maßstab 500 μm , (E) auf Matrigel, Maßstab 500 μm , (F) Spontan differenzierter Bereich einer Kolonie in der Bildmitte, Maßstab 100 μm .

Die Zellen wuchsen mit stabiler Rate und zeigten nur vereinzelt Anzeichen von spontaner Differenzierung, welche oft im Zentrum einer Kolonie beginnt und diese ringförmig erscheinen ließ (Abbildung 13 F). Auch die Expression von Oct-4, neben Nanog und Sox-2 der wichtigste Transkriptionsfaktor für den Erhalt des pluripotenten Status, konnte nachgewiesen werden (Abbildung 13 A-C). Das wichtigste Qualitätsmerkmal war jedoch die Morphologie der Kolonien. Runde, homogen erscheinende Kolonien mit kleinen Zellen und kleinem Zytoplasma-zu-Nukleus Verhältnis zeichnen eine intakte Kolonie aus, während heterogene Erscheinung und große Zellen mit viel Zytoplasma oftmals ein Zeichen für spontane Differenzierung sind.

3.2 Herstellung von Embryoidkörperchen

Der erste Schritt, um humane embryonale Stammzellen in Kardiomyozyten zu differenzieren, ist die Etablierung eines Protokolls, um Embryoidkörperchen (*embryoid bodies – EBs*) aus den undifferenzierten Zellen herzustellen. Da bei dieser Arbeit mit der Fibroblasten-freien Methode der Kultivierung der Stammzellen gearbeitet wurde, und alle bisher

veröffentlichten Protokolle für die Herstellung von EBs auf Stammzellen basierten, welche auf MEFs gewachsen sind, ergaben sich einige Schwierigkeiten. Diese waren wahrscheinlich der unterschiedlichen Morphologie der Kolonien zuzuschreiben, da die Zellen auf Matrigel™ eher dünn und flach wuchsen und auf Fibroblasten eher haufenartig. Auf Abbildung 13 (B und C) ist die unterschiedliche Morphologie deutlich zu erkennen, die Kolonie auf Matrigel™ ist wesentlich größer, während die Kolonien auf MEFs kleiner und dichter erscheinen.

Die ersten Versuche, EBs von auf Matrigel™ gewachsenen hESCs herzustellen, schlugen fehl. Die Zellaggregate waren fransig und zerfielen innerhalb von Tagen in einzelne Zellen (Abbildung 14 C). Drei Modifikationen der bestehenden Protokolle waren für den Erfolg entscheidend: erstens die Optimierung der Fragmentierung, zweitens die Inkubation in konditioniertem Medium für die ersten 24 h und drittens der Einsatz von Y-27632.

Die Kolonien von auf Matrigel™ kultivierten Stammzellen wurden nach dem enzymatischen Verdau nicht mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte entfernt, sondern mit der Spitze einer 5 ml Pipette. Die so entstandenen Zellfragmente hatten ohne weitere Trituration eine geeignete Größe. Sie wurden die ersten 24 h in der ULA-Flasche mit konditioniertem Medium versorgt, welches mit Y-27632 (10 µM) versetzt war. Diese Veränderungen führten zu einem Protokoll, mit dem reproduzierbar EBs hergestellt werden konnten, die nach 24 h an einem definierten und glatten Rand zu erkennen waren (Abbildung 14 A und B).

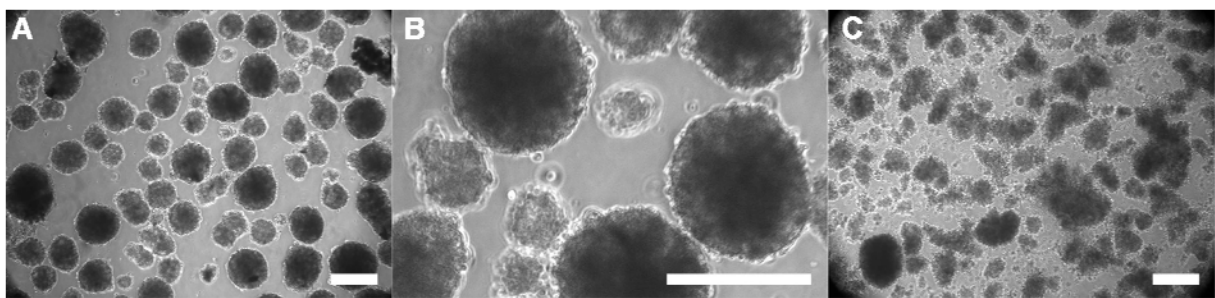


Abbildung 14: (A) – (B) Embryoidkörperchen (EBs) nach 24 h in konditioniertem Medium mit Y-27632, der definierte Rand ist gut zu erkennen, (C) Zellfragmente nach fehlgeschlagener EB Formation, Maßstab 200 µM.

Weitere Probleme ergaben sich, da sich die EBs nach wenigen Tagen der Differenzierung nach dem ursprünglichen Protokoll (Yang et al. 2008) auflösten und in einzelne Zellen zerfielen. Nur wenige blieben erhalten, so dass die Ausbeute an spontan kontrahierenden EBs sehr gering war. Dieses Problem konnte durch den Wechsel des Mediums behoben

werde, auf dem die Differenzierung basierte. Statt StemPro-34 wurde RPMI/B-27 eingesetzt, was zu einer deutlichen Stabilisierung der EBs führte. Es konnten so über Wochen vitale EBs in Suspension gehalten werden.

Protokoll für die Herstellung von Embryoidkörperchen aus humanen embryonalen Stammzellen

Vorbereitung

- Humane embryonale Stammzellen der Linie hES2 (bzw. hES2.R26) in 6-Well Zellkulturplatten 70-90% konfluent wachsen lassen
- CM mit 10 μ M Y-27632 in einem Reaktionsgefäß vorlegen und aufwärmen (37° C): pro 75 cm² ULA-Flasche 20 ml, pro 25 cm² ULA-Flasche 7,5 ml

Durchführung

- Medium entfernen und pro Well 1 bis 2 ml vorgewärmtes PBS hinzugeben und wieder absaugen
- Pro Well 1 ml Kollagenase IV (1 mg/ml in DMEM/ F12, steril filtriert) hinzugeben
- 5-25 min bei 37° inkubieren, bis die Kolonien anfangen, sich vom Rand her abzulösen (A)
- Kollagenase absaugen, vorsichtig 1 bis 2 ml vorgewärmtes PBS in jedes Well geben und wieder absaugen
- 1ml CM (mit 10 mM Y-27632) in jedes Well hinzugeben
- Die Kolonien sorgfältig mit der Spitze einer 5 ml-Pipette ablösen, erst von oben nach unten (B), dann von links nach rechts (C)
- Die restlichen Kolonien mit einem Zellschaber (Gummi) ablösen
- Fragmente aus allen Wells aufnehmen und direkt in eine ULA-Flasche überführen
- Die übrigen Fragmente mit dem restlichen CM (+Y) in die ULA-Flasche spülen (D)
- Bis zu 5 Wells (= 50 cm² Oberfläche) in eine 75 cm² ULA-Flasche
- Bis zu 3 Wells (= 30 cm² Oberfläche) in eine 25 cm² ULA-Flasche
- ULA-Flasche in einen Inkubator stellen und für 24 h stehen lassen (E), wenn möglich bei niedrigem Sauerstoffgehalt (5%)

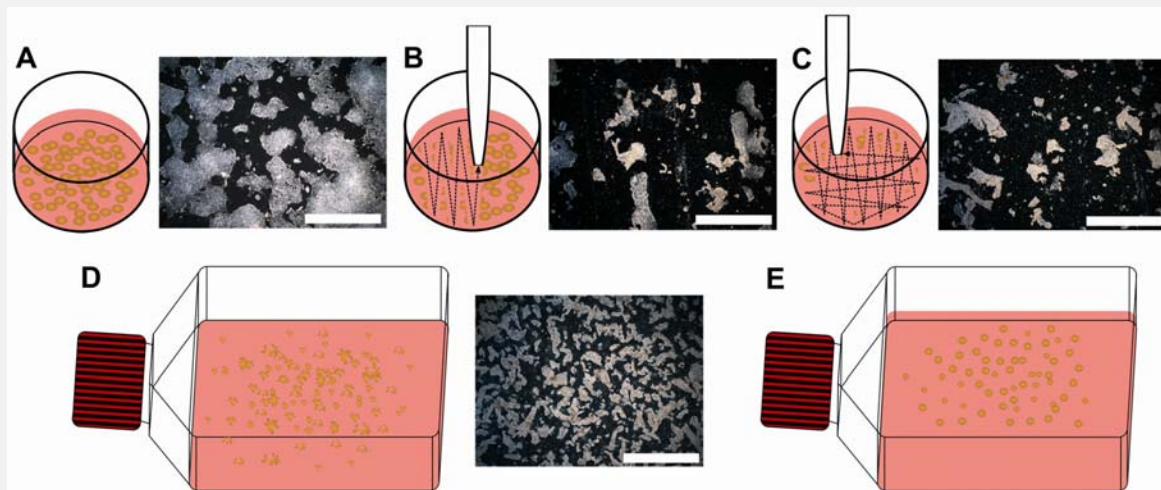


Abbildung 15: Schematische Darstellung und dazugehörige Fotos von der Herstellung von EBs, (A) Kolonien nach dem Verdau mit Kollagenase, (B) Kolonien nach erstem bzw. zweitem (C) Durchgang mit der 5 ml Pipette, (D) Fragmente direkt nach dem Überführen in die ULA-Flasche, (E) EBs nach 24 h Inkubation, Maßstab 1 mm

3.3 Differenzierung in Kardiomyozyten

Die Differenzierung von hES2.R26 Zellen nach dem Protokoll von Yang und Kollegen (Yang et al. 2008) lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Da bereits einige Punkte des Protokolls verändert wurden (EBs von Matrigel™, EB-Formation in CM mit Y-27632, RPMI/B27 statt StemPro34), wurden weitere Versuche zur Optimierung durchgeführt. Für die Differenzierung von mesodermalen kardialen Progenitor-Zellen ist die Zusammensetzung des Medium in den ersten 24 h entscheidend, also wurden die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in Stufe 1 des Protokolls überprüft. Zelllinien-spezifische Unterschiede in der Konzentration von BMP-4 und Activin A sind wahrscheinlich in einer unterschiedlich starken endogenen Expression dieser Faktoren begründet. Als früher Marker für die Effizienz der Differenzierung wurde die Anzahl an PDGFRA (PDGF Rezeptor alpha) und KDR (VEGF Rezeptor 2) doppelt-positiven Zellen (FACS) an Tag drei beschrieben (Kattman et al. 2011; Yang et al. 2008; Kattman et al. 2006; Kattman et al. 2007). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zur Optimierung der kardialen Differenzierung der Einfluss von aufsteigenden Konzentrationen von BMP-4 und Activin A auf die Expression von PDGFRA und KDR Transkripten per quantitativer PCR untersucht. Diese Experimente wurden im 24-Well Format durchgeführt, jedes Well wurde mit einer unterschiedlichen Kombination von Activin A und BMP-4 für drei Tage behandelt. Die Konzentrationen lagen für Activin A bei 0; 3; 6; 10 und 15 ng/ml und für BMP-4 0; 5; 10 und 15 ng/ml. Die Konzentration von FGF-2 betrug 5 ng/ml. Der Einfluss von verschiedenen FGF-2 Konzentrationen (5 und 10 ng/ml) wurde an den Standard-Konzentrationen von Activin A (3 ng/ml) und BMP-4 (10 ng/ml) getestet.

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse der quantitativen PCR dargestellt. Es konnte sowohl für KDR als auch für PDGFRA eine von beiden Wachstumsfaktoren konzentrationsabhängige Expression beobachtet werden. Unter dem Einfluss von Activin A alleine nahm die Expression von KDR mit steigender Konzentration ab, die von PDGFRA nahm zu. Unter dem Einfluss von BMP-4 allein nahm die Expression von KDR und PDGFRA zu, wobei kein Unterschied zwischen 10 und 15 ng/ml bestand. Kombinierte man beide Faktoren ergab sich für beide Transkripte ein komplexes Bild, bei dem deutlich eine maximale Expression von KDR bei Konzentrationen von 3 oder 6 ng/ml Activin A und 10 oder 15 ng/ml BMP-4 und eine maximale Expression von PDGFRA in Kombinationen von 3/5, 6/10 und 6/15

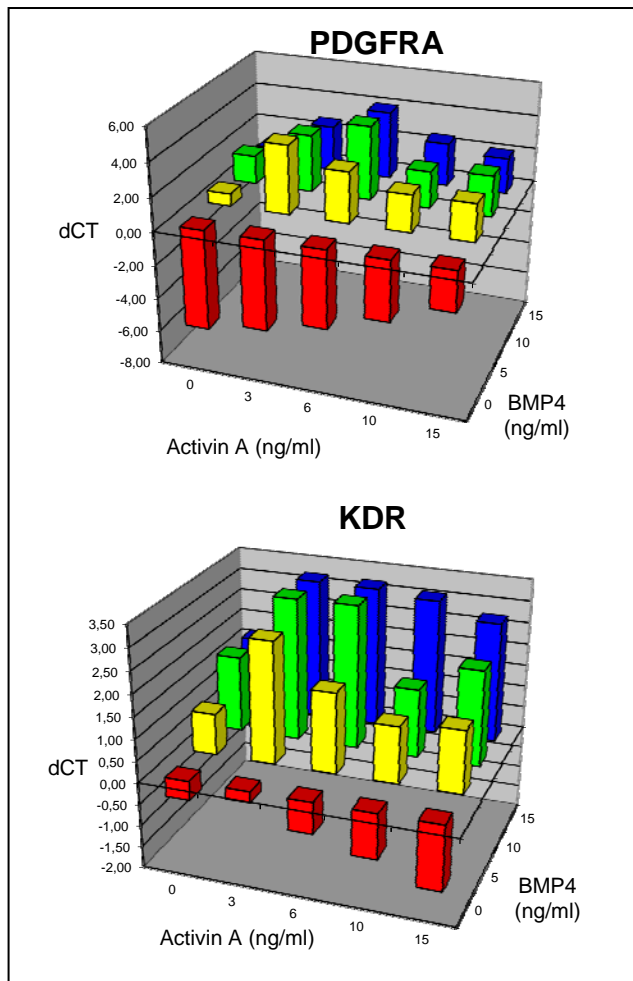


Abbildung 16: Ergebnisse der qPCR zur Optimierung der Konzentrationen von BMP-4 und Activin A, dargestellt sind dCT Werte, Referenz-Gen ist GUSB.

(Activin A/BMP-4, jeweils in ng/ml) erkennbar war. Daraus ergab sich eine optimale Konzentration von 6 ng/ml Activin A und 10 ng/ml BMP-4. Damit bestätigten sich in der PCR-basierten Analyse die Ergebnisse der FACS-basierten Analyse, auch wenn hier nicht der Prozentsatz der doppelt-positiven Zellen bestimmt werden konnte.

Als nächstes wurde der Einfluss des zeitlichen Verlaufs des Protokolls auf die Entwicklung der Zellen genauer untersucht. Zwei wichtige Faktoren spielten eine Rolle: erstens sollte der WNT-Inhibitor DKK-1 erst auf mesodermal differenzierte Zellen wirken und zweitens stellte die Nährstoffversorgung durch das Medium

einen limitierenden Faktor dar. Inkubation von mehr als drei Tagen ohne frisches Medium führte zum Zerfall der EBs. Durch parallele Versuche mit verschiedenen langen Zeiträumen (24 h, 48 h und 72 h) der EBs in Stufe 1 des Protokolls konnte beobachtet werden, dass sich die EBs besser entwickeln und früher anfangen spontan zu kontrahieren wenn sie nur für 24 h in Stufe 1 bleiben. Diese Beobachtung konnte einige Monate später, nachdem Zellen in einer niedrigeren Passage aufgetaut worden waren, nicht wiederholt werden. Diese Zellen entwickelten sich nun besser, wenn sie für 72 h in Stufe 1 gehalten wurden. Zu der optimalen Dauer von Stufe 1 konnte also keine generelle Aussage getroffen werden. Aber die Versuche zeigten, dass die Dauer von Stufe 1 einer der entscheidenden Faktoren in der Kardiomyozyten-Entwicklung aus hESC war.

Als weiterer wichtiger Punkt wurde die Beobachtung gemacht, dass das Zellkulturmedium nach drei Tagen Inkubation sauer wurde, zu erkennen am Farbumschlag der pH-Indikatoren

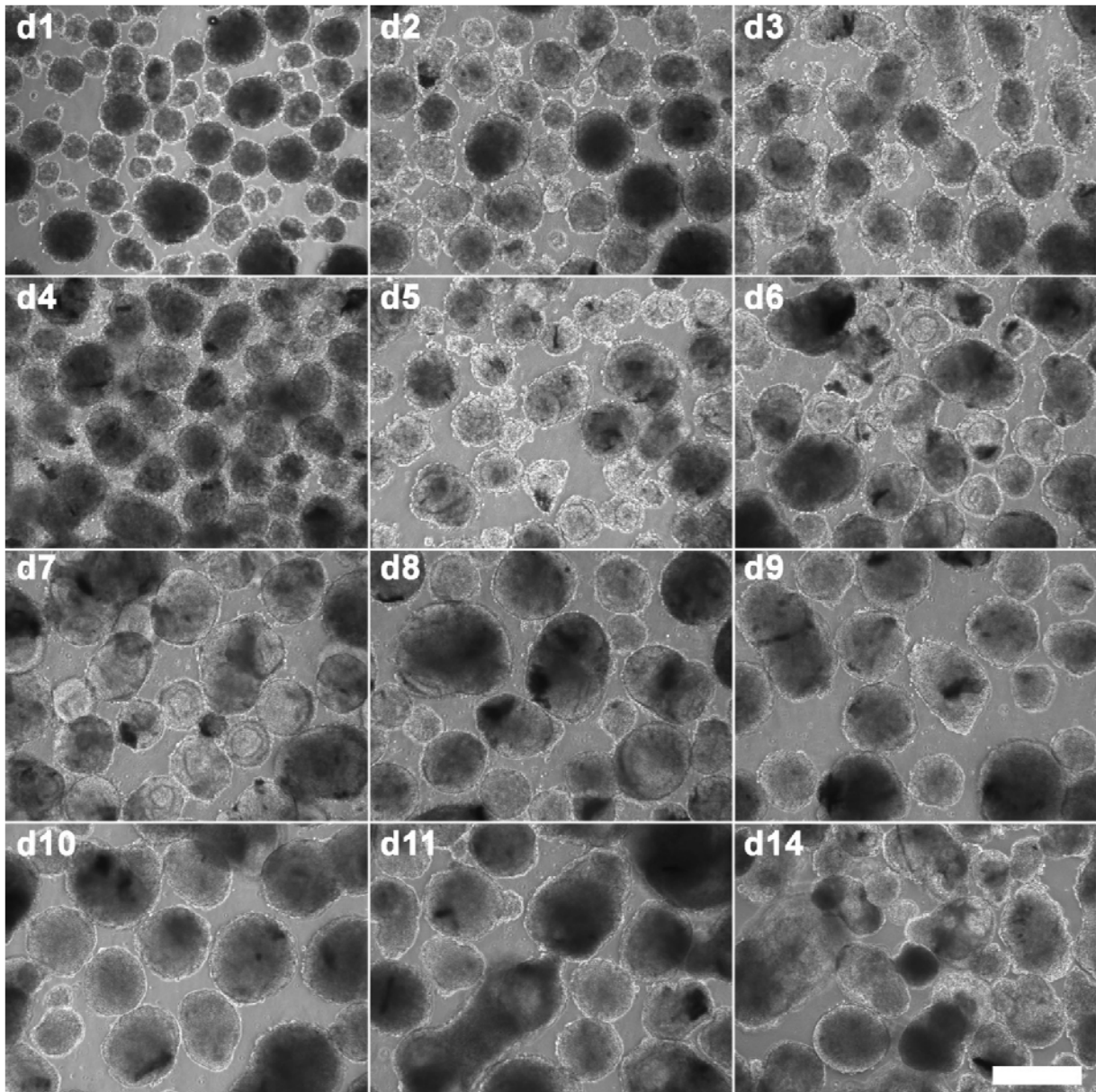


Abbildung 17: EBs im Verlauf der Differenzierung von Tag 1 (d1) bis Tag 14 (d14), die EBs von Tag 14 kontrahierten spontan, Maßstab 200 μ m.

Phenolrot von rot nach gelb Um den dadurch verursachten Zerfall der EBs zu reduzieren, wurde das Medium während der Differenzierung mit HEPES (10 mM) als Puffer versetzt. Der Verlauf der Differenzierung ist auf Abbildung 17 gezeigt. Man kann deutlich die unterschiedliche Größe der EBs erkennen, insgesamt schien sie etwas zuzunehmen. An Tag fünf waren das erste Mal EBs mit doppeltem Rand zu erkennen, möglicherweise ein Zeichen von Selbstorganisation der Zellen in den EBs. An Tag elf und besonders an Tag 14 traten typische Auswüchse von proliferierenden Zellen aus den EBs auf. Ab Tag 14 waren die EBs zum Teil zystisch geworden, die meisten (>80%) auf der Abbildung dargestellten kontrahierten spontan.

Protokoll zur kardialen Differenzierung von EBs

Vorbereitung

- EBs herstellen wie beschrieben
- Medium für die jeweilige Stufe vorbereiten und auf 37° C erwärmen

Mediumwechsel

- EBs in 15 ml Reaktionsgefäße überführen
- ULA-Flasche mit PBS waschen und den Rest in dieselben 15 ml Reaktionsgefäße überführen (für eine 75 cm² ULA-Flasche benötigt man zwei 15 ml Reaktionsgefäße)
- Zentrifugieren bei 300 RPM (60 g) für 4 min
- Überstand abnehmen und die EBs mit dem neuen Medium wieder in die ULA-Flasche überführen

Medien

- Basalmedium: RPMI 1640 mit 2% B-27 Supplement, 0,5% Penicillin/ Streptomycin und 10 mM HEPES
- In Stufe 1 zusätzlich 10 µM Y-27632, 10 ng/ml BMP-4, 6 ng/ml Activin A und 5 ng/ml FGF-2
- In Stufe 2 zusätzlich 10 µM Y-27632, 10 ng/ml VEGF und 150 ng/ml DKK-1
- In Stufe 3 zusätzlich 10 ng/ml VEGF, 150 ng/ml DKK-1 und 5 ng/ml FGF-2
- DM besteht aus KnockOut DMEM, 20% FCS, 1% L-Glutamin, 1% NEAA, 0,5% Penicillin/ Streptomycin und 3,5 µl/ 500ml β-Mercaptoethanol

Zeitlicher Ablauf

- 24 h nach Herstellung der EBs Medium der Stufe 1
- Nach weiteren 72 h Stufe 2 (diese Zeit kann bei geringer Ausbeute auf 48 oder 24 h reduziert werden)
- Nach weiteren 72 h Stufe 3
- Nach etwa 5 Tagen bzw. nach Verfärbung des Mediums etwa die Hälfte des Mediums gegen frisches RPMI/B27 austauschen
- Wenn die EBs anfangen spontan zu kontrahieren (Tag 10 bis 15), 10 ml DM (3 ml bei 25 cm² Flasche) hinzufügen und in einen Inkubator mit normalen Sauerstoffgehalt wechseln. Spätestens an Tag 15
- Alle 2 Tage die Hälfte des Mediums gegen frisches DM austauschen

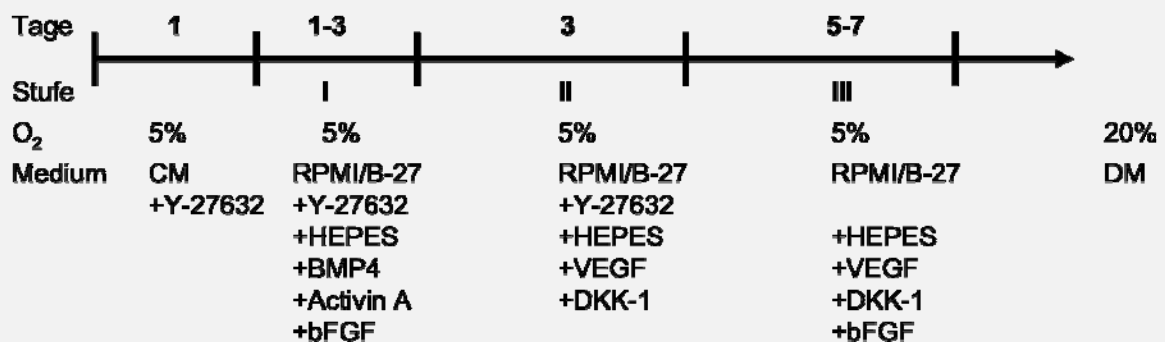


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Ablaufs der Differenzierung.

3.4 Genexpression während der Differenzierung

Um den Verlauf der Differenzierung genauer verstehen und überprüfen zu können, wurden alle zwei Tage Proben genommen, um daraus RNA zu gewinnen. Die Expression von wichtigen Transkripten konnte so untersucht und ein Zeitprofil erstellt werden. Untersucht wurden die Zeitpunkte Tag zwei, vier, sechs und acht, die Expression wurde in Relation zur Expression an Tag null gesetzt, also undifferenzierten Zellen. Pro Zeitpunkt wurden zwischen vier und sieben Ansätze der Differenzierung untersucht, Stufe 1 dauerte bei diesen Versuchen 24 Stunden.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Oct-4, zusammen mit Nanog und Sox-2, der wichtigste Transkriptionsfaktor in undifferenzierten Zellen, wurde nach Beginn der Differenzierung herunter reguliert. Bis Tag acht war die Expression um über 90% vermindert. Brachyury (T) wird *in vivo* in Zellen des Primitivstreifens (*primitive streak*) exprimiert und gilt daher als Marker für mesodermale Zellen. Bereits zwei Tage nach Einsetzen der Differenzierung konnte eine deutliche Erhöhung der Expression festgestellt werden, die ähnlich schnell wieder abfiel. Die maximale Expression an Tag zwei entsprach dem ca. 6000fachen Niveau von undifferenzierten Zellen, an Tag vier nur noch dem 40fachen. Ähnlich verhielt sich MESP1, ebenfalls ein Marker für mesodermale Zellen, wenn auch die Ausmaße nicht denen von Brachyury entsprachen. KDR und PDGFRA werden von frühen kardialen Vorläuferzellen co-exprimiert (Kattman et al. 2011). Die Expression von beiden Genen stieg von Tag zwei auf Tag vier deutlich an und blieb dann stabil. ISL-1 wird, unter anderem, von späten kardialen Vorläuferzellen exprimiert. Während der Differenzierung stieg die Expression deutlich von Tag vier auf Tag sechs an und blieb an Tag acht in etwa auf dem gleichen Niveau. MYH6, MYH7, TNNT2, TNNI1 und TNNI3 sind Gene, die für die sarkomerischen Proteine Myosin (schwere Kette, kardial, alpha und beta; MYH6 und MYH7), Troponin T (kardial; TNNT2) und Troponin I (kardial und skeletal, TNNI3 und TNNI1) kodieren. Die Expression von MYH6, MYH7, TNNT2 und TNNI1 war an Tag zwei noch auf dem Niveau von undifferenzierten Zellen, nahm aber ab Tag vier stetig zu. TNNI3 wurde in den analysierten Zellen nicht exprimiert, die Transkriptkonzentrationen waren sogar unter denen von undifferenzierten Zellen. Alpha-MHC (MYH6) war an Tag acht der Differenzierung etwa 10000fach stärker exprimiert als in undifferenzierten Zellen und zehnfach stärker exprimiert als β -MHC (MYH7).

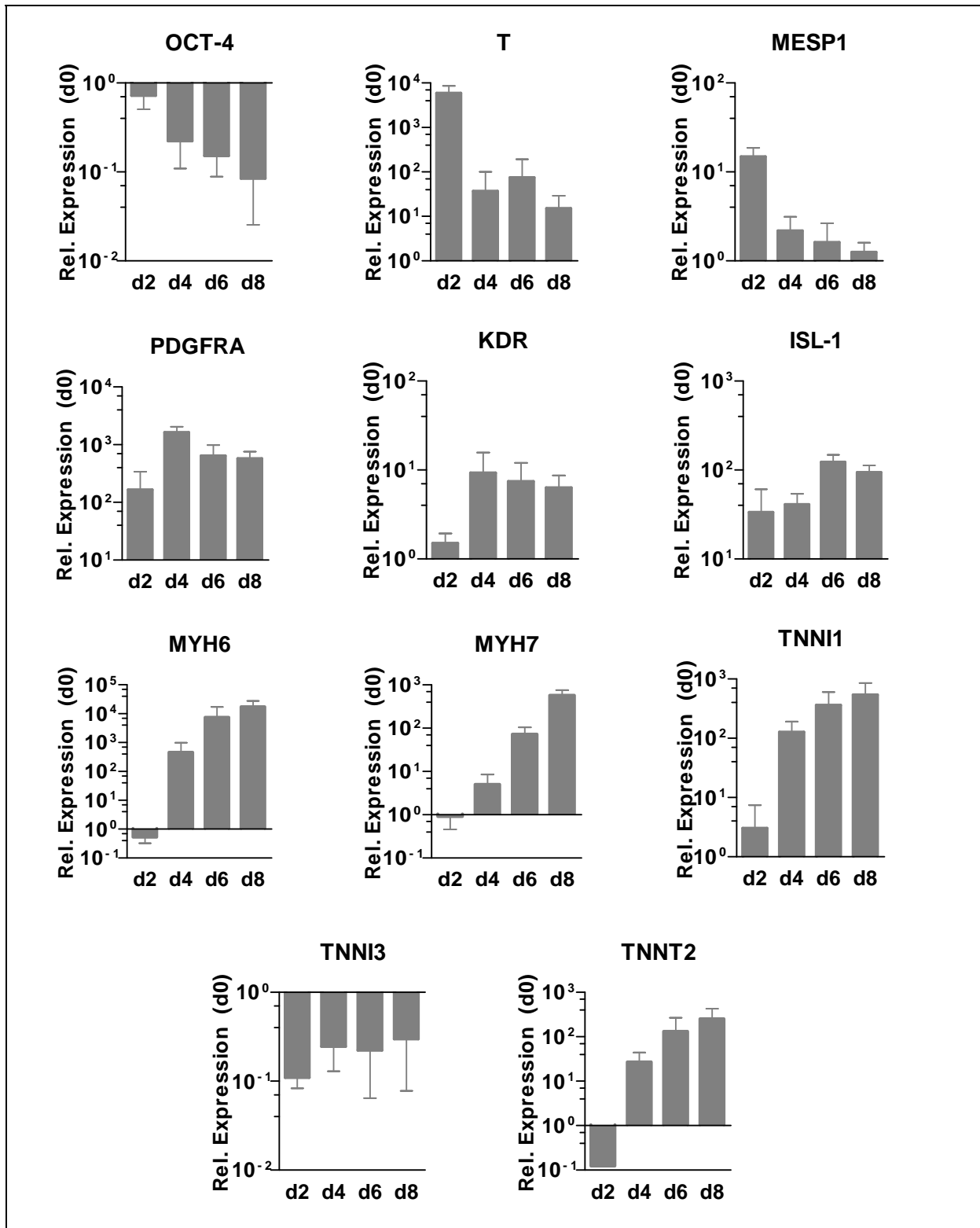


Abbildung 19: Genexpressionsanalyse von wichtigen Genen der kardialen Entwicklung während der Differenzierung, Werte normalisiert auf undifferenzierte Zellen (= d0), Mittelwerte \pm SD, n=4-7.

3.5 Exkurs: Expression von Troponin in hESC

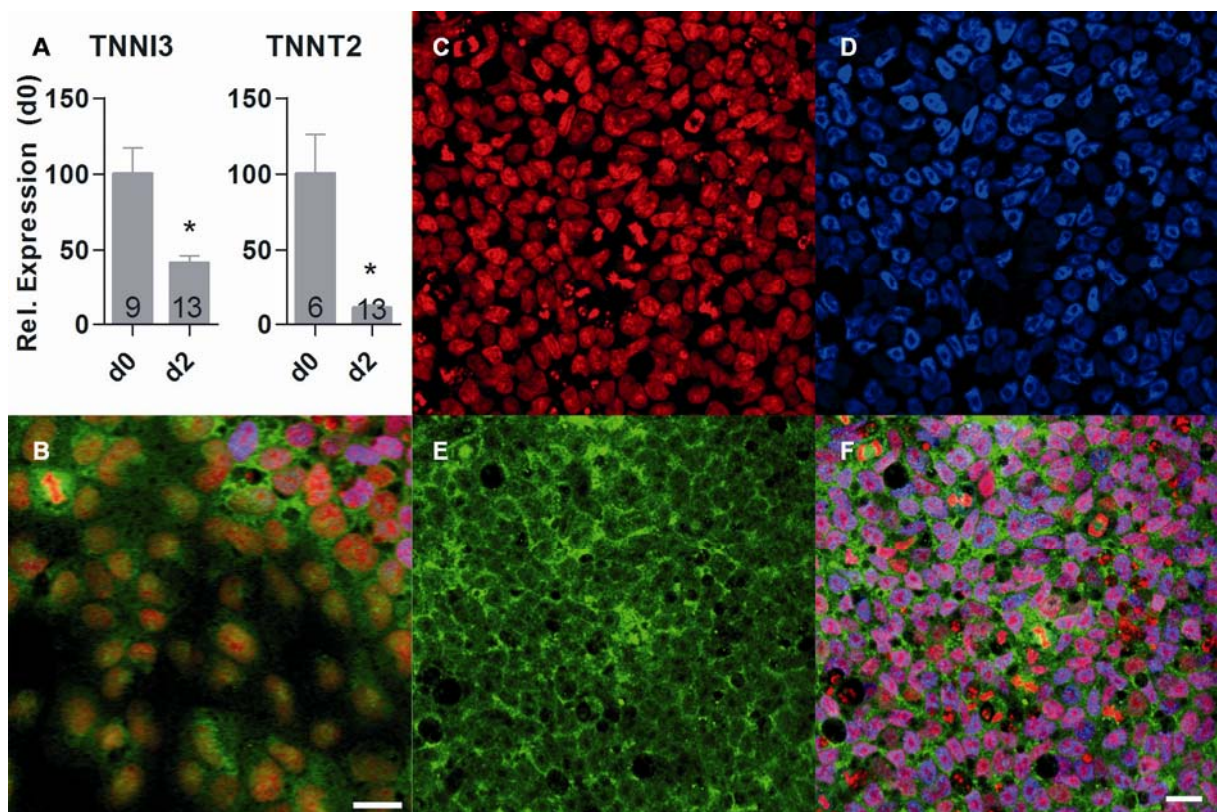


Abbildung 20: Expression von Troponin in hESC. (A) Expression von TNNI3 und TNNT2 in undifferenzierten hESC (d0) und zwei Tage nach Beginn der Differenzierung (d2), Zahlen in den Säulen geben die Replikate an, Mittelwert \pm SEM, $*=p<0,05$, (B) bis (F) Immunfluoreszenz, rot: DNA (DRAQ5), grün: Troponin T (kardial), blau: Oct-4, (B) differenzierte Zellen in der Mitte, undifferenzierte oben rechts, (C) bis (F) undifferenzierte Zellen.

Bei den Genexpressionsanalysen (Kapitel 3.4) fiel immer wieder ein Detail auf: die verminderte Expression von kardialem Troponin I und T direkt nach Einsetzen der Differenzierung (Abbildung 19, TNNI3 und TNNT2). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob diese Zellen erfolgreich zu Kardiomyozyten differenziert werden konnten, oder nicht. Es wurden daher alle Ergebnisse von Genexpressionsanalysen zusammengetragen, bei denen die Expression von TNNT2 und TNNI3 an Tag zwei der Differenzierung bestimmt wurde. In Abbildung 20 A sind die Ergebnisse dargestellt. Die meisten der eingeschlossenen Versuche führten im späteren Verlauf nicht zur erfolgreichen Differenzierung in kardiale Zellen, dargestellt sind daher nur die Daten der undifferenzierten Zellen (d0) und die Daten zwei Tage nach Beginn der Differenzierung. Die Expression von TNNI3 war an Tag zwei im Mittel auf $42,3\% \pm 4,7$ (n=13) vermindert, die von TNNT2 auf $11,0\% \pm 1,7$ (n=13).

Daraufhin wurde versucht, die Expression des von der mRNA kodierten Proteins Troponin T (kardial) per Immunfluoreszenz in undifferenzierten Zellen nachzuweisen. Dazu wurden humane embryonale Stammzellen der Linie H7 mit Antikörpern gegen Oct-4 und Troponin T gefärbt. Auf Abbildung 20 (C bis F) sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Die Färbung von Oct-4 gab ein deutliches, nukleäres Signal in allen Zellen. Die Färbung von Troponin T zeigte ein Signal, bei dem der Nukleus der Zellen deutlich dunkler war, als das Zytoplasma.

Um die verminderte Expression von Troponin T in differenzierten Zellen darzustellen und so die Daten der qPCR zu belegen, wurden einige Kolonien so lange ohne Passage in Kultur gehalten, bis spontane Differenzierung einsetzte. Diese Zellen wurden ebenfalls mit Antikörpern gegen Oct-4 und Troponin T gefärbt, diesmal mit besonderem Augenmerk auf die kreisförmigen, spontan differenzierten Bereiche (siehe auch Abbildung 13 F). Auf Abbildung 20 B ist der Randbereich eines solchen Bereichs dargestellt. Die Zellen im Bereich der Differenzierung zeichneten sich durch eine geringere Kern-Plasmarelation aus, sowie durch die fehlende Expression von Oct-4. In den meisten dieser so charakterisierten Zellen war ebenfalls ein deutlich schwächeres Troponin T Signal zu erkennen als bei den Oct-4-positiven Zellen am oberen rechten Rand der Abbildung. Diese Daten belegen eine relevante Troponin-Expression in undifferenzierten hESC. Die Bedeutung ist zum jetzigen Zeitpunkt unklar.

3.6 Analyse der differenzierten EBs: FACS

Um die Differenzierung der Kardiomyozyten zu quantifizieren, wurden zwei Methoden angewendet. Erstens wurde der Anteil an spontan kontrahierenden EBs quantifiziert und zweitens wurde der Anteil an Kardiomyozyten per FACS-Analyse bestimmt.

Insgesamt zehn Chargen an differenzierten EBs wurden auf ihren Anteil an spontan kontrahierenden EBs untersucht. Dazu wurden jeweils drei bis vier Ausschnitte im Mikroskop beobachtet und ausgezählt. Im Durchschnitt konnten $71,96 \pm 16,19\%$ ($n=10$) spontan kontrahierende EBs beobachtet werden.

Vor der Analyse der EBs per FACS stand die Dissoziation in einzelne Zellen. Da EBs, im Gegensatz zu Zellen in der 2D Zellkultur, ein organisiertes, gewachsenes Gewebe bilden,

welches durch einen starken Zusammenhalt der Zellen gekennzeichnet ist, musste für die Dissoziation ein Protokoll entwickelt werden (siehe „Protokoll zur Dissoziation von EBs in einzelne Zellen“). Die dissoziierten Zellen wurden mit einem Antikörper gefärbt, der spezifisch an das sarkomerische Protein α -Aktinin bindet, um so Kardiomyozyten zu identifizieren. Insgesamt wurden drei Chargen untersucht, der Anteil an α -Aktinin-positiven Zellen lag bei $40 \pm 10\%$ ($n=3$).

Für die Dissoziation wurden zwei bis drei nacheinander erfolgreich differenzierte Chargen zusammengefasst. Die Ausbeute lag zwischen $2,5$ und 4×10^6 Zellen pro Dissoziation, so dass pro Charge etwa 1 bis 2×10^6 Zellen gewonnen werden konnten. Die anfangs für die Differenzierung eingesetzten Zellen zu quantifizieren war schwierig, da sie für die Herstellung von EBs in Fragmenten vorlagen und nicht in einzelnen Zellen. Man kann grob schätzen, dass pro konfluentem Well etwa 1×10^6 undifferenzierte Zellen wachsen und so etwa 5 bis 10×10^6 pro Charge eingesetzt wurden (entsprechend 5 bis 10 Wells). Damit ergibt sich, dass für jeden gewonnenen Kardiomyozyten, aus einer Population mit 40% Kardiomyozyten, bis zu zehn undifferenzierte Zellen eingesetzt werden müssen.

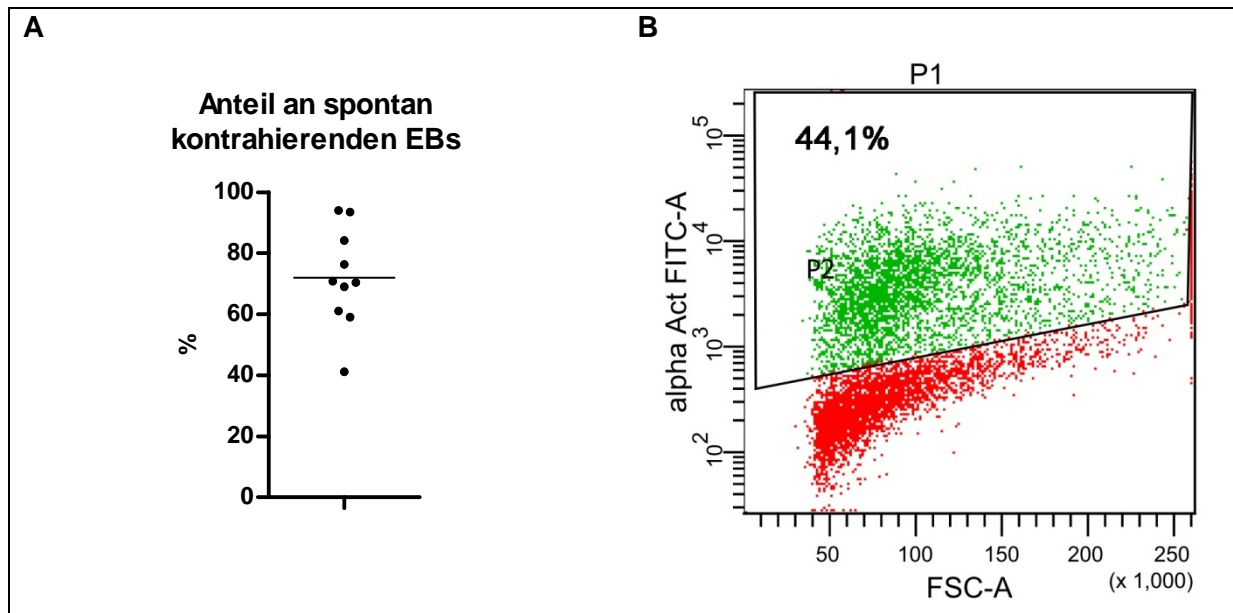


Abbildung 21: (A) Übersicht über Anteil an EBs mit spontan kontrahierenden Regionen, jeder Punkt steht für eine untersuchte Charge, (B) Ergebnis einer FACS Analyse, 44,1% α -Aktinin positive Zellen.

Protokoll zur Dissoziation von EBs in einzelne Zellen

Vorbereitung

- 1 ml Trypsin (0,5% bzw. 10x) mit Kollagenase IV (ca. 1 mg) versetzen, steril filtrieren und auf 37° erwärmen

Durchführung

- EBs in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführen, die ULA-Flaschen mit PBS gut ausspülen und die Reste ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführen
- Zentrifugieren (800 RPM, 7 min)
- Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- Zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße bereit stellen, in eins davon 1 ml PBS füllen
- Mit einer serologischen 1 ml-Pipette etwa 300 µl vom vorgelegten PBS aufnehmen und dann direkt das Pellet aus EBs aus dem 50 ml Reaktionsgefäß aufnehmen (das PBS sollte nun in der Pipette über den EBs sein)
- Die Pipette senkrecht in das zweite 1,5 ml Gefäß halten, so dass die EBs in der Pipette nach unten in die Pipettenspitze sedimentieren, und die EBs überführen (das PBS über den EBs spült diese aus)
- Den Rest des vorgelegten PBS nutzen um die übrigen EBs zu überführen und um EBs aus der Pipette zu spülen
- 1,5 ml Gefäß mit EBs in PBS zentrifugieren (200g, 2 min), Überstand vorsichtig abnehmen
- 500 µl vom vorgewärmten Trypsin/ Kollagenase IV Gemisch zu den EBs pipettieren
- Auf- und abpipettieren mit 100 µl Pipette (um den enzymatischen Verdau mechanisch zu unterstützen) für maximal 5 min, das PBS sollte nach 2 bis 3 min anfangen trüb zu werden
- Verdau mit DM stoppen, dazu das Reaktionsgefäß mit DM auffüllen (ca. 1 ml DM)
- Nicht verdaute, schleimige Reste der EBs aus der Lösung entfernen
- Zellen zum Zählen abnehmen, den Rest zentrifugieren (200g, 2 min)
- Überstand vorsichtig abnehmen, dabei wieder schleimige Aggregate entfernen, mit DM auffüllen
- Zentrifugieren (200g, 2min)
- Überstand vorsichtig abnehmen, dabei evtl. vorhandene schleimige Aggregate entfernen, Zellen in Medium nach Bedarf aufnehmen und Y-27632 zugeben (10 µM)

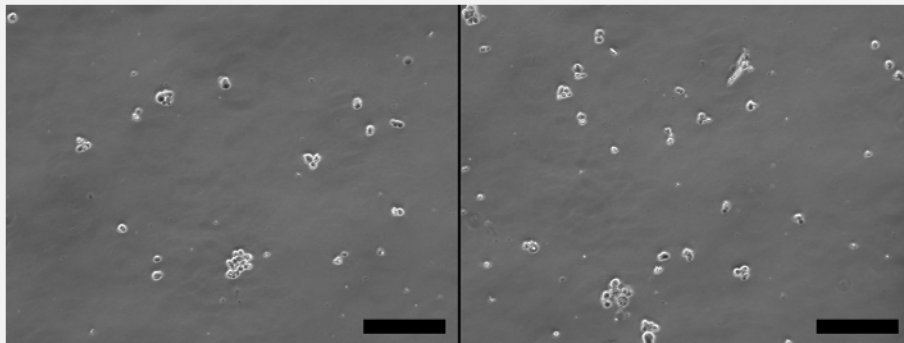


Abbildung 22: Zellen aus den EBs nach Dissoziation, Maßstab 100 µm.

3.7 Analyse der differenzierten EBs: Immunfluoreszenz

Zur histologischen Untersuchung der differenzierten EB wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Die EBs wurden dafür für mindestens 24 h entweder auf Deckgläschen oder auf Objektträger mit Zellkulturkammer (*chamber slides*) überführt, so dass sie anwachsen konnten. Gefärbt wurde mit Antikörpern, welche spezifisch an kardiale Subtypen bestimmter sarkomerischer Proteine binden, und zwar α -Aktinin und kardiales Troponin T. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse dargestellt. Man kann deutlich die unterschiedlichen Muster der Querstreifung des Sarkomers erkennen. Die Färbung von α -Aktinin führte zu Querstreifung mit einer feinen Bande (Z-Bande) und einer in Relation dazu breiten Lücke. Die Färbung von kardialen Troponin T führte im Gegensatz dazu zu Doppelbänden mit einer kleineren und einer größeren Lücke. Die Doppelbande zeigt die Bereiche des Sarkomers, in welchen sich Aktin und Myosin überlagern, die kleinere Lücke ist die H-Bande, die größere die I-Bande. Die Doppelbänder waren allerdings nicht in allen Zellen zu erkennen, teilweise war das Troponin T Signal eher eine durchgehende Linie.

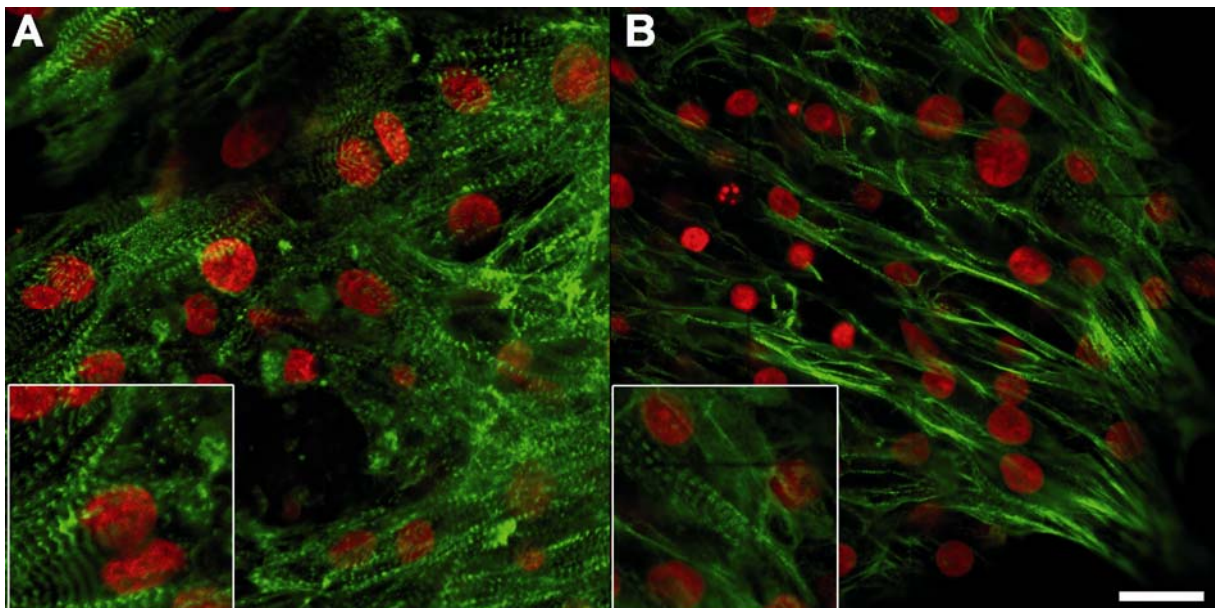


Abbildung 23: Immunfluoreszenzfärbung von angewachsenen EBs, (A) grün: α -Aktinin, rot: DNA (DRAQ5), (B) grün: Troponin T (kardial), rot: DNA (DRAQ5), Maßstab 10 μ m, links unten ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt zu sehen.

Beide Immunfluoreszenzfärbungen machen deutlich, dass Kardiomyozyten im EB-Format nicht durch eine gleichmäßige zelluläre Verteilung und sarkomerische Organisation von α -Aktinin und Troponin T charakterisiert sind. Darüber hinaus sind Kardiomyozyten in gleichförmiger Anordnung bzw. Orientierung nur ansatzweise zu erkennen. Insgesamt ergibt sich der Eindruck von unreifen Kardiomyozyten.

3.8 Künstliche Herzgewebe aus humanen embryonalen Stammzellen

Die differenzierten EBs wurden ohne vorhergehenden Selektionsschritt nach dem beschriebenen Protokoll in einzelne Zellen dissoziiert. Diese wurden eingesetzt, um daraus nach etabliertem Protokoll (Hansen et al. 2010) künstliche Herzgewebe (EHTs) herzustellen. Diese EHTs basierten auf Fibrin und wurden im Streifen-Format hergestellt. Dazu wurde Fibrinogen, Thrombin und die Zellen in eine Gussform gegossen, in der Halterungen mit zwei Silikonstäbchen angebracht wurden. Die EHTs bildeten sich dann zwischen den Silikonstäbchen, jeweils eins pro Well (24-Well Format). Die ersten EHTs waren heterogen vom Erscheinungsbild, mit vielen eingeschlossenen Zellhaufen und zeigten nur mikroskopisch erkennbare Kontraktionen, die nicht koordiniert waren und nicht mehr als einige Zellen umfassten (Daten nicht gezeigt). Nach Optimierung des Protokolls zur Dissoziation der EBs, Verringerung des EHT-Volumens auf 100 μl , Zugabe von Y-27632 (10 μM) für die ersten 24 h und Erhöhung der Zellzahl auf 600 000 pro EHT konnten zuverlässig spontan und koordiniert kontrahierende EHTs produziert werden.

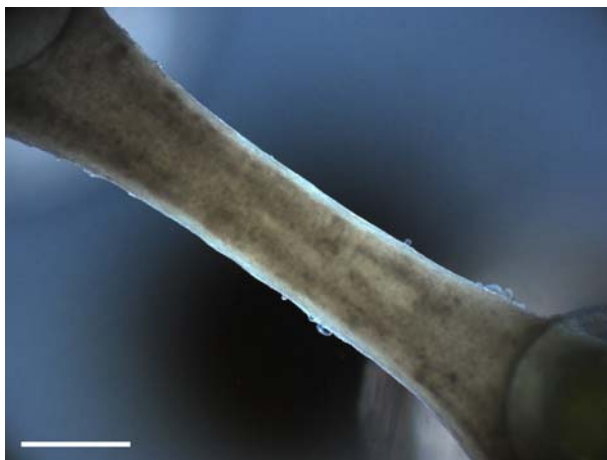


Abbildung 24: Ein ganzes EHT aus humanen Kardiomyozyten, links unten und rechts oben sind die Silikonstäbchen zu erkennen, Maßstab 1000 μm .

Die Entwicklung eines kontraktiles Gewebes aus dem Fibrin-Block konnte in mehrere Phasen unterteilt werden. Nach etwa ein bis zwei Tagen haben sich die einzelnen Kardiomyozyten im EHT wieder soweit erholt, dass man sie im Mikroskop kontrahieren sehen konnte. Es dauerte weitere zwei bis drei Tage bis sich die Koordination der Kontraktionen auf größere Bereiche ausgedehnt hatte, um dann schließlich, nach sieben bis zehn

Tagen, in komplett koordinierte Kontraktionen über zu gehen. Ab diesem Zeitpunkt konnte man die Kontraktionen mit bloßem Auge an der Deflektion der Stäbchen erkennen.

Auf Abbildung 24 ist ein ganzes EHT nach 15 Tagen in Kultur dargestellt. Links unten und rechts oben im Bild sind die Silikonstäbchen, das EHT ist an den Enden um die Stäbchen

herum gewachsen. Die EHTs waren in der Mitte dünner als an den beiden Seiten, wodurch sich die typische konkave Erscheinung ergibt.

3.9 Analyse der EHTs: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für diese Untersuchungen wurden EHTs mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung). In Abbildung 25 sind die Färbungen von 42 Tage alten EHTs (A, B, C und D) und von acht Tage alten EHTs (E und F) dargestellt.

Im Längsschnitt der 42 Tage alten EHTs ließen sich Zellen von der nur leicht gefärbten Matrix unterscheiden. Viele Zellen erschienen hierbei als Zellbündel, in denen sich die Zellen den Kraftlinien nach ausgerichtet haben und über mehrere Millimeter im EHT erstreckten. Innerhalb des EHTs machten zelluläre Strukturen weniger als 50% aus, der größere Teil war Fibrinmatrix. Die äußere Schicht des EHTs war zum Teil mit sehr dünnen und langgestreckten Zellen besiedelt, gut zu erkennen auf Abbildung 25 (B und C) am oberen Rand des EHTs. Die Querstreifung der Sarkomere war in den stark vergrößerten Aufnahmen (Abbildung 25 C und D) deutlich zu erkennen. In den jüngeren EHTs (acht Tage alt) konnte man viele Kardiomyozyten erkennen, die sich entlang der Kraftlinien orientierten. Stränge wie in den 40 Tage alten EHTs waren nicht zu erkennen, ebenso wenig haufenartige Ansammlungen von Zellen. Insgesamt waren in den EHTs unabhängig vom Alter viele nicht zu identifizierende Zellen und Zellansammlungen zu finden.

3.10 Analyse der EHTs: Immunfluoreszenz

Abbildung 26 (A) zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von α -Aktinin und damit die Sarkomerstruktur der Kardiomyozyten als typische Querstreifung. Die Orientierung entlang der Kraftlinien, in diesem Fall links unten nach rechts oben, war offensichtlich, ebenso wie die gleichmäßige Verteilung der sarkomerischen Strukturen innerhalb der Zellen. Auf Abbildung 26 (C und D) ist eine Übersichtsaufnahme zu sehen, also die gesamte Breite des EHTs im mittleren Teil. In blau wurde das intermediäre Filament (IF) Vimentin dargestellt, als Marker für Fibroblasten-artige Zellen. Teil (D) der Abbildung ist an genau derselben Position entstanden, nur in der konfokalen Ebene einige Mikrometer tiefer. Bild (C) zeigt also die Oberfläche, mit zahlreichen Vimentin-positiven Zellen über den gesamten Ausschnitt

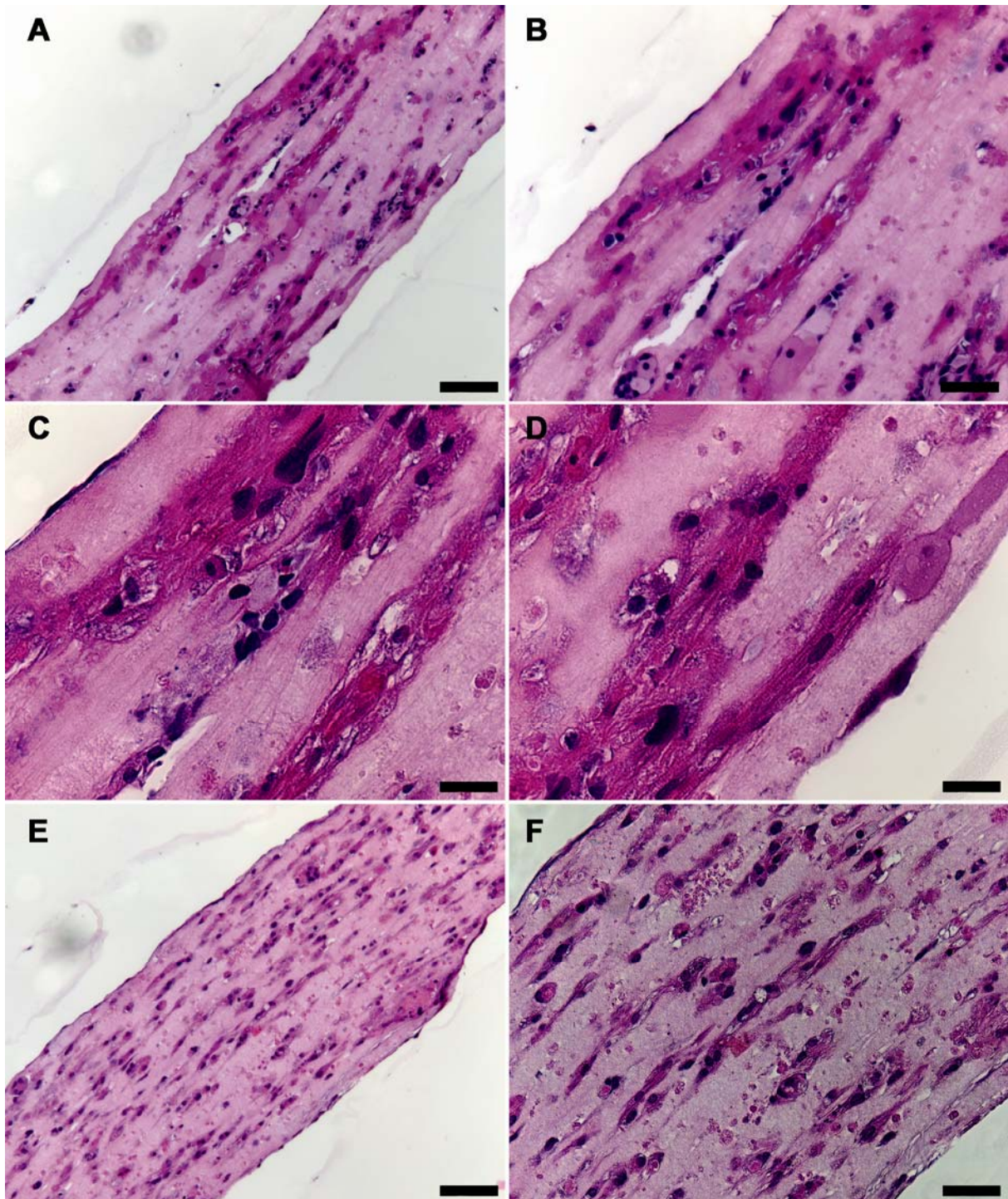


Abbildung 25: HE-Färbung von EHTs, (A) bis (D): EHT, 42 Tage alt, (E) und (F): EHT, 8 Tage alt, Maßstab 200 µm (A, E), 100 µm (B, F), 50 µm (C, D).

verteilt. Bild (D) zeigt ebenfalls die an der Oberfläche positionierten Vimentin-positiven Zellen, allerdings als Streifen links und rechts im Bild, während im mittleren Bereich die α -Aktinin-positiven Zellen zu sehen sind. Die verzweigte Struktur der Sarkomer-Stränge war gut zu erkennen, ebenso wie eine haufenartige Zellansammlung am unteren Ende der Darstellung. Teil (B) der Darstellung zeigt Connexin-43-positive, punktförmige Strukturen auf

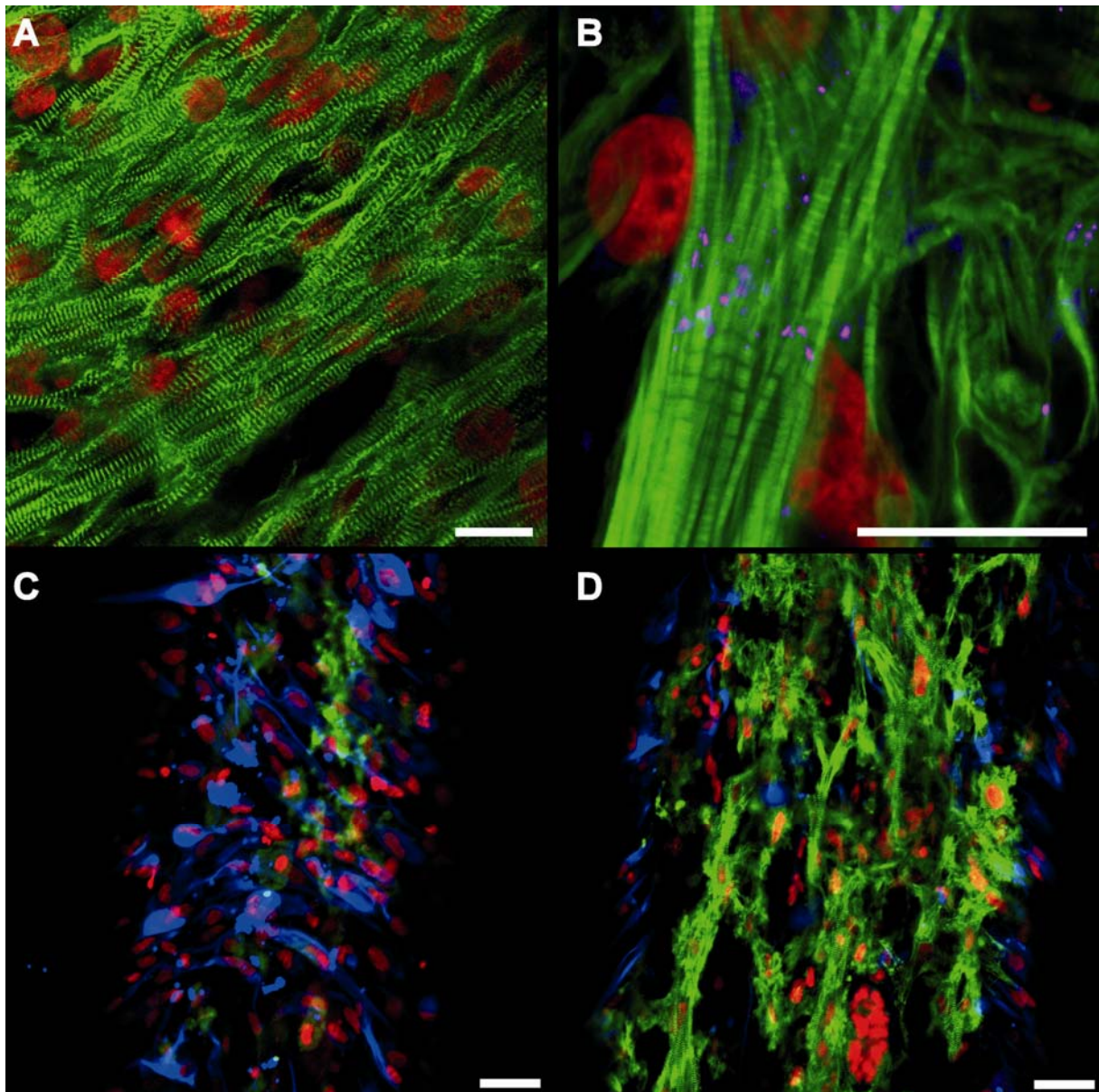


Abbildung 26: Immunfluoreszenz-Färbungen von EHTs, (A) grün= α -Aktinin, (B) grün= Phalloidin, magenta= Connexin-43, (C) und (D): grün= α -Aktinin, blau= Vimentin, (A) bis (D) rot= DNA (DRAQ5), Maßstab 20 μ m (A), (B), 50 μ m (C) und (D).

Phalloidin gefärbten Zellen. Auch nach der unspezifischen Aktin-Färbung durch Phalloidin waren die quergestreiften Sarkomere leicht zu erkennen.

3.11 Genexpression in EHTs und EBs

Zusätzlich zur histologischen Beurteilung wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um den Einfluss des EHT-Formats und den Reifegrad der Kardiomyozyten im EHT zu beurteilen. Hierfür wurden die Transkriptkonzentrationen von zwei bis drei Wochen alten EBs, von sieben bis acht Wochen alten EBs und von ebenfalls insgesamt sieben bis acht Wochen alten

EHTs miteinander verglichen. Untersucht wurden die kardialen Gene MYH6, MYH7, TNNI1, TNNI3, ACTC1 und SLC8A1.

A-MHC (MYH6) war in den zwei bis drei Wochen alten EBs am stärksten exprimiert. Nach sieben bis acht Wochen war die Expression sowohl im EB-Format, als auch im EHT-Format geringer. Im Gegensatz dazu war die Expression von β -MHC (MYH7) in beiden Formaten höher. Im EHT-Format war diese erhöhte Expression deutlich stärker ausgeprägt als in den EBs. Die Expression von ssTNI (skeletal, TNNI1) war in beiden Gruppen des EB-Formats ähnlich, in den EHTs geringer. Nach sieben bis acht Wochen war die Expression von cTNI (TNNI3) im EB und im EHT-Format ähnlich hoch, in den EBs war es nach zwei bis drei Wochen nicht exprimiert. Sowohl α -Aktin (ACTC1) als auch NCX (SLC8A1) wurden in EBs und EHTs stärker exprimiert, in den EHTs auf einem etwas höheren Niveau.

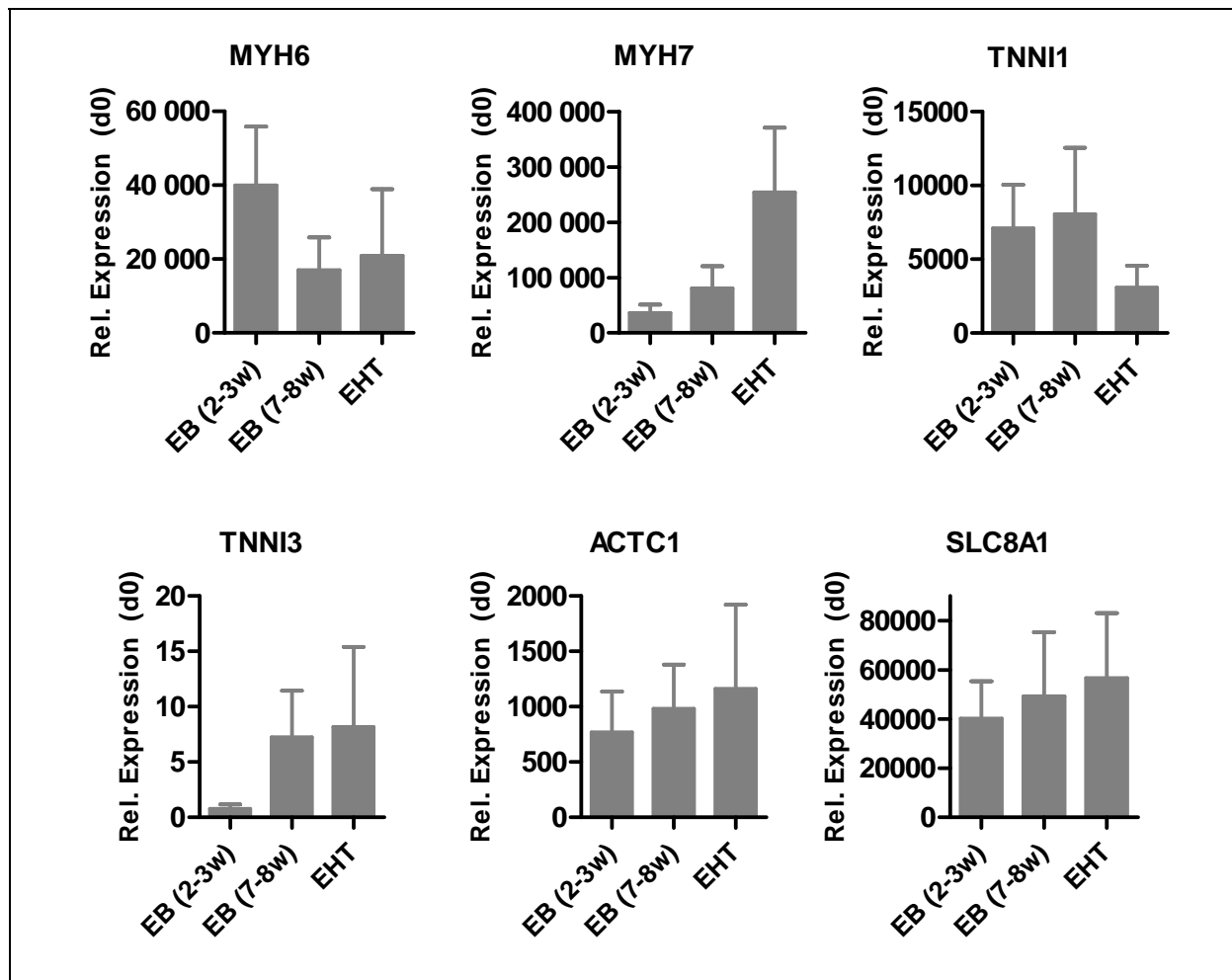


Abbildung 27: Genexpressionsanalyse, Vergleich von EBs vor der Dissoziation (EBs 2-3w), EBs nach weiteren 5 Wochen in Suspensionskultur (EBs 7-8w) und EHTs, Werte normalisiert auf undifferenzierte hESC (= d0), Mittelwerte \pm SD, n=4.

3.12 Elektrophysiologie

Um die aus den humanen embryonalen Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten genauer in Bezug auf Subtyp und Reife zu beschreiben, wurden Aktionspotentiale abgeleitet. Dazu wurden die gleichen Gruppen wie bei der Genexpressionsanalyse (Kapitel 3.11) untersucht, also entweder differenzierte EBs vor der Dissoziation in Einzelzellen bzw. vor der Generation von EHTs (EBs 2-3w), oder, um die Reifung der Zellen nachvollziehen zu können, EHTs und EBs etwa fünf Wochen später (EBs 7-8w bzw. EHT). Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 28 dargestellt.

Alle untersuchten Zellen generierten Aktionspotentiale, die synchron zur Kontraktion abgeleitet werden konnten. Die Frequenzen variierten zwischen 0,2 bis 1,3 Hz in den EBs und 0,08 bis 0,7 Hz in der EHTs. Mit steigender Frequenz nahm die Dauer der Aktionspotentiale ab. Eine Übersicht der gemessenen Werte findet sich in Tabelle 6. Bei den EHTs konnten aufgrund unterschiedlicher Aktionspotentialdauer (APD_{80} ; 260 bis 1200 ms) zwei Gruppen gebildet werden, und zwar eine Gruppe mit kurzen Aktionspotentialen (*short APD*) und eine mit längeren (*long APD*). Generell waren die Aktionspotentiale von Kardiomyozyten in EHTs länger als in EBs. EHTs mit langen Aktionspotentialen hatten höhere Aufstrichgeschwindigkeiten als EHTs mit kurzen Aktionspotentialen ($10,4 \pm 1,2$ vs. $5,6 \pm 0,7$ V/s), außerdem konnten hin und wieder frühe Nachdepolarisationen (*early after depolarisation – EAD*) beobachtet werden. Die maximalen diastolischen Potentiale (MDP) lagen bei den EBs nach zwei bis drei Wochen bei $-58 \pm 1,0$ mV. Nach sieben bis acht Wochen im EB Format war keine signifikante Veränderung zu erkennen ($-61 \pm 0,7$ mV). Die MDPs von Zellen im EHT lagen bei ca. -49 mV, unabhängig von der Gruppe der Aktionspotentialdauer.

Nach Behandlung mit dem Calciumkanalblocker Nisoldipin ($1 \mu\text{M}$) hörte die spontane Aktivität in allen untersuchten Proben auf (Abbildung 28 C). Applikation von Tetrodotoxin (TTX; $3 \mu\text{M}$) führte zu einer signifikanten Verringerung der Aufstrichgeschwindigkeit und Verlängerung der Aktionspotentialdauer ($P < 0.005$, $n=5$; Abbildung 28 A). Applikation von E-4031 (300 nM) verlängerte die Aktionspotentialdauer signifikant ($P < 0.005$, $n=4$; Abbildung 28 B).

	APD ₈₀ (ms)	MDP (mV)	APA (mV)	dV/dt _{max} (V/s)
EB (2-3 w; n = 14)	268 ± 14	-58 ± 1.0	82 ± 3.4	8.2 ± 0.6
EB (7-8 w; n = 13)	384 ± 33*	-61 ± 0.7	88 ± 2.0	12.2 ± 1.0*
EHT short (n = 7)	341 ± 23*	-49 ± 1.6*	66 ± 3.6*	5.6 ± 0.7*
EHT long (n = 7)	887 ± 71*	-49 ± 1.2*	85 ± 2.8	10.4 ± 1.2

Tabelle 6: Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen, APD₈₀= Aktionspotentialdauer, MDP= maximales diastolisches Potential, APA= Aktionspotential Amplitude, dV/dt_{max}= Aufstrichgeschwindigkeit, Mittelwerte ± SEM, *= P<0.05.

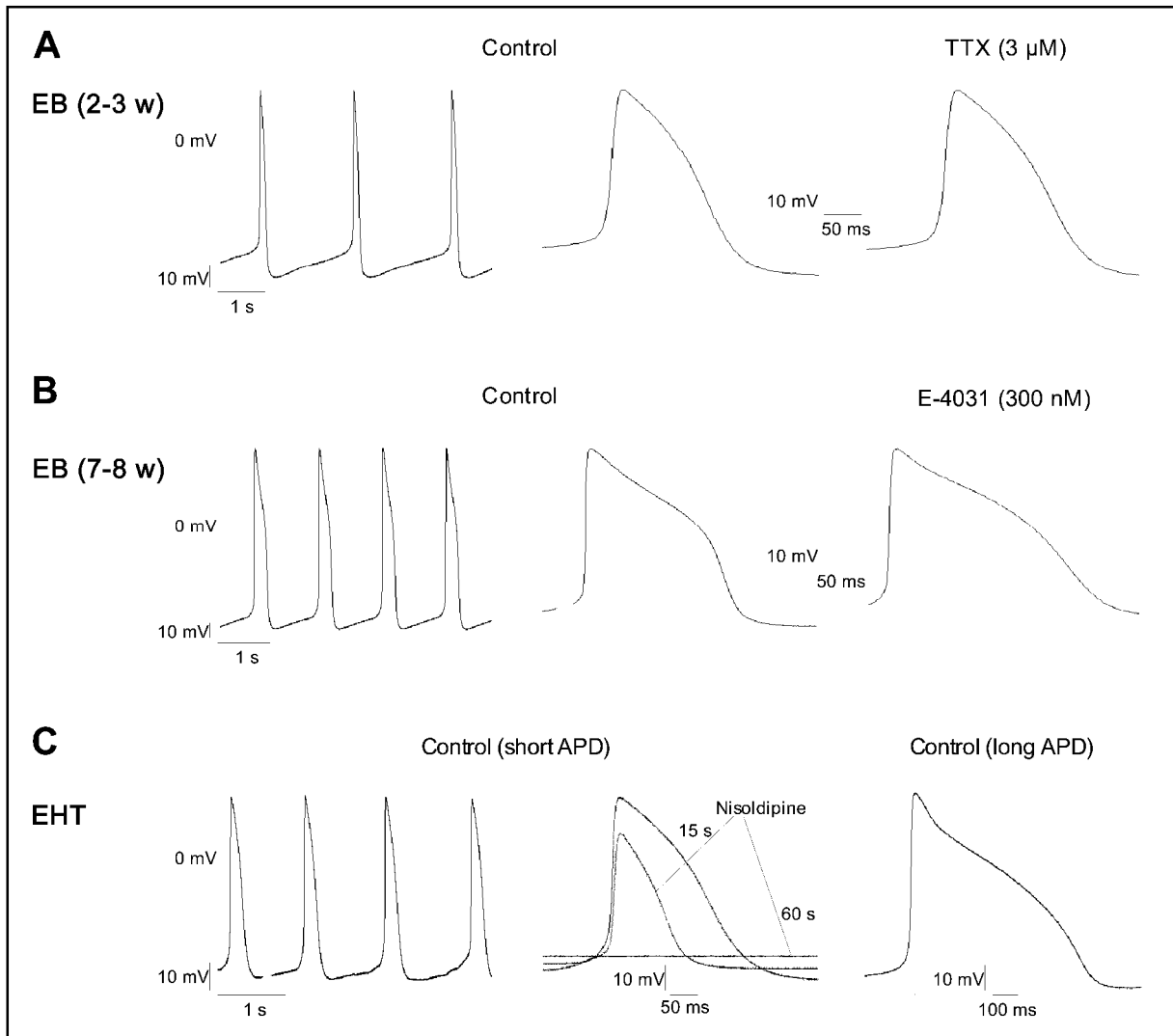


Abbildung 28: Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen, dargestellt sind repräsentative Aktionspotentiale, TTX= Tetrodotoxin. (A) Messungen an zwei bis drei Wochen alten Embryoidkörperchen (EBs), (B) Messungen an sieben bis acht Wochen alten EBs, (C) Messungen an EHTs, die linke und rechte Darstellung zeigen die Gruppen mit kurzen (short APD) und langen (long APD) Aktionspotentialen, die mittlere Darstellung zeigt den Einfluss von Nisoldipin in drei Stufen: vorher, nach 15 s und nach 60 s.

3.13 Funktionelle Analyse der EHTs

3.13.1 Messungen der Kontraktilität

Um den Einfluss von Substanzen oder anderen Einflüssen wie zum Beispiel der extrazellulären Calciumkonzentration auf das Schlagverhalten der EHTs sichtbar zu machen, wurden sie in der selbstentwickelten Anlage gemessen. Aus den Rohdaten, also der Kraftentwicklung über der Zeit, wurden die Parameter Frequenz, Kraft, Kontraktionszeit (T1), Relaxationszeit (T2), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV) und Relaxationsgeschwindigkeit (RV) automatisch berechnet. Für die Auswertung der Experimente wurde die Veränderung der Werte bei jedem EHT betrachtet. Dies war aufgrund der zum Teil erheblichen Unterschiede zwischen den EHTs bzw. zwischen den Chargen von EHTs notwendig. Die gemessenen Werte für jedes EHT nach den Interventionen wurden auf die Werte der Referenzmessung (Ausgangslage) des jeweiligen EHTs relativiert. Diese relativen Veränderungen wurden über die biologischen Replikate gemittelt und in Prozent angegeben.

3.13.2 Calcium-Konzentrationswirkungskurve

Die physiologische Reaktion einer Herzmuskelzelle auf eine ansteigende extrazelluläre Calciumkonzentration ist eine vermehrte Kraftentwicklung. Die humanen EHTs wurden in der selbstentwickelten Messanlage unter dem Einfluss von Calcium in einer Konzentration von 0,2 bis 3,0 mM im Medium gemessen. Diese Messungen fanden ohne elektrische Stimulation statt. Die Referenzmessung (Ausgangslage) fand in EHT-Medium statt. Ausgewertet wurden die Parameter Kraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit und Frequenz.

Ausgehend von einer Calciumkonzentration von 1,8 mM im EHT-Medium (Ausgangslage), war die Kraft bei 0,2 mM Ca^{2+} auf $18,0 \pm 3,4\%$ ($n=4$) vermindert. Zunehmende Calciumkonzentrationen gingen mit einem Kraftanstieg einher. Interessanterweise war auch bei Konzentrationen über dem physiologischen Wert von 1,8 mM ein Anstieg der Kraft über die Werte der Referenzmessung zu beobachten. Bei 3 mM Ca^{2+} war die Kraft bei $124,7 \pm 18,3\%$ ($n=4$) der Ausgangslage. Die Frequenz blieb im Wesentlichen unbeeinflusst von der Calciumkonzentration. Sie war bei 0,2 mM Ca^{2+} etwas niedriger ($79,2 \pm 14\%$, $n=4$) und bei höheren Konzentrationen etwas erhöht ($128,9 \pm 42,9\%$ bei 3,0 mM Ca^{2+} , $n=4$). Die Parameter

Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit verhielten sich analog zur Kraft. Bei 0,2 mM Ca^{2+} waren sie nicht auswertbar.

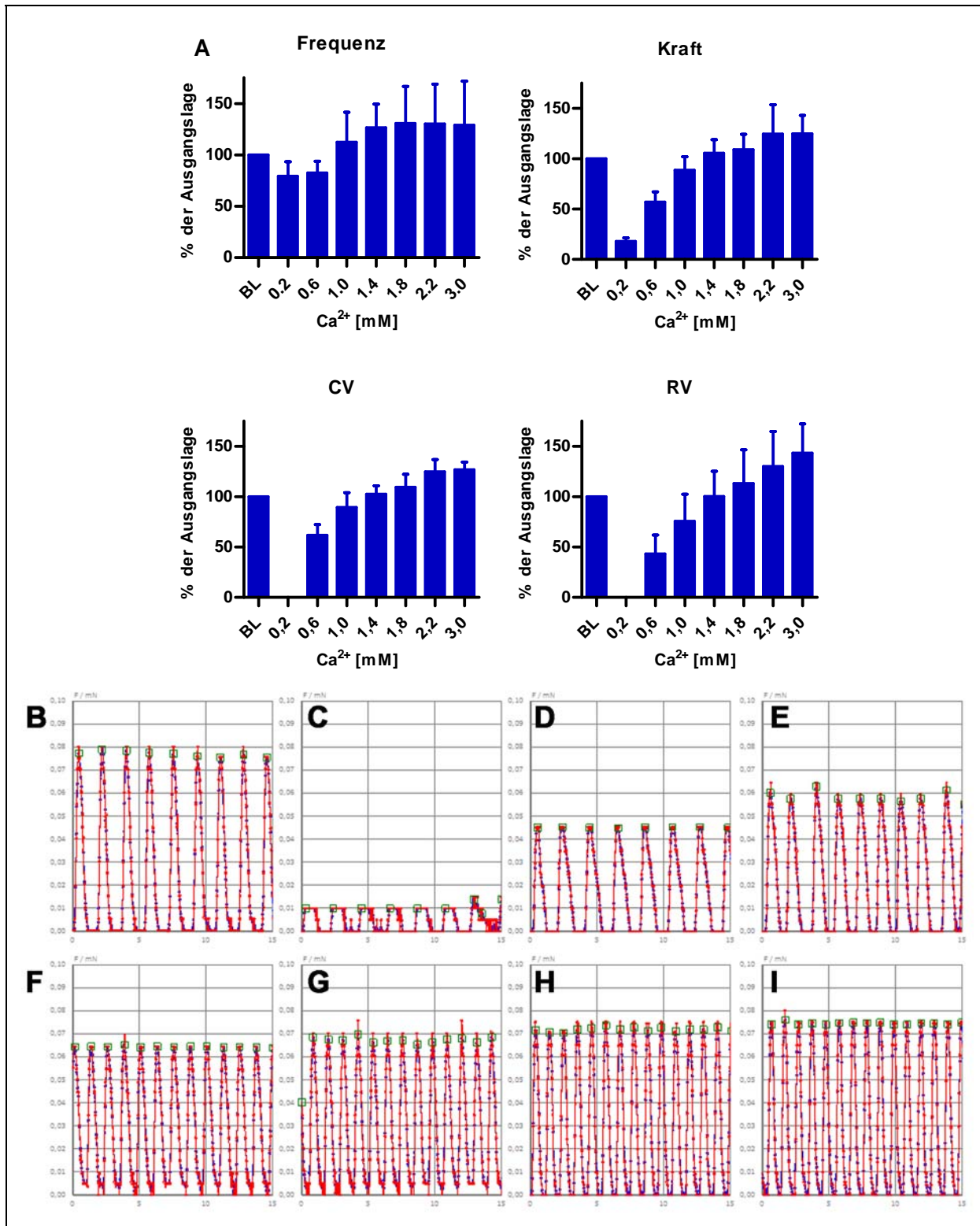


Abbildung 29: Einfluss von extrazellulärem Calcium, (A) Die angegebenen Werte sind auf die Ausgangswerte normalisiert, CV= Kontraktionsgeschwindigkeit, RV= Relaxationsgeschwindigkeit, BL= Ausgangslage, (B) bis (I) Originaldaten der Kontraktionen eines repräsentativen EHTs, (B) Referenzmessung, (C) 0,2 mM, Messung an der Empfindlichkeitsgrenze (D) 0,6 mM, (E) 1,0 mM, (F) 1,4 mM, (G) 1,8 mM, (H) 2,2 mM und (I) 3,0 mM Calcium.

3.13.3 Reaktion auf sympathische und parasympathische Stimulation

Die Reaktion der EHTs auf sympathische und parasympathische Stimulation wurde ebenfalls in der selbstentwickelten Messanlage untersucht. Zur adrenergen Stimulation wurde Isoprenalin in einer Konzentration von 100 nM verwendet, für die muskarinerge Stimulation Carbachol (Carbamoylchlorid, 10 μ M). Die Effekte der Substanzen wurden bei einer Calcium-Konzentration von 0,6 mM gemessen.

Kraft und Frequenz waren nach Inkubation mit 0,6 mM Calcium auf etwa 50 bis 70% der Referenzwerte zurückgegangen. Nach Zugabe von Isoprenalin (100 nM) konnte eine Erhöhung aller vier Werte beobachtet werden. Die Effekte auf die Frequenz waren am stärksten ausgeprägt, sie stieg von $69,5 \pm 9,4\%$ bei 0,6 mM Calcium auf $106,1 \pm 8,2\%$ ($n=4$) an. Dies entspricht einer relativen Erhöhung auf 153%. Weniger ausgeprägt war der Effekt auf die Kraft. Sie stieg von $62,4 \pm 20,6\%$ bei 0,6 mM Calcium auf $77,3 \pm 10,1\%$ ($n=4$) an. Dies entspricht einem relativen Anstieg auf 124%.

Nach Zugabe von zusätzlich 10 μ M Carbachol war eine Reduktion beider Parameter die Folge. Wieder war der Effekt auf die Frequenz am stärksten ausgeprägt, sie fiel von $106,1 \pm 8,2\%$ auf $86,6 \pm 14,0\%$ ($n=4$) ab. Kraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit zeigten ebenfalls niedrigere Werte, allerdings weniger stark ausgeprägt. Die Kraft fiel von $77,3 \pm 10,1\%$ auf $74,0 \pm 10,7\%$ ($n=4$).

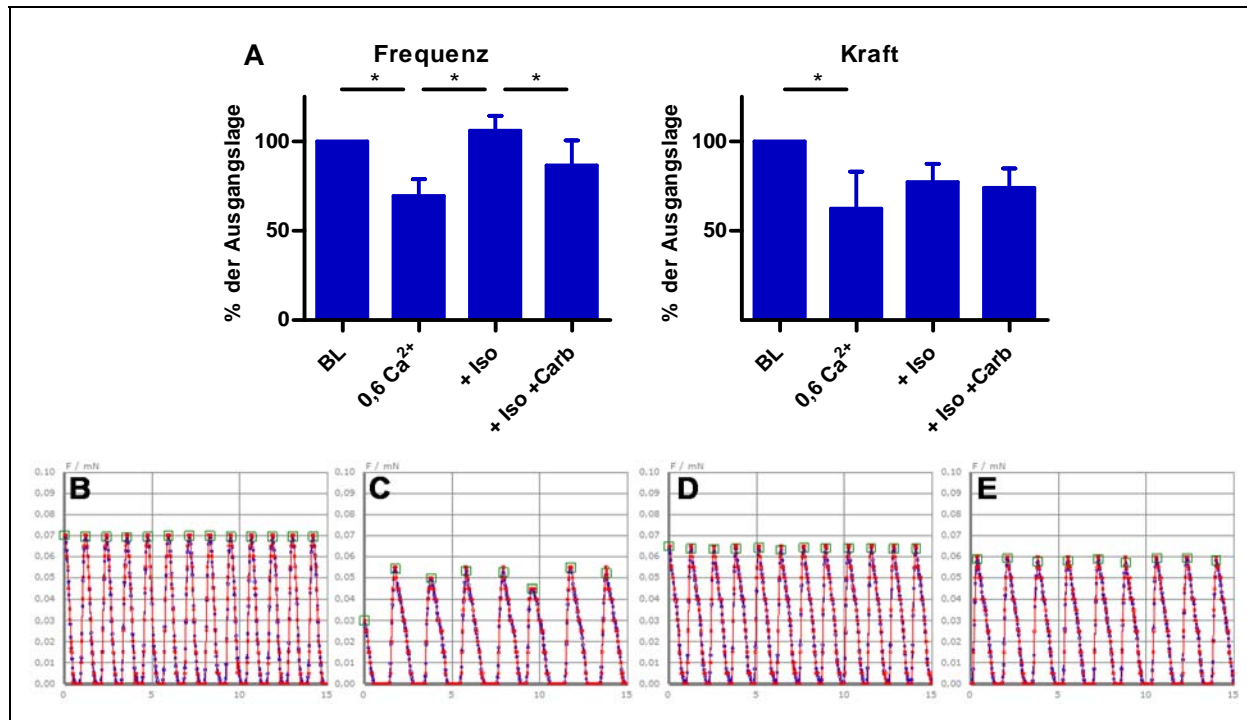


Abbildung 30: Einfluss von sympathischer (Isoprenalin, 100 nM) und parasympathischer (Carbachol, 10 µM) Stimulation auf die EHTs, (A) n=4, *=p<0,05, (B) bis (E) Originaldaten der Kontraktionen eines repräsentativen EHTs, (B) Referenzmessung, (C) 0,6 mM Calcium, (D) zusätzlich 100 nM Isoprenalin, (E) zusätzlich 10 µM Carbachol.

3.13.4 Negative Inotropie – Effekt von Verapamil

Um durch Substanzen verursachte negativ inotrope Effekte zu untersuchen, wurde der Einfluss von Verapamil im Bereich der therapeutischen Konzentrationen untersucht, in diesem Experiment 3,3 bis 30 nM. In höheren Konzentrationen von über 200 nM hat Verapamil auch eine Affinität zum hERG-Kanal, in den untersuchten, niedrigeren Konzentrationen gilt es als ein spezifischer Calciumkanalblocker (L-Typ).

Unter dem Einfluss von Verapamil blieb die Frequenz der EHTs unverändert. Die Kraft hingegen nahm konzentrationsabhängig auf bis zu 72,6±18,4% (n=11) bei 30 nM ab. Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nahmen ebenfalls konzentrationsabhängig ab, wobei der Effekt auf die Kontraktionsgeschwindigkeit ausgeprägter war. Der Quotient CV/RV sank dadurch etwas, die absolute Kontraktionsgeschwindigkeit war aber immer noch höher als die absolute Relaxationsgeschwindigkeit. Die Kontraktionszeit blieb unverändert, die Relaxationszeit hingegen nahm etwas ab.

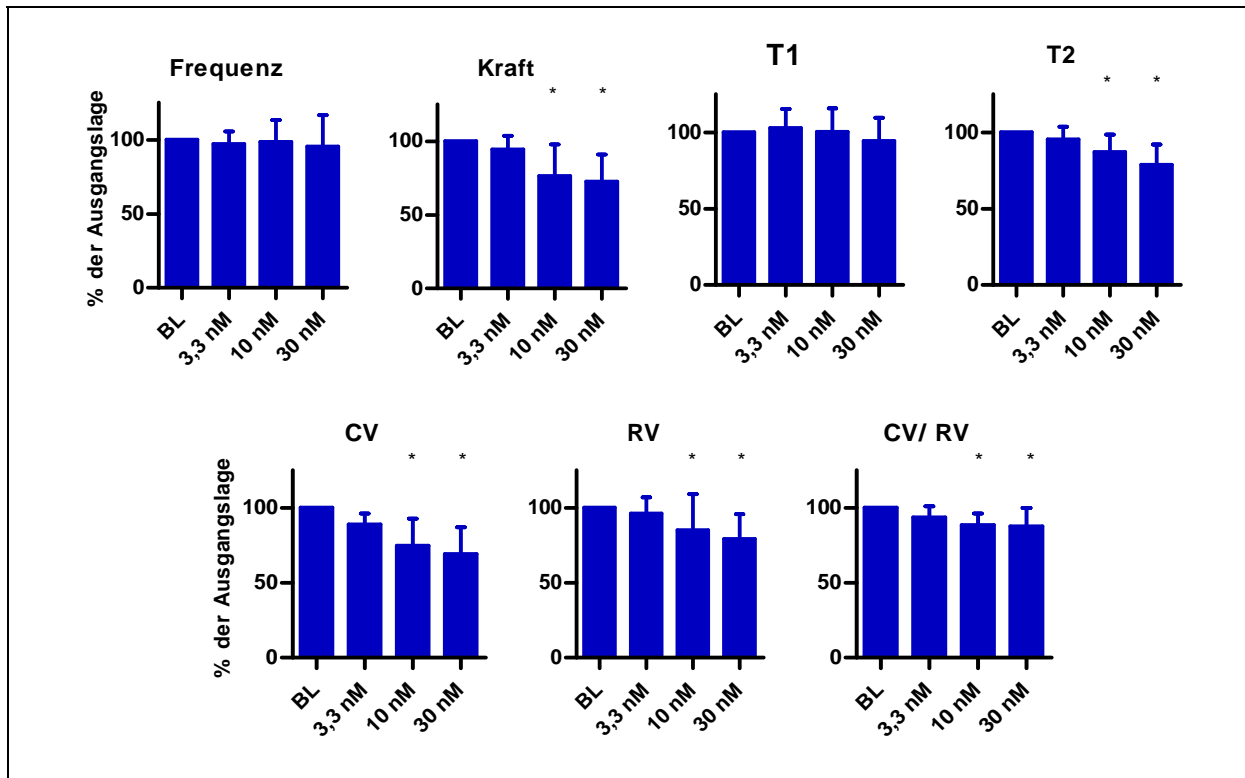


Abbildung 31: Verapamil, Ergebnisse der automatisierten Messung (Kontraktionsparameter), T1= Kontraktionszeit, T2= Relaxationszeit, CV= Kontraktionsgeschwindigkeit, RV= Relaxationsgeschwindigkeit, CV/RV= Verhältnis CV zu RV, BL= Ausgangslage, n=12, *=p<0,05.

3.13.5 Verhältnis von Kraft und Frequenz

Das Verhältnis von Kraft und Frequenz (*force-frequency relationship*, Bowditch-Effekt) wurde in der Messanlage untersucht, indem ein EHT elektrisch stimuliert wurde. Die Frequenz wurde innerhalb von 100 Sekunden von 0,5 Hz in Schritten von 0,25 Hz auf 2 Hz erhöht. In Abbildung 32 ist das vollständige Kontraktionsdiagramm abgebildet. Die Eigenfrequenz des untersuchten EHTs lag bei etwas unter 0,5 Hz (28 BPM). Bis zu einer Frequenz von 1 Hz blieb die Kraftentwicklung stabil, bei einer Frequenz von 1,25 Hz nahm sie innerhalb einiger Kontraktionen um etwa 10 bis 15% ab. Eine weitere Erhöhung der Frequenz auf bis zu 2 Hz hatte keinen weiteren Einfluss auf die Kraft. Nach Abschalten der Stimulation erreichte die Kraft innerhalb weniger Kontraktionen wieder ihr ursprüngliches Niveau, die Frequenz erreichte ihr ursprüngliches Niveau nicht sofort.

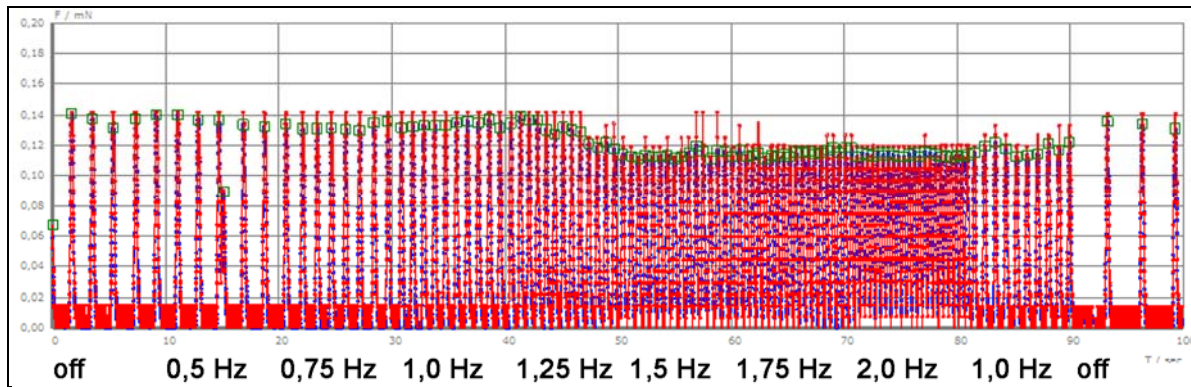


Abbildung 32: Kontraktionen unter elektrischer Stimulation zur Untersuchung der Kraft-Frequenz Beziehung, Darstellung der Kraft (mN) über der Zeit (s), unten sind die Frequenzen der elektrischen Stimulation angegeben (Impuls: 10 V, 10 ms), die grünen Quadrate zeigen eine automatisch erkannte Kontraktion an.

3.13.6 Stabilität der EHTs über den Messzeitraum

Eine Voraussetzung für die Messung der kontraktiven Parameter war deren Stabilität über den Zeitraum, innerhalb dessen gemessen wurde. Um diese zu beurteilen, wurden die ohne Einfluss von Substanzen gemessenen Werte (Messungen der Ausgangslage) der EHTs zum jeweiligen Zeitpunkt gemittelt und über der Zeit aufgetragen. Es sind insgesamt Daten von EHTs aus drei verschiedenen Chargen berücksichtigt worden, in einem Zeitraum von vier bis 53 Tagen. Jeder Wert wurde auf den eigenen Mittelwert des jeweiligen EHTs über den gesamten Zeitraum in Relation gesetzt. So blieben die Unterschiede zwischen den EHTs unberücksichtigt, im Gegensatz zur Entwicklung und Stabilität der EHTs. Da nicht alle EHTs zu gleichen Zeitpunkten gemessen wurden, variiert die Anzahl der Messwerte pro Zeitpunkt von zwei bis zwölf.

Bis etwa Tag zehn dauerte es, damit die EHTs das durchschnittliche Niveau der gesamten Messung erreicht hatten. Mit der Kraft hatten an Tag zehn auch die anderen Parameter dieses Niveau erreicht. Die Frequenz bildete die Ausnahme, hier waren die anfänglichen Messwerte höher und es war ein stetiger Abwärtstrend über die Zeit zu erkennen. Nach den ersten zehn Tagen waren alle übrigen Parameter stabil insofern, als dass sie keine grundlegende Tendenz zu einer Erhöhung oder Verringerung zeigten. Die Werte unterlagen Schwankungen, die sich hauptsächlich im Bereich 75 bis 125% des Mittelwertes abspielten.

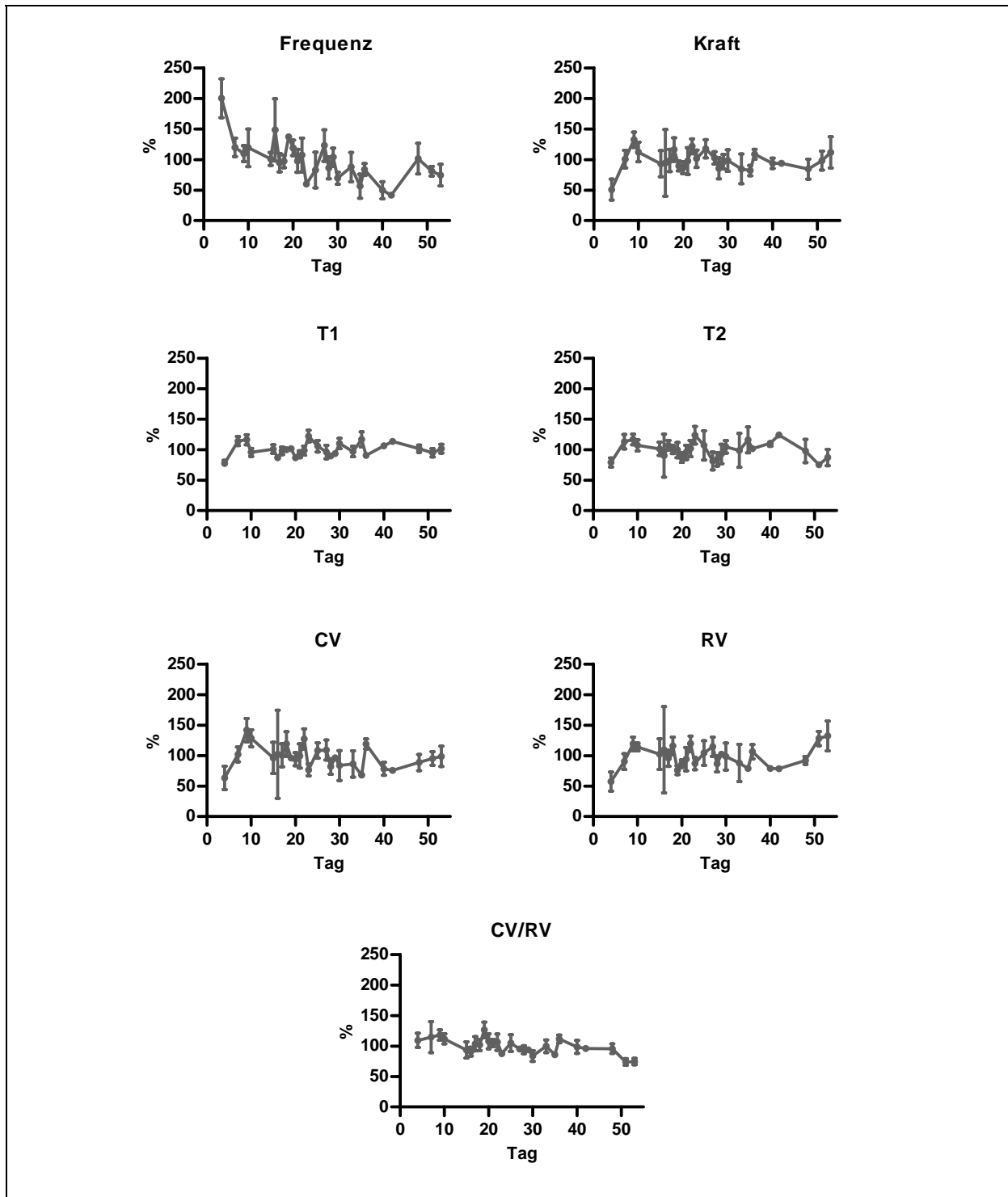


Abbildung 33: Stabilität der gemessenen Parameter über die Zeit, Werte sind für jedes EHT auf den eigenen Mittelwert aus allen Messpunkten relativiert (= 100%), T1=Kontraktionszeit, T2=Relaxationszeit, CV=Kontraktionsgeschwindigkeit, RV=Relaxationsgeschwindigkeit, CV/RV=Verhältnis von CV zu RV, Mittelwert \pm SD, n= 2-12.

3.14 Einfluss von Substanzen mit arrhythmogenem Potential

3.14.1 Auswertung der gemessenen Parameter

Um die Frage zu beantworten, ob das entwickelte System von EHTs aus humanen embryonalen Stammzellen als Assay für arrhythmogene Effekte von Substanzen verwendet werden kann, wurde es anhand von bekanntermaßen Arrhythmie-verursachenden Wirkstoffen validiert. Im Zentrum des Interesses standen LQT-verlängernde bzw. TdP-verursachende Substanzen mit einer Affinität zum hERG-Kanal, die in einem Artikel von Redfern und Kollegen (Redfern et al. 2003) zusammengefasst wurden.

3.14.1.1 Chinidin

Chinidin wurde in Konzentrationen von 10, 100, 300 und 1000 nM getestet, die $IC_{50}(hERG)$ liegt bei ca. 300 nM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 30 Bildern pro Sekunde an insgesamt vier EHTS durchgeführt.

Bis zu einer Konzentration von 100 nM blieben die gemessenen Parameter unverändert, nur bei der Kraft zeigte sich bei 10 und 100 nM eine Tendenz zu erhöhten Werten. Bei 300 nM nahm die Relaxationsgeschwindigkeit signifikant ab, während die Kontraktionsgeschwindigkeit ebenfalls verringert war, aber kein signifikantes Niveau erreichte. Chinidin in einer Konzentration von 1000 nM führte zur Verminderung von Frequenz, Kraft, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. T1, T2 und das Verhältnis CV/RV blieben bei allen Konzentrationen unverändert.

Die Kontraktionsdiagramme (Abbildung 34 B-F) zeigten ab einer Chinidin-Konzentration von 300 nM erste irreguläre Kontraktionen. Bei 1000 nM waren keine koordinierten Kontraktionen mehr zu beobachten.

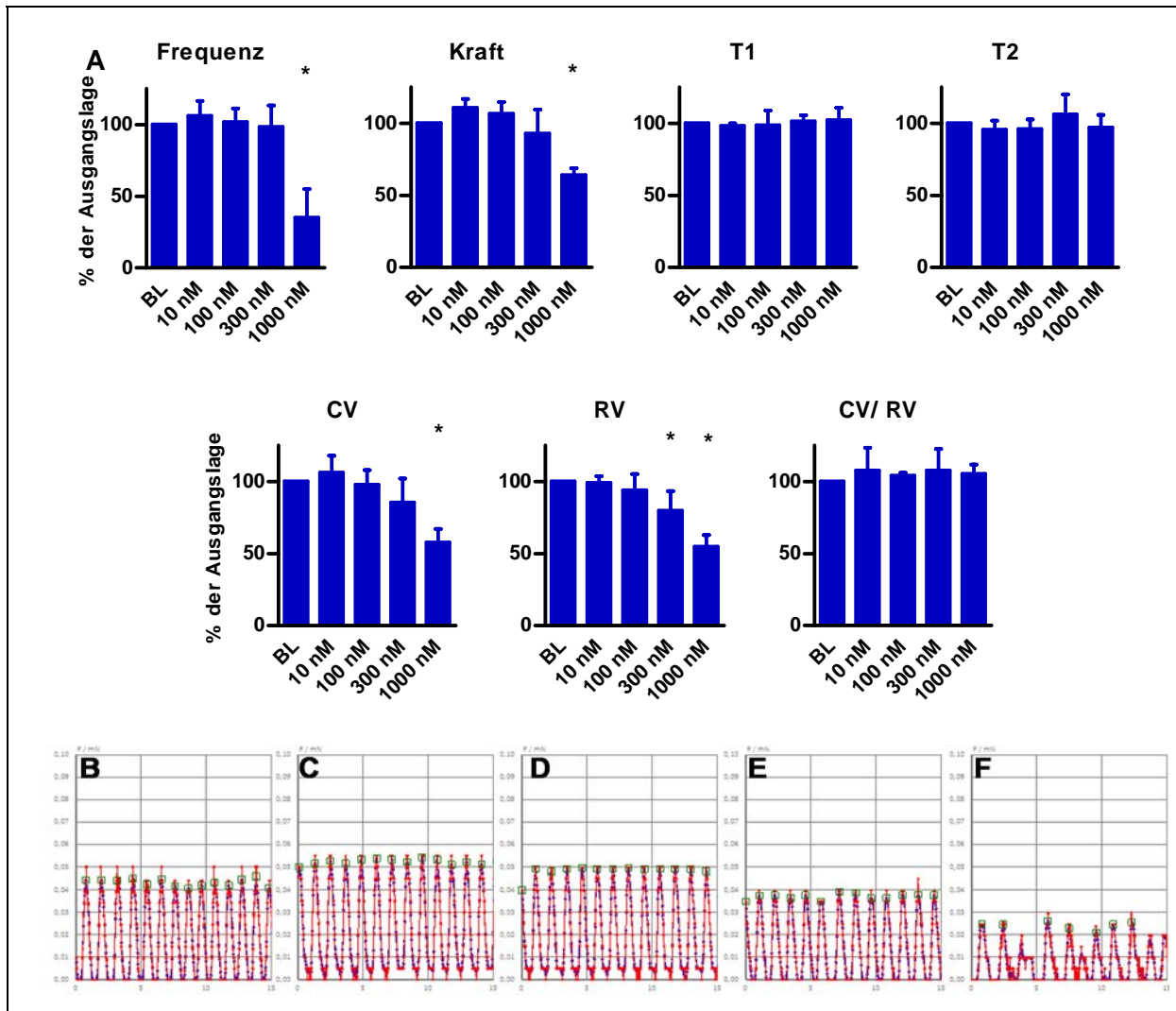


Abbildung 34: Chinidin, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2), BL= Ausgangslage, (B) bis (F) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 10 nM, (D) 100 nM, (E) 300 nM, (F) 1000 nM.

3.14.1.2 Sertindol

Sertindol wurde in Konzentrationen von 1, 10, 30, 100 und 300 nM gemessen. Die IC_{50} (hERG) liegt bei ca. 20 nM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 30 Bildern pro Sekunde an insgesamt vier EHTs durchgeführt.

Eine Konzentration von 1 nM führte zu keinen Veränderungen, allerdings führten bereits 10 nM zu einer signifikanten Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit, die sich bei höheren Konzentrationen weiter reduzierte. Bei 30 nM war das Verhältnis CV/RV am deutlichsten erhöht, ohne dass der Unterschied zur Ausgangslage signifikantes Niveau erreichte. Kraft und Kontraktionsgeschwindigkeit gingen ab einer Konzentration von 100 nM signifikant

zurück, 300 nM Sertindol führen zusätzlich zum Rückgang der Frequenz. T1 und T2 blieben über alle Konzentrationen unverändert. Zwei von vier gemessenen EHTs zeigten bei 300 nM keine spontanen Kontraktionen mehr.

Bis zu einer Konzentration von 30 nM waren keine Veränderungen im Kontraktionsdiagramm festzustellen (Abbildung 35 B-E). Ab 100 nM Sertindol kam es zu irregulären Ereignissen und bei 300 nM waren kaum noch Kontraktionen messbar (Abbildung 35 F-G).

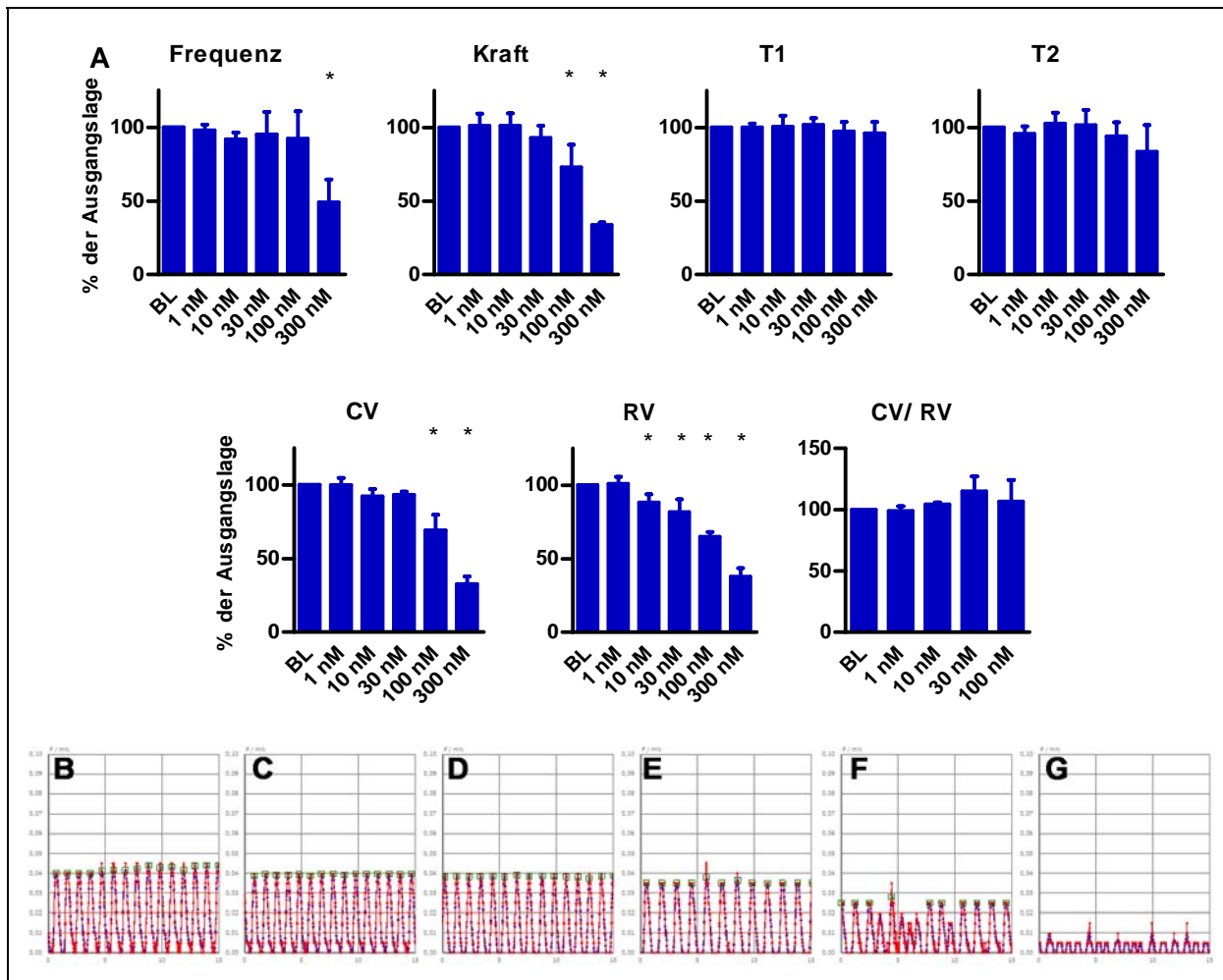


Abbildung 35: Sertindol, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (G) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 1 nM, (D) 10 nM, (E) 30 nM, (F) 100 nM, (G) 300 nM.

3.14.1.3 Cisaprid

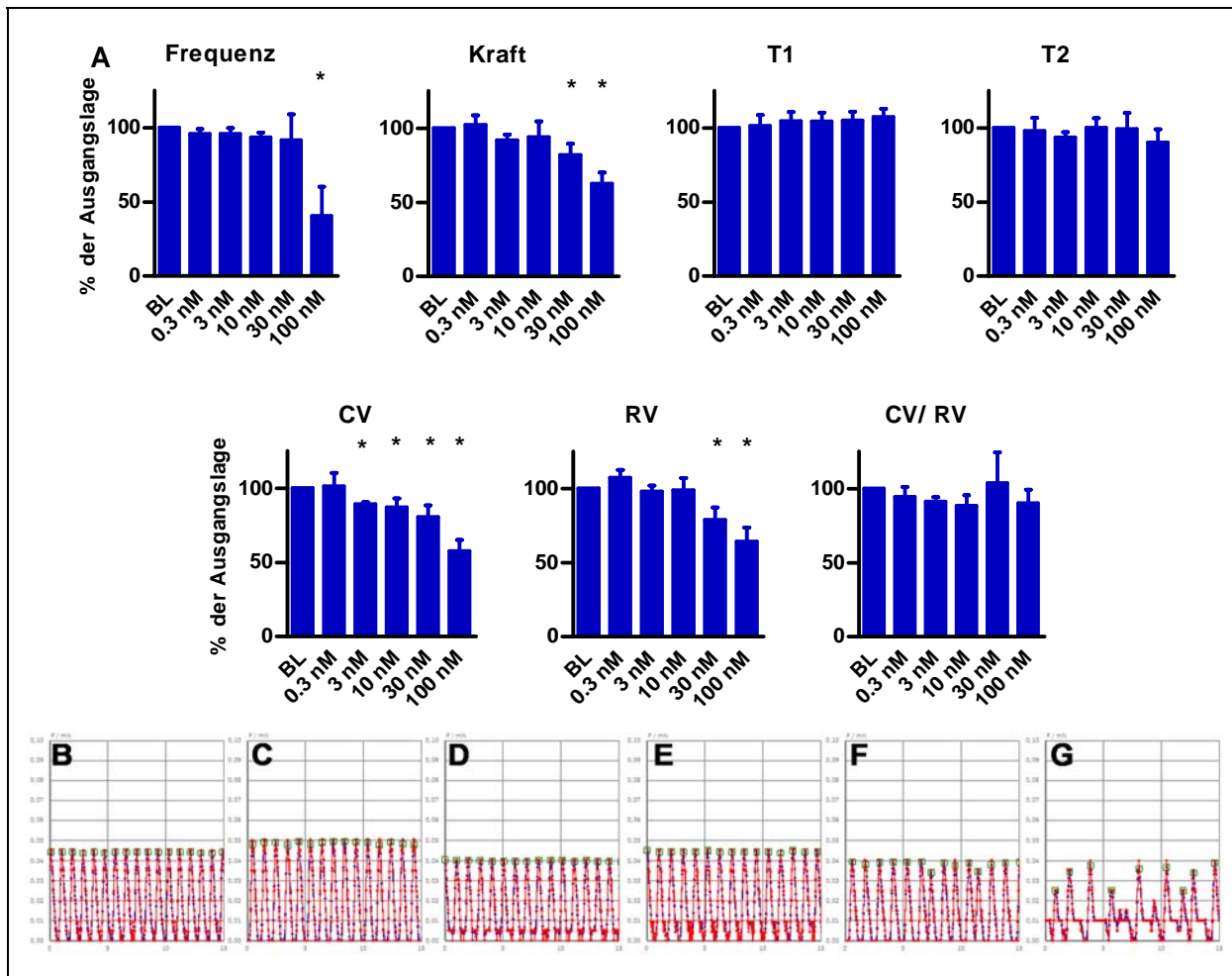


Abbildung 36: Cisaprid, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2), BL= Ausgangslage; (B) bis (G) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 0,3 nM, (D) 3 nM, (E) 10 nM, (F) 30 nM, (G) 100 nM.

Cisaprid wurde in Konzentrationen von 0,3; 3; 10; 30 und 100 nM gemessen. Die IC_{50} (hERG) liegt bei ca. 2 nM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 30 Bildern pro Sekunde an insgesamt vier EHTs durchgeführt.

Es zeigten sich keine veränderten Parameter in einer Konzentration von 0,3 nM. Bei 3 nM wurde eine signifikante Reduktion der Kontraktionsgeschwindigkeit deutlich, welche sich in Konzentrationen von 10 und 30 nM kaum weiter veränderte und bei 100 nM erneut deutlich abnahm. Ab 30 nM Cisaprid waren die Relaxationsgeschwindigkeit und die Kraft signifikant reduziert, bei 100 nM ebenfalls die Frequenz. Bis 10 nM zeigte sich eine leichte Tendenz zu einem verringerten CV/RV Verhältnis. Die Kontraktionszeit stieg über den gesamten

Konzentrationsverlauf leicht an, erreichte aber kein signifikantes Niveau. Die Relaxationszeit blieb unverändert.

Cisaprid hatte in Konzentrationen bis 10 nM kaum Einfluss auf die Kontraktionen (Abbildung 36 B-E), ab 30 nM erschienen erste unregelmäßige Kontraktionen. 100 nM führten zu unkoordinierten Kontraktionen ohne erkennbare Regelmäßigkeit.

3.14.1.4 Procainamid

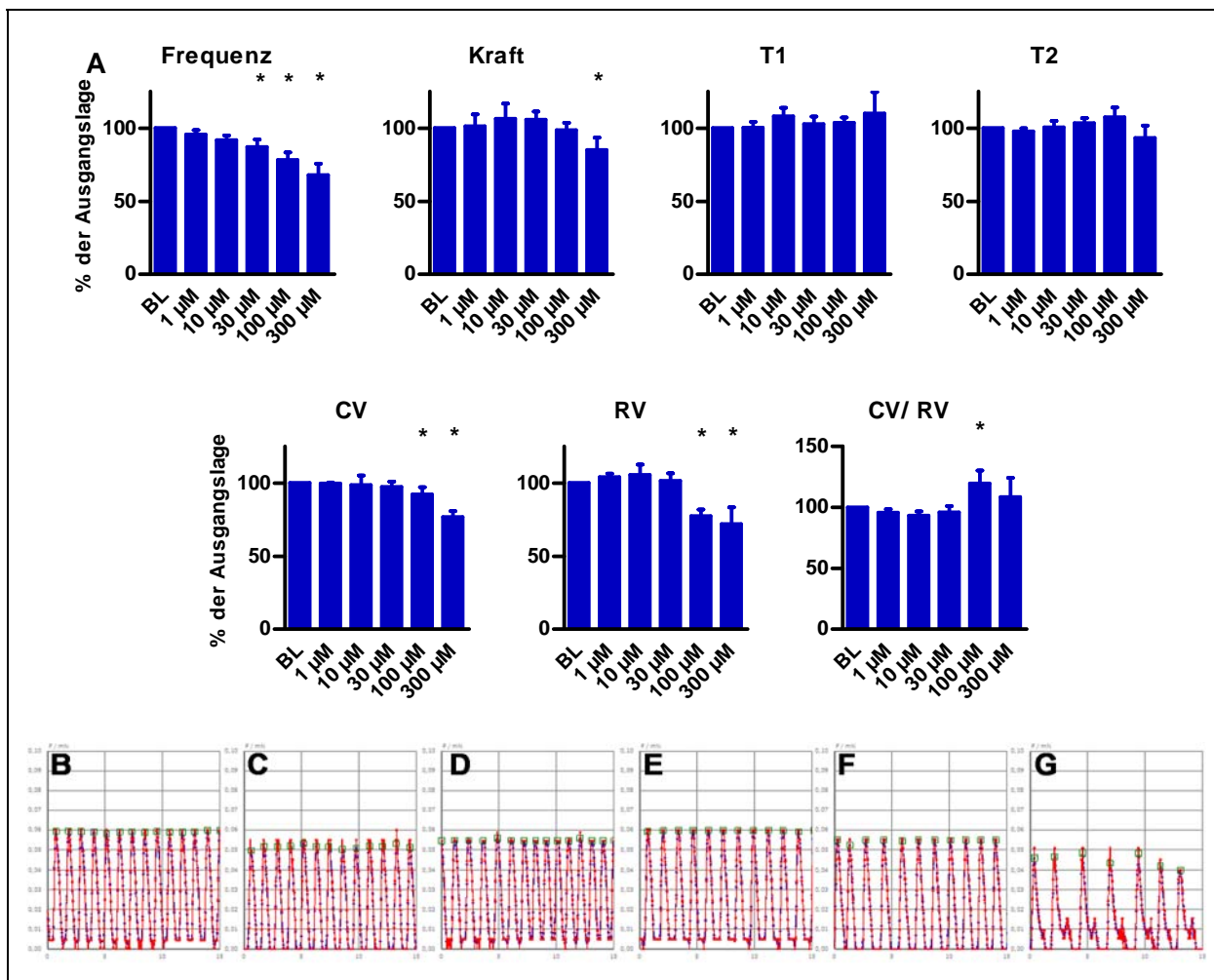


Abbildung 37: Procainamid, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (G) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 1 µM, (D) 10 µM, (E) 30 µM, (F) 100 µM, (G) 300 µM.

Procainamid wurde in Konzentrationen von 1, 10, 30, 100 und 300 µM gemessen. Die IC₅₀(hERG) liegt bei ca. 300 µM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 30 Bildern pro Sekunde an insgesamt vier EHTs durchgeführt.

Procainamid führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Frequenz, die ab 30 μM statistisch signifikant war. Bei mittleren Konzentrationen von 10 und 30 μM zeigte sich eine Tendenz zu einer Zunahme der Kraft. Ab 100 μM Procainamid nahm die Relaxationsgeschwindigkeit deutlich ab, ebenfalls die Kontraktionsgeschwindigkeit. Das Verhältnis CV/RV war bei 100 μM signifikant erhöht. T1 und T2 blieben unverändert.

Procainamid führte ab einer Konzentrationen von 100 μM zu verfrühten irregulären Kontraktionen (Abbildung 37 B bis G). 300 μM führten im abgebildeten Exemplar zu komplett unregelmäßigen Kontraktionen im direkten Anschluss an koordinierte Kontraktionen bei 100 μM .

3.14.1.5 E-4031

E-4031 wurde in Konzentrationen von 1, 3, 10 und 30 nM gemessen. Die $\text{IC}_{50}(\text{hERG})$ liegt bei ca. 7,7 nM (Zhou et al. 1998). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 30 Bildern pro Sekunde an insgesamt vier EHTS durchgeführt.

Bei einer Konzentration von 1 nM änderte sich keiner der gemessenen Parameter. Eine Konzentration von 3 nM führte zu einer signifikanten und isolierten Abnahme der Relaxationsgeschwindigkeit. Das Verhältnis CV/RV war bei 3 nM leicht erhöht und erreichte bei 10 nM signifikantes Niveau. Die Kraft und T2 waren ab 10 nM signifikant verringert. Bei einer hohen Konzentration von 30 nM waren alle gemessenen Parameter deutlich reduziert, das Verhältnis CV/RV war wieder auf Ausgangsniveau zurückgekehrt.

E-4031 führte bereits in Konzentrationen von 3 nM zu einer erkennbaren Veränderung des regulären Schlagmusters mit verfrühten Extra-Kontraktionen (Abbildung 38 D). Höhere Konzentrationen führten zu unkoordinierten Kontraktionen ohne erkennbare Regelmäßigkeit.

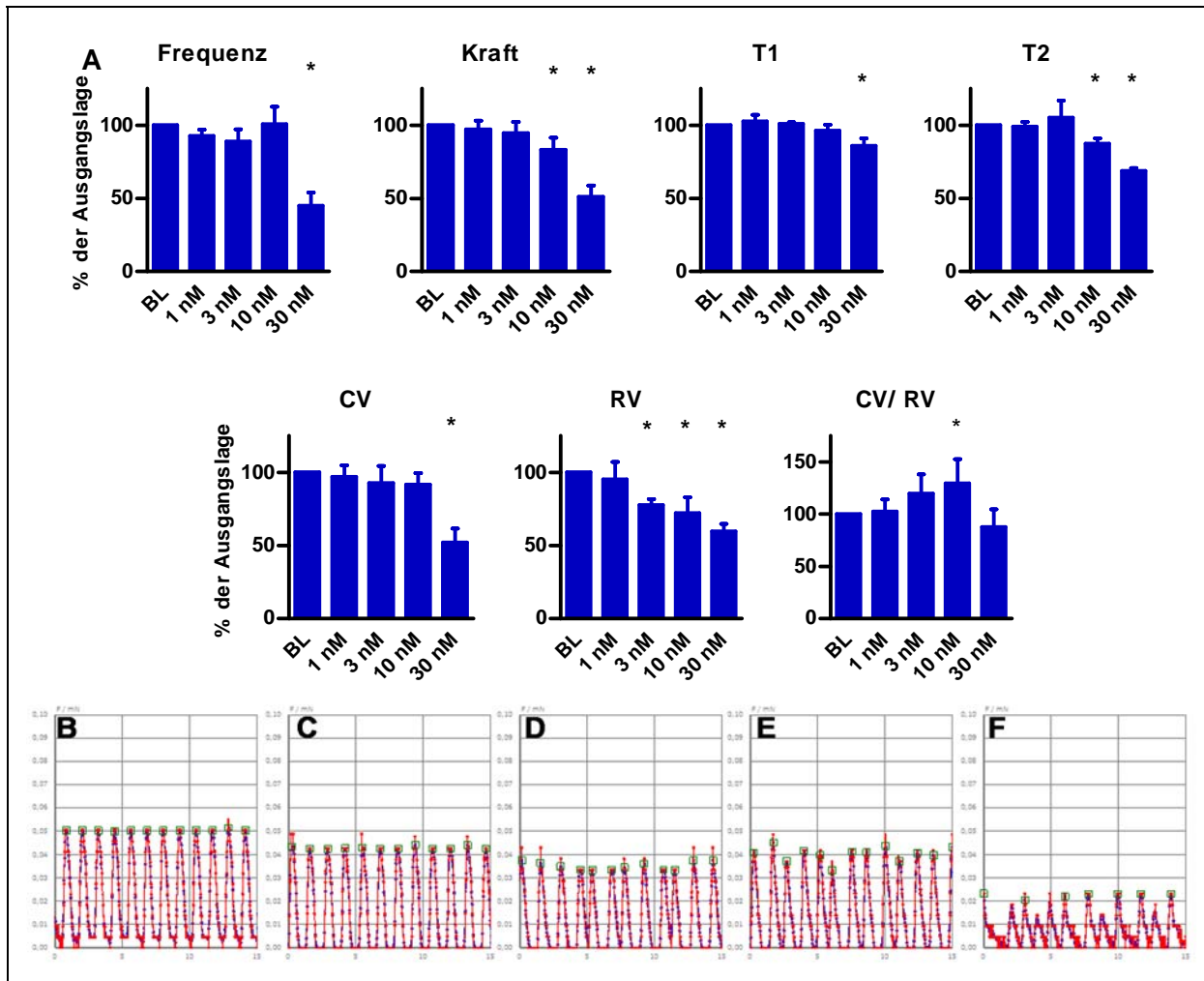


Abbildung 38: E-4031, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (F) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 1 nM, (D) 3 nM, (E) 10 nM, (F) 30 nM.

3.14.1.6 Thioridazin

Thioridazin wurde in Konzentrationen von 3, 30, 300, 3000 und 30000 nM gemessen. Die IC_{50} (hERG) liegt zwischen ca. 30 nM (Redfern et al. 2003) und 1,25 μ M (Pacher & Kecskemeti 2004). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 100 Bildern pro Sekunde an insgesamt sieben EHTs durchgeführt.

Bis zu einer Konzentration von 300 nM waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar. Frequenz, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit nahmen leicht ab, T1 und T2 nahmen leicht zu. Thioridazin in einer Konzentration von 3000 nM führte zu einer signifikanten Reduktion der Frequenz und der Relaxationsgeschwindigkeit, außerdem war das Verhältnis CV/RV signifikant erhöht. T1 und T2 nahmen mit steigenden Konzentrationen

zu und erreichten bei 3000 nM signifikantes Niveau. 30000 nM der Substanz führten zu keiner weiteren Erhöhung der T2, T1 fiel zurück auf das Ausgangsniveau. Außerdem waren bei 30 µM die Parameter Frequenz, Kraft, CV und RV deutlich reduziert.

Unter dem Einfluss von Thioridazin kam es selten zu verfrühten Extra-Kontraktionen. Bis zu einer Konzentration von 3000 nM war kaum eine Veränderung im Kontraktionsdiagramm zu erkennen, bei 30000 nM waren kaum noch Kontraktionen messbar.

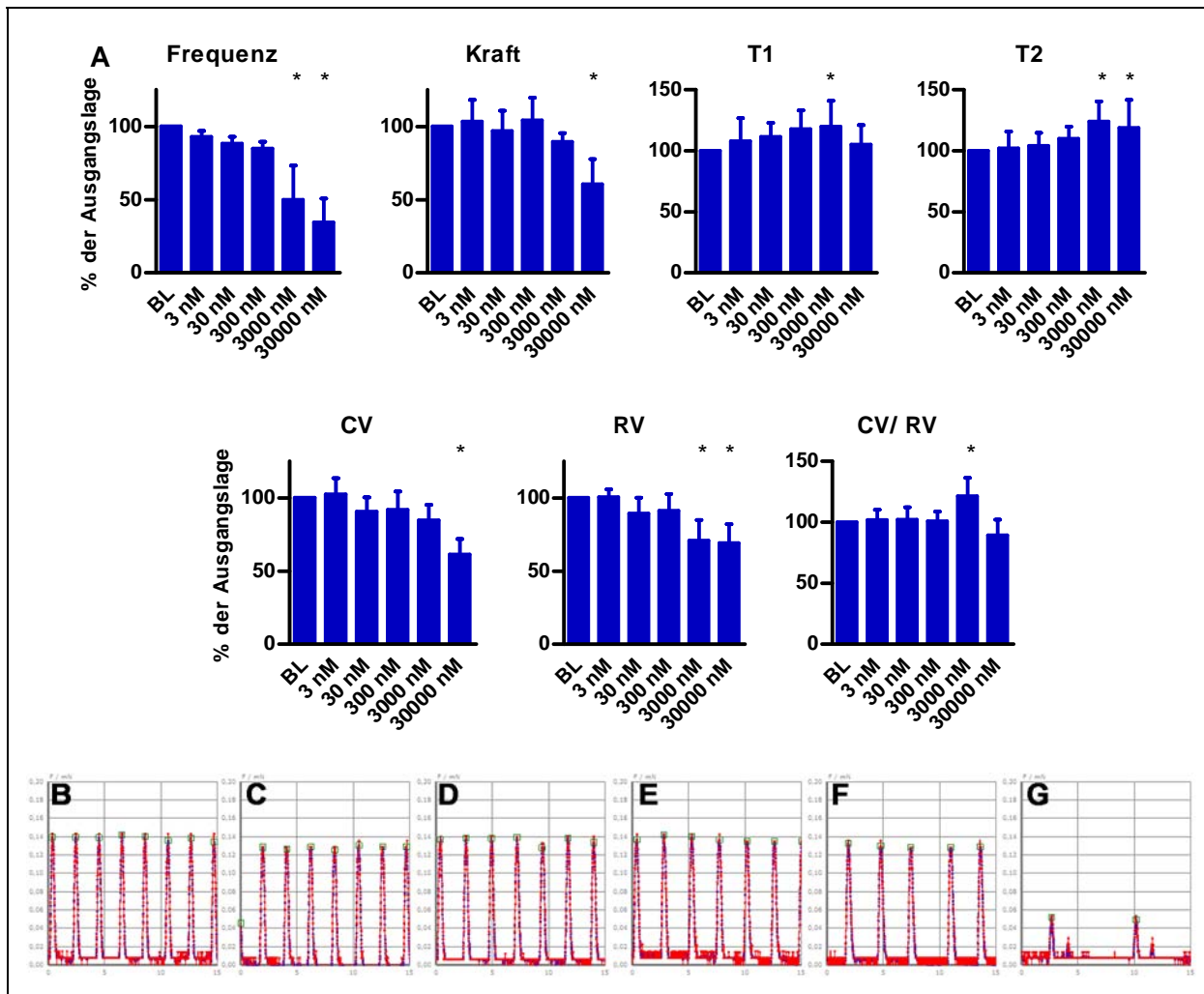


Abbildung 39: Thioridazin, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2); (B) bis (G) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 3 nM, (D) 30 nM, (E) 300 nM, (F) 3000 nM, (G) 30000 nM.

3.14.1.7 Dofetilid

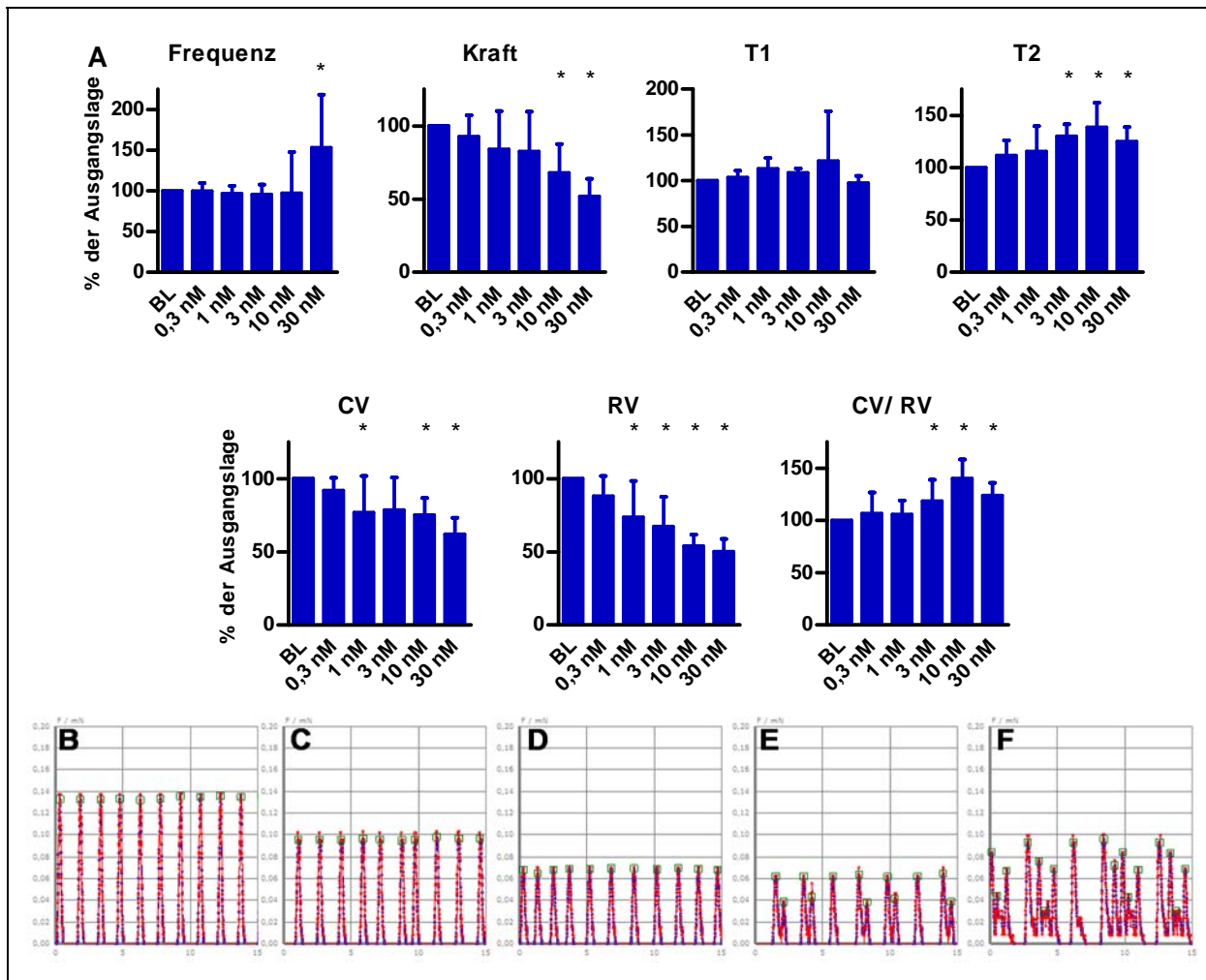


Abbildung 40: Dofetilid, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (F) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 0,3 nM, (D) 1 nM, (E) 3 nM, (F) 10 nM, (G) 30 nM.

Dofetilid wurde in Konzentrationen von 0,3; 1; 3; 10 und 30 nM gemessen. Die $IC_{50}(hERG)$ liegt bei ca. 3 nM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 100 Bildern pro Sekunde an insgesamt acht EHTs durchgeführt.

Bei niedrigeren Konzentrationen nahmen die Kraft, die Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit ab. Kontraktions- und die Relaxationsgeschwindigkeit erreichten bereits bei 1 nM ein signifikantes Niveau, die Kraft erst bei 10 nM. Die RV nahm mit höheren Konzentrationen weiter ab, das Verhältnis CV/RV war ab 3 nM signifikant erhöht mit dem Maximum bei 10 nM. Die T2 nahm bis 10 nM konzentrationsabhängig zu und fiel bei 30 nM

leicht ab. Die T1 war bei allen Konzentrationen unverändert, die Frequenz nahm erst bei einer hohen Konzentration von 30 nM deutlich zu.

Unter Dofetilid waren bereits ab einer Konzentration von 0,3 nM die ersten verfrühten Extra-Kontraktionen zu erkennen (Abbildung 40 B bis F). Höhere Konzentrationen von 10 bzw. 30 nM führten zu unkoordinierten Kontraktionen ohne zugrundeliegende Regelmäßigkeit.

3.14.1.8 Ibutilid

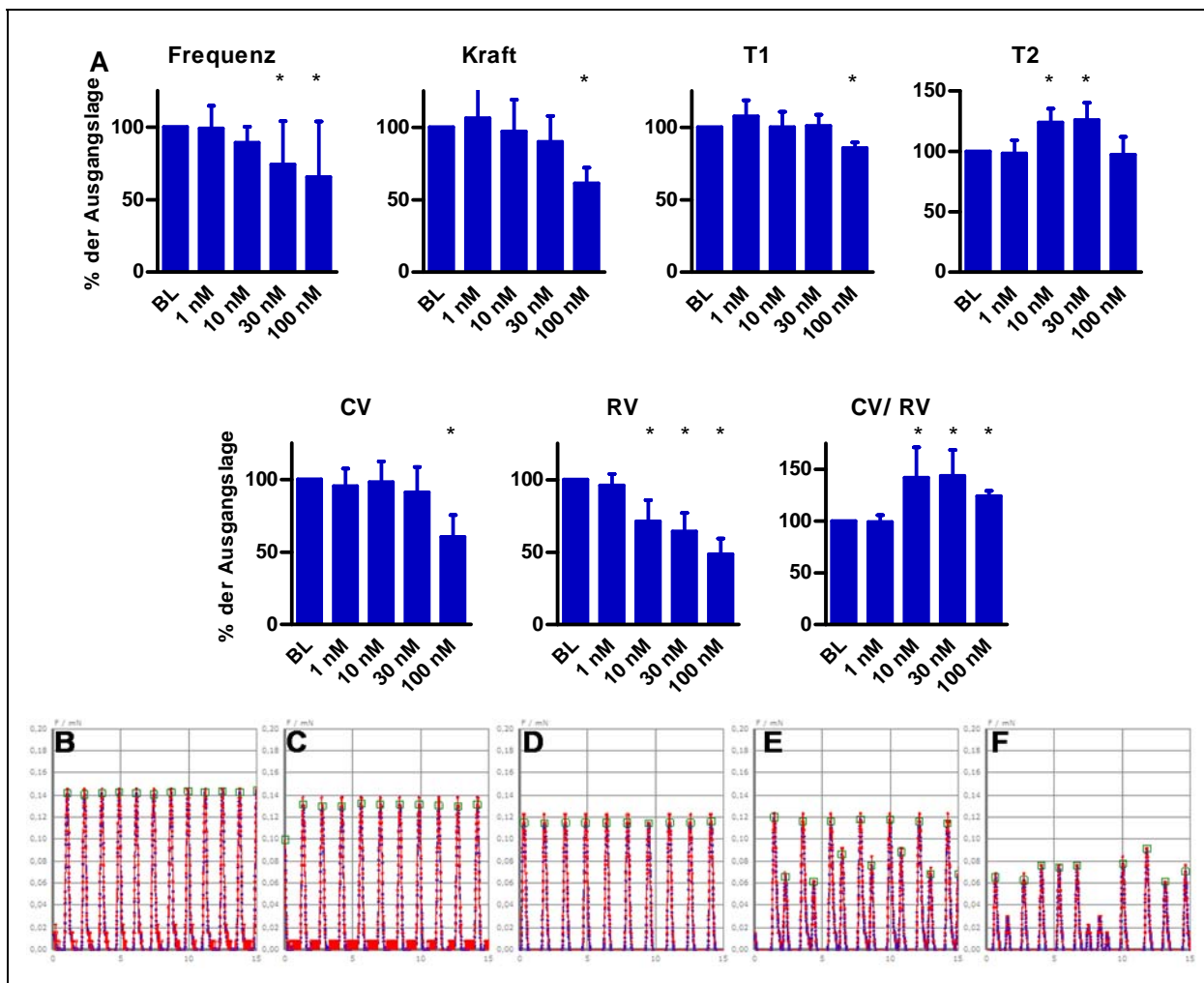


Abbildung 41: Ibutilid, (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (F) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 1 nM, (D) 10 nM, (E) 30 nM, (F) 100 nM.

Ibutilid wurde in Konzentrationen von 1, 10, 30 und 100 nM gemessen. Die $IC_{50}(hERG)$ liegt bei ca. 10 nM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 100 Bildern pro Sekunde an insgesamt acht EHTs durchgeführt.

Bei einer Konzentration von 1 nM zeigten sich noch keine Veränderungen. 10 nM führten zu einer verminderten Relaxationsgeschwindigkeit und einer erhöhten T2. Das Verhältnis CV/RV war bei 10 nM ebenfalls signifikant erhöht. Bei höheren Konzentrationen war die Frequenz vermindert (signifikant ab 30 nM) und die Relaxationsgeschwindigkeit nahm weiter ab. Kraft, T1 und Kontraktionsgeschwindigkeit waren erst bei einer Konzentration von 100 nM vermindert.

Unter dem Einfluss von Ibutilid kam es ab einer Konzentration von 30 nM zu unregelmäßigen Kontraktionen (Abbildung 41 B-F). Eine Konzentration von 100 nM führte zu unkoordinierten Kontraktionen.

3.14.1.9 Amiodaron

Ein Vorversuch zu Amiodaron zeigte keine akuten, konzentrationsabhängigen Effekte im Bereich von 0,3 bis 300 nM (Daten nicht gezeigt). Da Amiodaron *in vivo* einer extrem langsamen Pharmakokinetik unterliegt, wurden die Effekte einer hohen Konzentration von 1 µM über einen Zeitraum von vier Stunden untersucht. Die IC₅₀(hERG) liegt bei ca. 1 µM (Redfern et al. 2003). Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 100 Bildern pro Sekunde an insgesamt acht EHTs durchgeführt.

Akut führte Amiodaron zu einer verminderten Frequenz und Kontraktionsgeschwindigkeit und zu einer erhöhten T1, wobei nur die Erhöhung der T1 signifikantes Niveau erreichte. Im weiteren Verlauf der Messung nahmen CV, RV und Kraft ab und erreichten nach 120 bzw. nach 250 Minuten signifikantes Niveau. Die Frequenz nahm deutlich ab, nach 250 Minuten lag sie bei 33,2±18,4% (n=8) des Ausgangswertes. Das Verhältnis CV/RV und die T2 waren über den gesamten Zeitraum unverändert. Die T1 ging nach dem akuten Anstieg wieder auf Ausgangsniveau zurück.

Unter Amiodaron konnten keine verfrühten Extra-Kontraktionen beobachtet werden (Abbildung 42). Das dargestellte Exemplar zeigte bereits unter Referenzbedingungen kein vollständig gleichmäßiges Muster der Kontraktionen, so dass auch nach längerer Zeit keine Veränderung zu beobachten war, abgesehen von der niedrigeren Frequenz und Kraft.

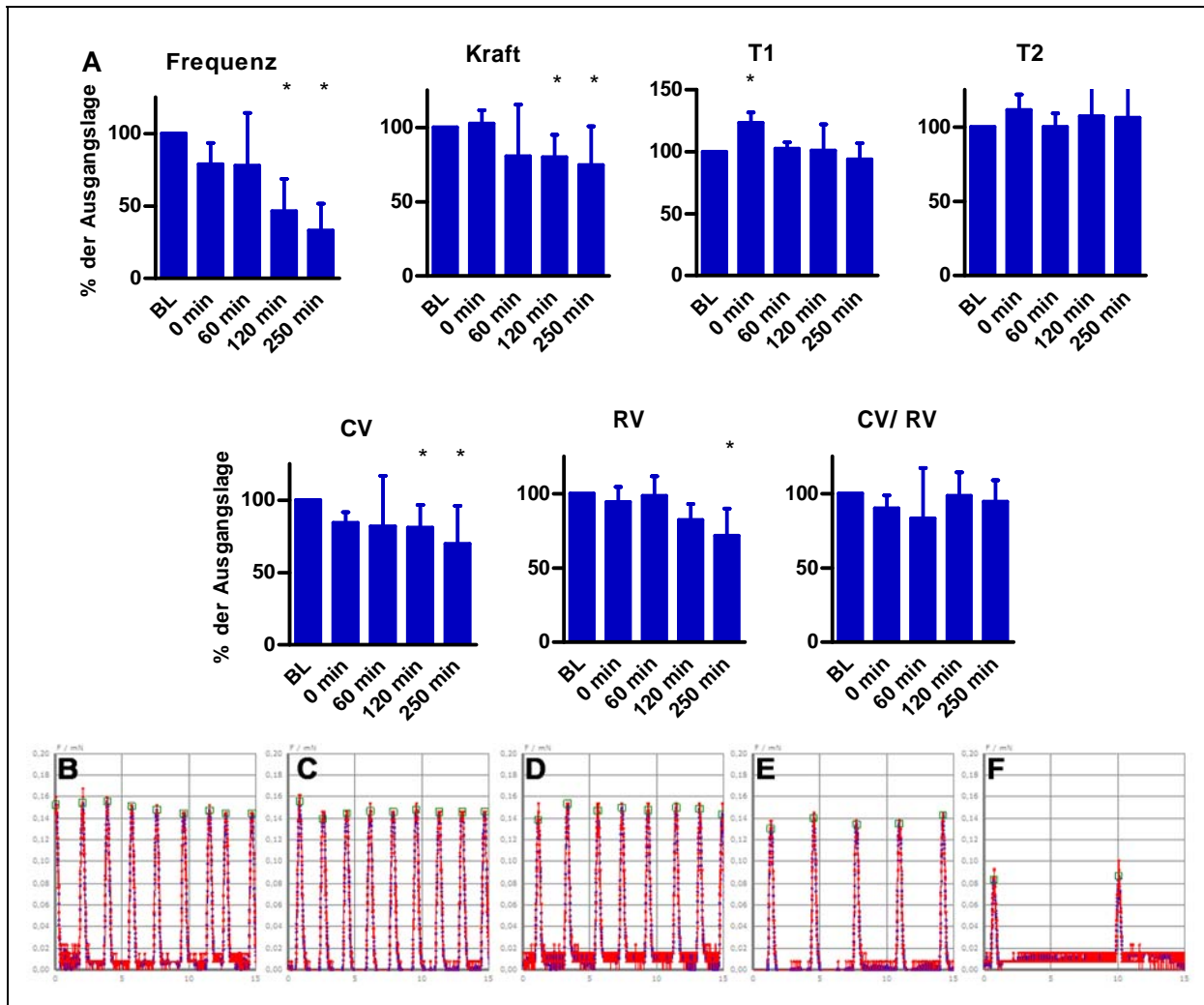


Abbildung 42: Amiodaron (1 μ M), (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (F) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 0 min, (D) 60 min, (E) 120 min, (F) 250 min.

3.14.1.10 Ampicillin

Ampicillin wurde in Konzentrationen von 10, 100 und 1000 μ M gemessen. Eine Affinität zum hERG-Kanal besteht nicht, so dass auch keine IC_{50} angegeben werden kann. Die Messung wurde mit einer zeitlichen Auflösung von 30 Bildern pro Sekunde an insgesamt vier EHTs durchgeführt.

Ampicillin führte nicht zu konzentrationsabhängigen Effekten, wie sie bei anderen Substanzen beobachtet werden konnten. Frequenz und Relaxationsgeschwindigkeit waren unter dem Einfluss von 1000 μ M Ampicillin soweit erhöht, dass die Veränderung signifikant war. Die Kontraktionszeiten schwankten und waren bei 10 und 100 μ M signifikant vermindert, bei 100 μ M allerdings nicht.

Am Kontraktionsdiagramm (Abbildung 43 B-E) waren keine irregulären Kontraktionen zu erkennen. Die gestiegene Frequenz war die einzige erkennbare Veränderung.

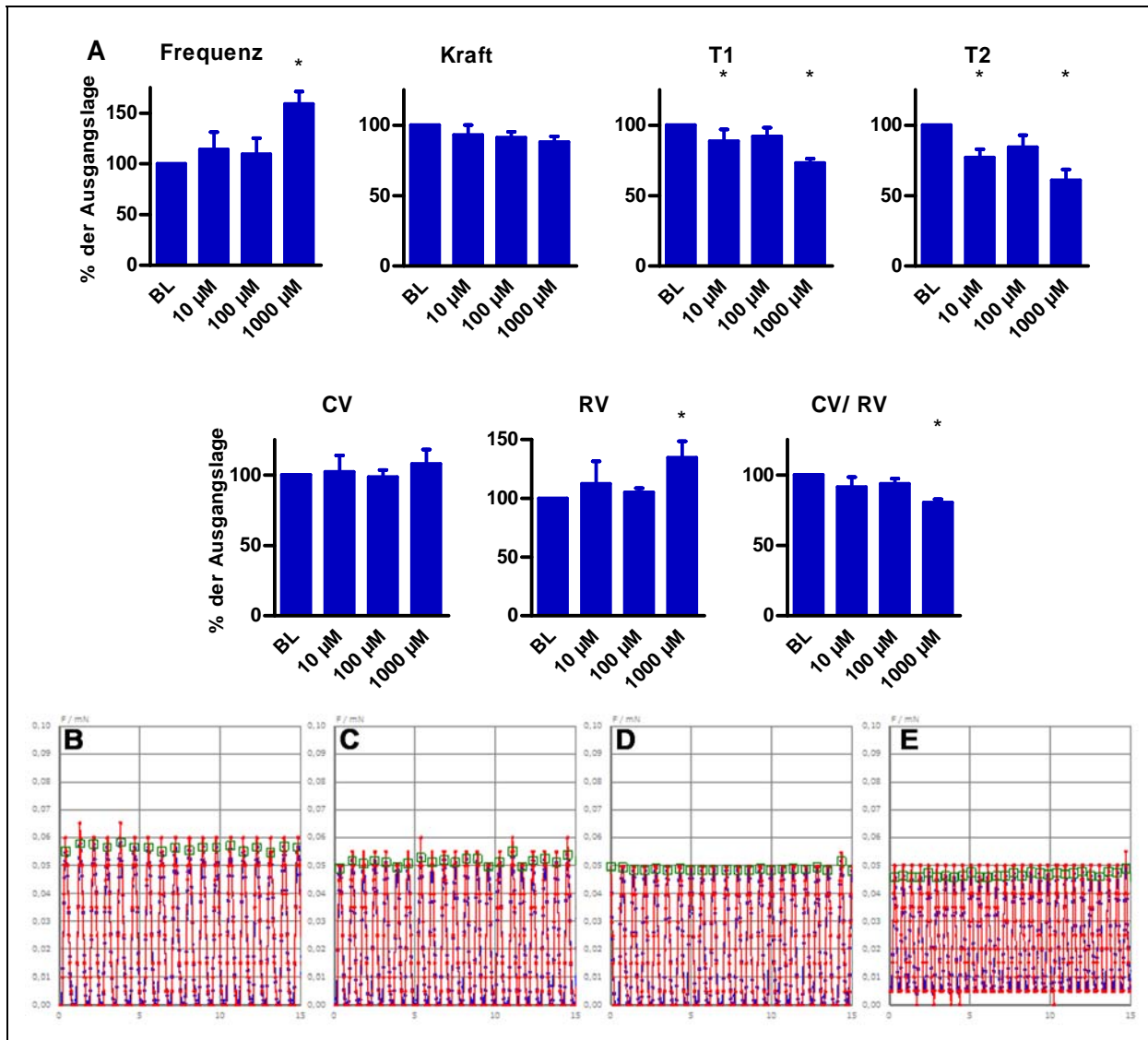


Abbildung 43: Ampicillin. (A) Darstellung der Parameter Frequenz (BPM), Kraft (Force), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV), Relaxationsgeschwindigkeit (RV), Verhältnis CV/RV (CV/RV), Kontraktionszeit (T1) und Relaxationszeit (T2) , BL= Ausgangslage; (B) bis (E) exemplarische Darstellung von Kontraktionsdiagrammen eines EHTs, (B) Ausgangslage, (C) 10 µM, (D) 100 µM, (E) 1000 µM.

3.14.2 Auswertung nach irregulären Ereignissen

3.14.2.1 Prinzip

Eine weitere Methode zur Auswertung des Einflusses von Substanzen mit proarrhythmischem Potential basierte auf der Beobachtung, dass bei den meisten Substanzen ab bestimmten Konzentrationen frühe Extra-Kontraktionen auftraten. Als frühe Extra-Kontraktionen wurden Kontraktionen gezählt, die vor dem nach dem Rhythmus des EHTs zu erwartendem Zeitpunkt und direkt nach einer vorhergehenden Kontraktion

stattfanden (Abbildung 44 A). Die Anzahl dieser typischen Ereignisse wurde gezählt und der Messung danach eine Kategorie zugeteilt (siehe Tabelle 7). Alle Messungen dauerten eine Minute. Wichtiger Unterschied zur Auswertung nach der Regelmäßigkeit (siehe unter 3.14.3) war, dass hier nicht auf die Gleichmäßigkeit der Kontraktionen geschaut wurde, sondern auf den speziellen Typ der verfrühten Kontraktion.

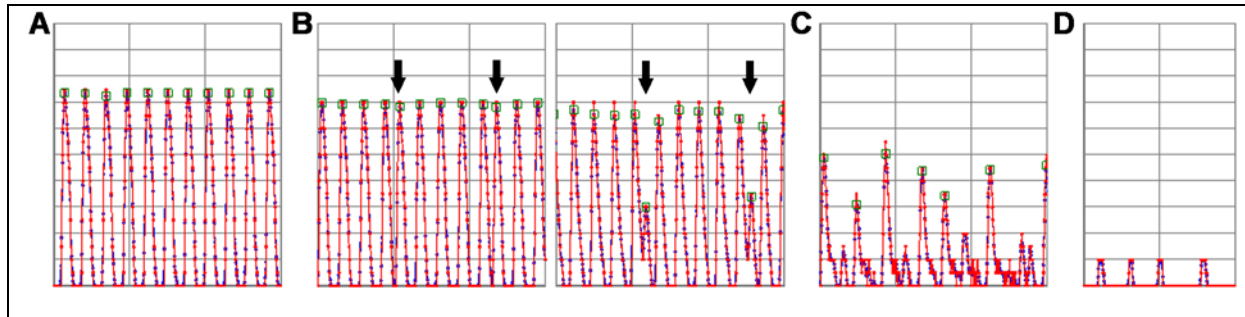


Abbildung 44: Beispiele für die Auswertung nach irregulären Ereignissen, (A) regelmäßige Kontraktionen (Ausgangslage), Kategorie A, (B) einzelne Ereignisse mit Pfeilen markiert, Kategorie B, (C) komplett unregelmäßige Kontraktionen, Kategorie C, (D) keine messbaren Kontraktionen, Kategorie D.

Kategorie	Kontraktionen	Arrhythmische Ereignisse pro Minute	Beispiel in Abbildung 44	Farbe
A	Regulär	0 – 1		Grün
B	Einige irreguläre Ereignisse	2-10	A	Gelb
C	Komplett unregelmäßige Kontraktionen	>10	B	Rot
D	Keine auswertbaren Kontraktionen	---	C	Schwarz

Tabelle 7: Übersicht der Kategorien der Auswertung nach arrhythmischen Ereignissen.

Zu Kategorie A wurden EHTs gezählt, die regulär kontrahierten und nur maximal ein irreguläres Ereignis pro Messung zeigten. Kategorie B umfasste EHTs, die eine zählbare Menge (zwei bis 10) an irregulären Ereignissen aufwiesen. Sie schlugen also hauptsächlich regulär mit ähnlicher Kraft. Der Kategorie C wurden EHTs zugeordnet, in deren Kontraktionsmuster kein Rhythmus mehr zu erkennen war und deren Kontraktionen in der Kraftentwicklung stark schwankten. EHTs der Kategorie D zeigten keine auswertbaren Kontraktionen (Übersicht in Tabelle 7).

3.14.2.2 Substanzen

Elf Substanzen wurden nach dieser Methode ausgewertet. Sie konnten in zwei Gruppen unterteilt werden, und zwar einerseits solche Substanzen, die zu irregulären Ereignissen führten, und andererseits solche, bei denen keine irregulären Ereignisse auftraten. Chinidin, Sertindol, Cisaprid, Procainamid, E-4031, Dofetilid und Ibutilid zeigten in höheren Konzentrationen hauptsächlich komplett unregelmäßige Kontraktionen (Kategorie C). In den

etwas niedrigeren Konzentrationen war bei allen Substanzen mit Ausnahme von Chinidin eine Übergangsphase festzustellen, in der sich die EHTs auf die Kategorien A, B und C verteilen.

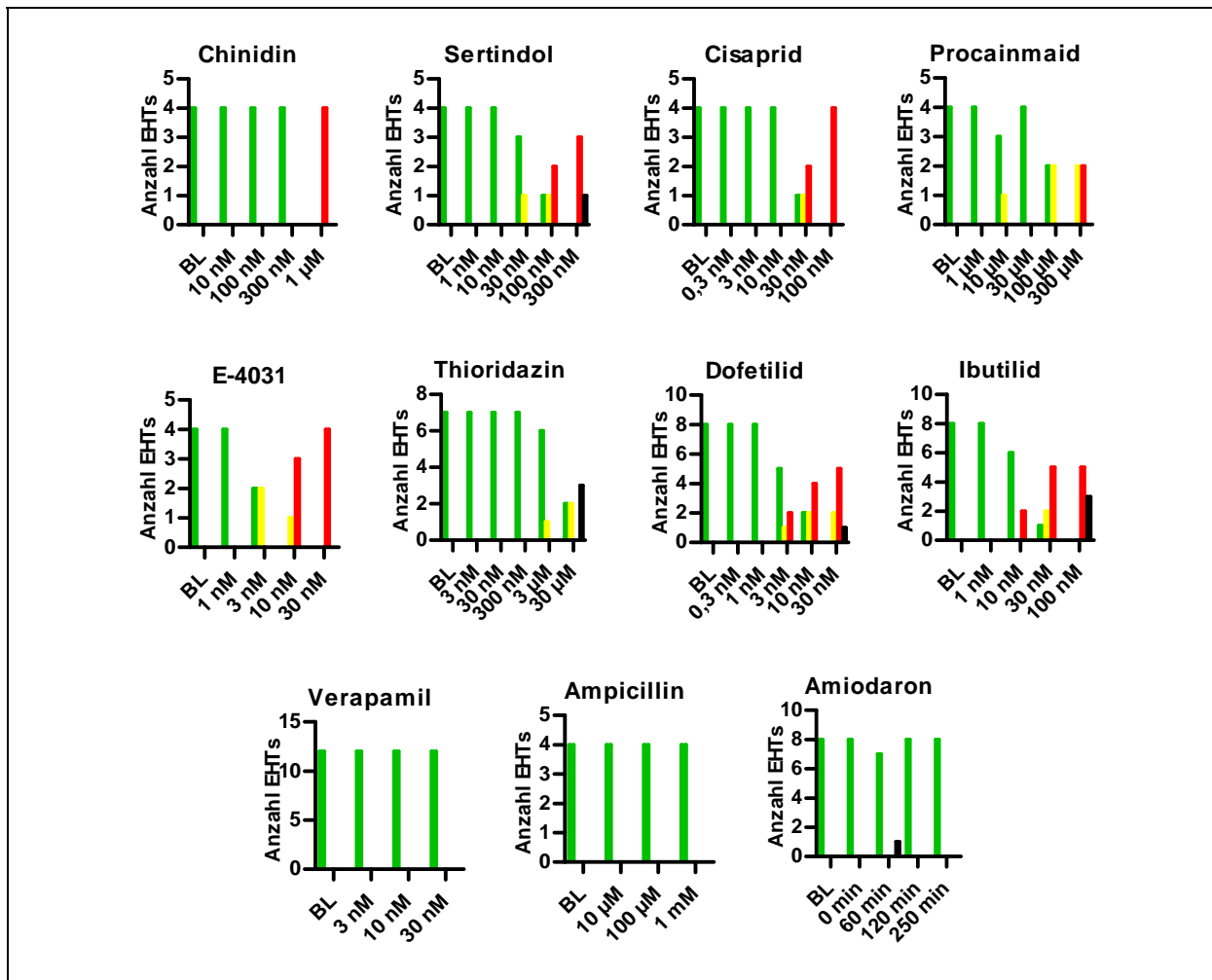


Abbildung 45: Auswertung nach irregulären Ereignissen, grün= Kategorie A (regulär), gelb= Kategorie B (einige irreguläre Ereignisse), rot= Kategorie C (komplett unregelmäßig), schwarz= Kategorie D (keine auswertbaren Kontraktionen), siehe auch Tabelle 7.

Bei Amiodaron, Ampicillin und Verapamil konnten keine irregulären Ereignisse beobachtet werden. Thioridazin bildet eine Ausnahme, hier konnten einige irreguläre Ereignisse beobachtet werden, die meisten EHTs hörten bei höheren Konzentrationen aber auf zu kontrahieren.

3.14.3 Analyse der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen

Aufgrund der Tatsache, dass die humanen EHTs unter normalen Bedingungen sehr gleichmäßig kontrahierten, und der Beobachtung, dass sich diese Gleichmäßigkeit durch die getesteten Substanzen empfindlich stören ließ, wurde ein weiteres Analyseverfahren entwickelt. Zu diesem Zweck wurden die Abstände der Kontraktionen (Intervalle) gemessen.

Zur Veranschaulichung wurde jede Kontraktion als ein Punkt in einem X-Y-Diagramm dargestellt. Dabei war der Abstand in ms zur vorhergehenden Kontraktion die X-Koordinate (R) und der Abstand in ms zur nachfolgenden Kontraktion die Y-Koordinate (R') des Punktes. Waren die Kontraktionen ideal gleichmäßig, hatten alle Datenpunkte die gleichen Koordinaten und lagen übereinander auf der Achse $x=y$. Nahm die Gleichmäßigkeit ab, wurden die Intervalle unterschiedlich lang und die Streuung der Punkte nahm zu. So führten frühe Extra-Kontraktionen in der Regel zu typischen Mustern, bei denen zwei Populationen entstanden, die in etwa über die Achse $x=y$ gespiegelt waren. Unkoordinierte Kontraktionen der EHTs führten zu chaotischen Mustern in dieser Darstellung.

Zur Berechnung der Unterschiede wurde die Streuung der Intervall-Länge verwendet. Mathematisch ist dies die Differenz des 10. und 90. Perzents der Intervall-Länge. Dieser Wert wurde für jede Messung bestimmt und die Gruppen vor und nach Intervention miteinander verglichen. Aufgrund der ausgeprägten Neigung, bestimmte Muster bei arrhythmischen Kontraktionen zu bilden, wurde bei allen statistischen Berechnungen nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen. Dargestellt ist daher immer der Median, die Fehlerbalken sind das 75. Perzentil (Quartil).

3.14.3.1 Chinidin

Chinidin zeigte in Konzentrationen bis zu 300 nM keine Veränderung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen. Erst ab 1000 nM stieg die Streuung der Intervalle bei allen gemessenen EHT deutlich an.

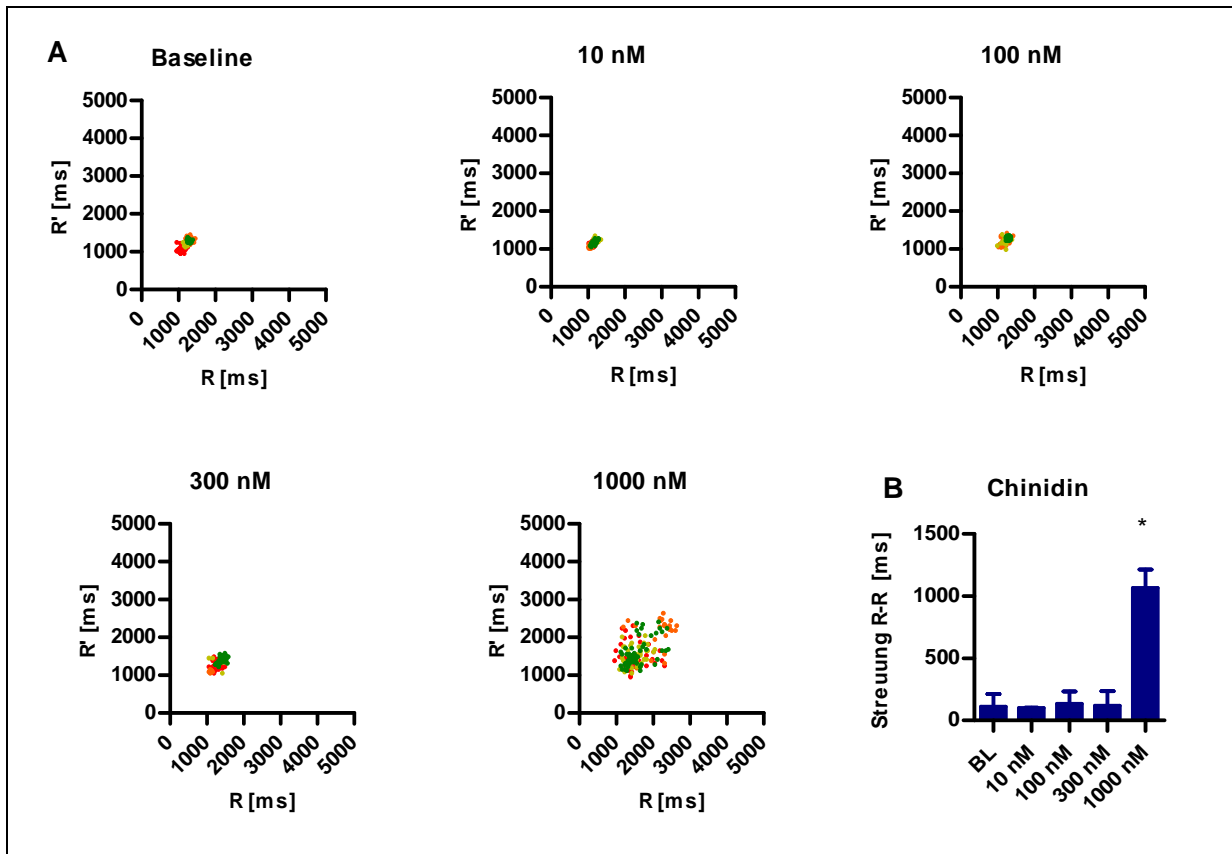


Abbildung 46: Chinidin, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=4, * = P < 0,05.

3.14.3.2 Sertindol

Sertindol hatte in einer Konzentration bis 10 nM keine Auswirkungen auf die Regelmäßigkeit der Kontraktionen. Bei 30 nM bzw. 100 nM wurden erste EHTs etwas unregelmäßig, ohne dass dies statistisch signifikant war. 300 nM Sertindol führten zu deutlicher Variabilität der Kontraktionsintervalle.

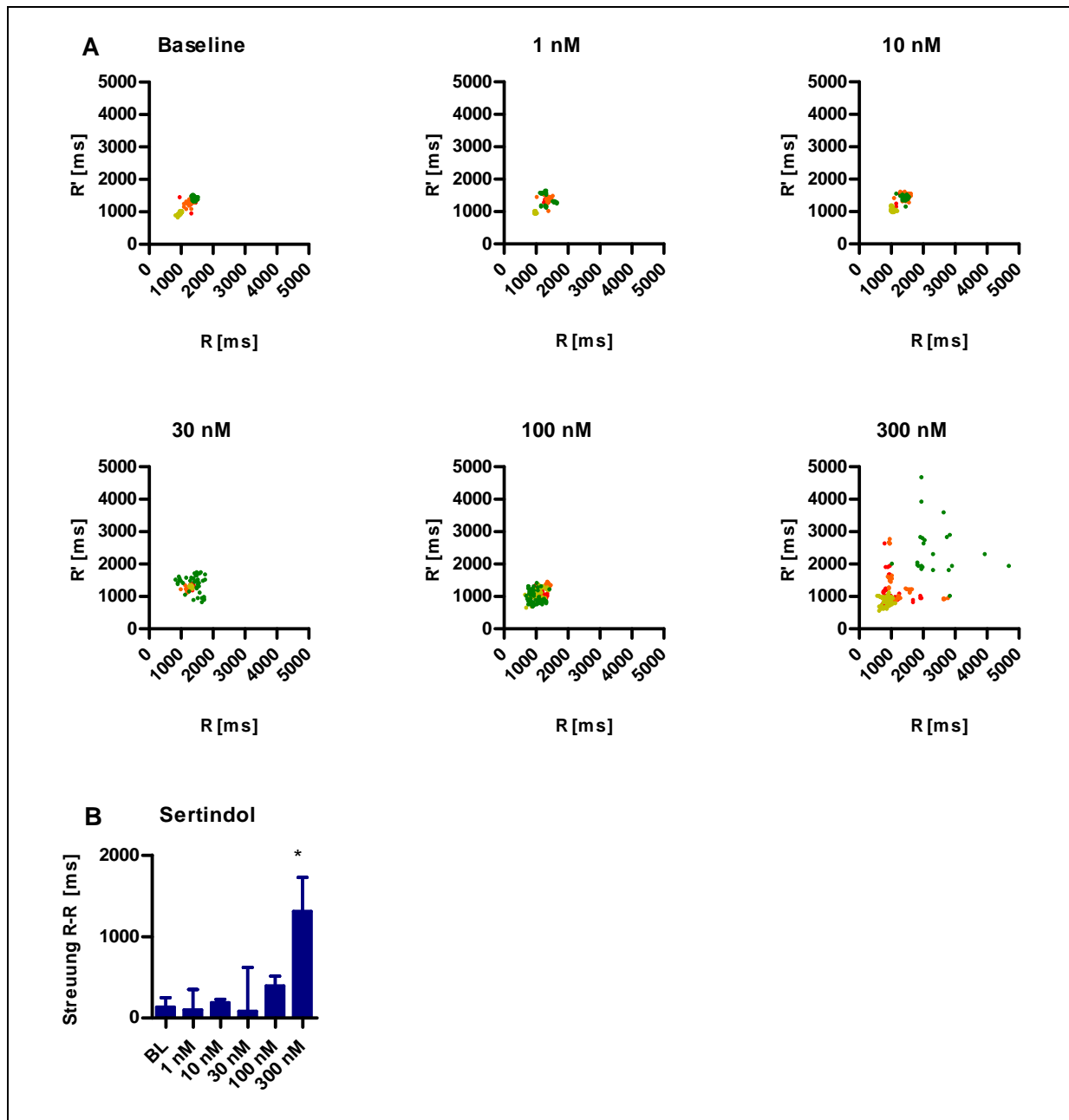


Abbildung 47: Sertindol, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=4, * = P < 0,05.

3.14.3.3 Cisaprid

Cisaprid führte in Konzentrationen bis zu 10 nM nicht zu einer Veränderung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen. Bei 30 und 100 nM stieg die Variabilität der Intervalle deutlich an. Der Effekt war bei beiden Konzentrationen signifikant, aber bei 100 nM deutlich stärker ausgeprägt.

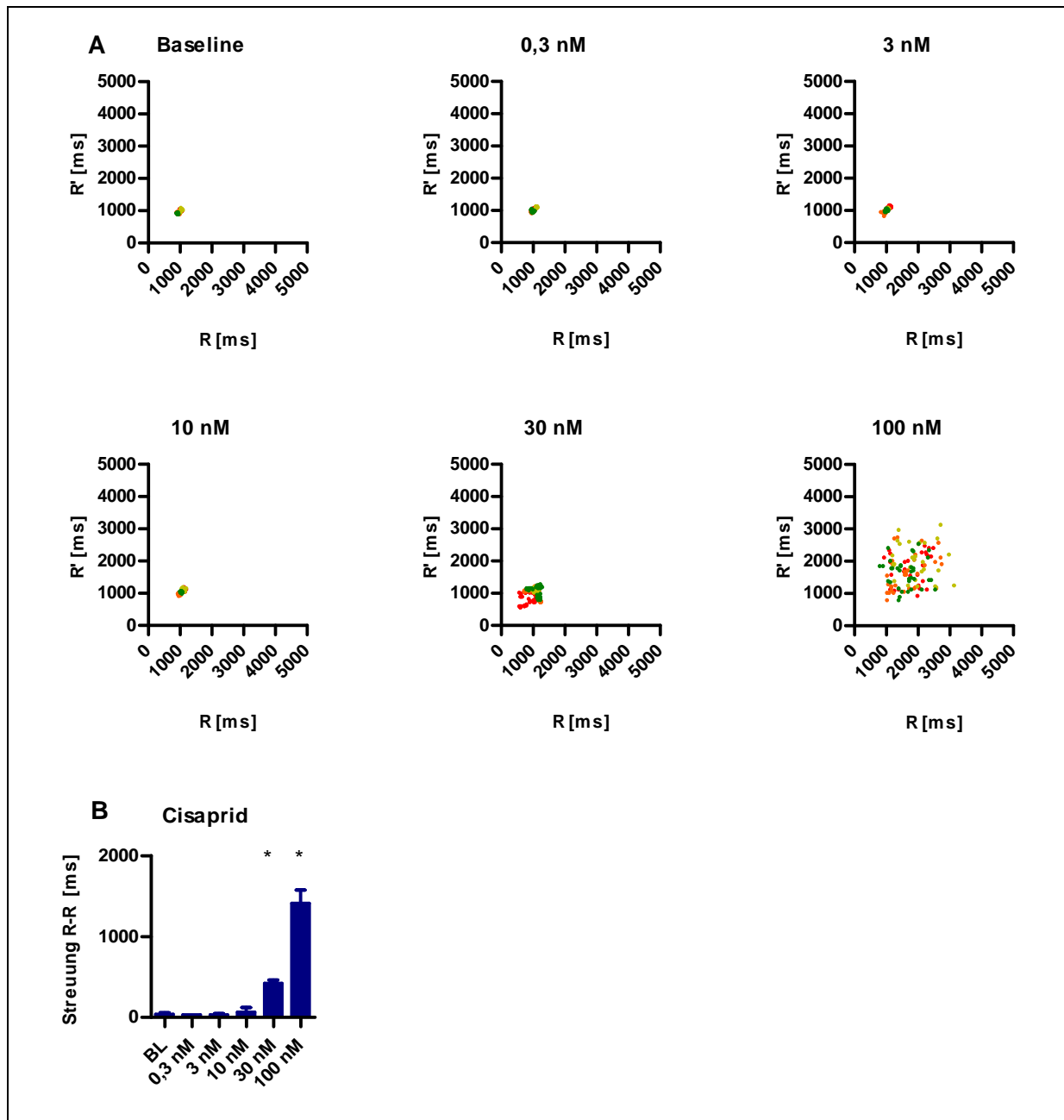


Abbildung 48: Cisaprid, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=4, *=P<0,05.

3.14.3.4 Procainamid

Unter dem Einfluss von Procainamid traten erste Anzeichen für eine Vergrößerung der Streuung der R-R Intervalle ab einer Konzentration von 10 μM auf. Deutlich, und auch statistisch signifikant, war der Effekt erst aber 100 μM . Nach einer weiteren Erhöhung der Konzentration auf 300 μM nahm der Effekt nochmals deutlich zu.

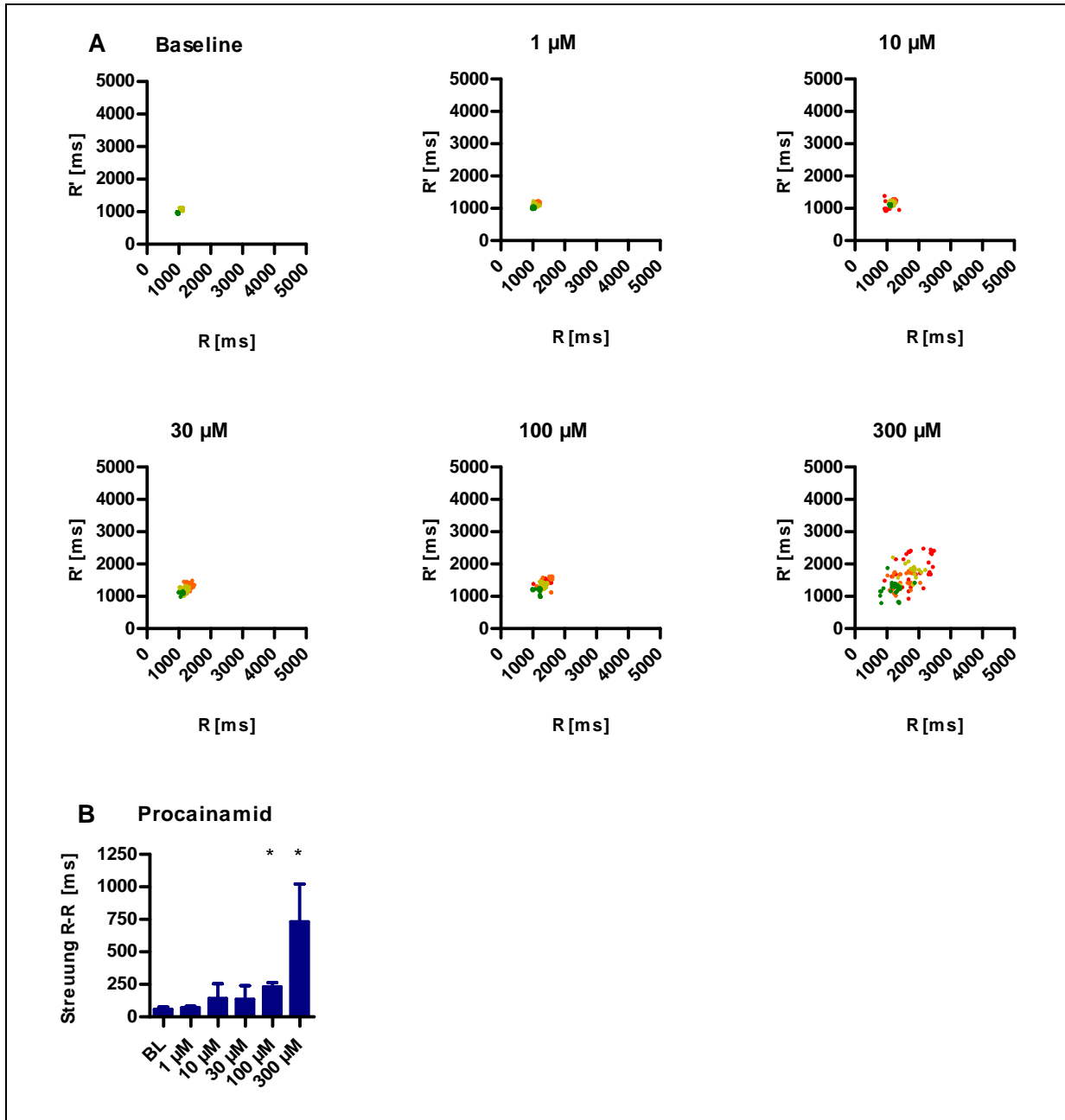


Abbildung 49: Procainamid, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=4, *=P<0,05.

3.14.3.5 E-4031

Bei E-4031 zeichnete sich eine Veränderung der Regelmäßigkeit bereits ab einer Konzentration von 3 nM ab. Hier waren bei einigen EHTs die typischen Muster von frühen Extra-Kontraktionen zu erkennen. Ab 10 nM waren die Effekte deutlich zu sehen und auch statistisch signifikant. 30 nM E-4031 führten zu einer weiteren deutlichen Zunahme der Variabilität der R-R Intervalle.

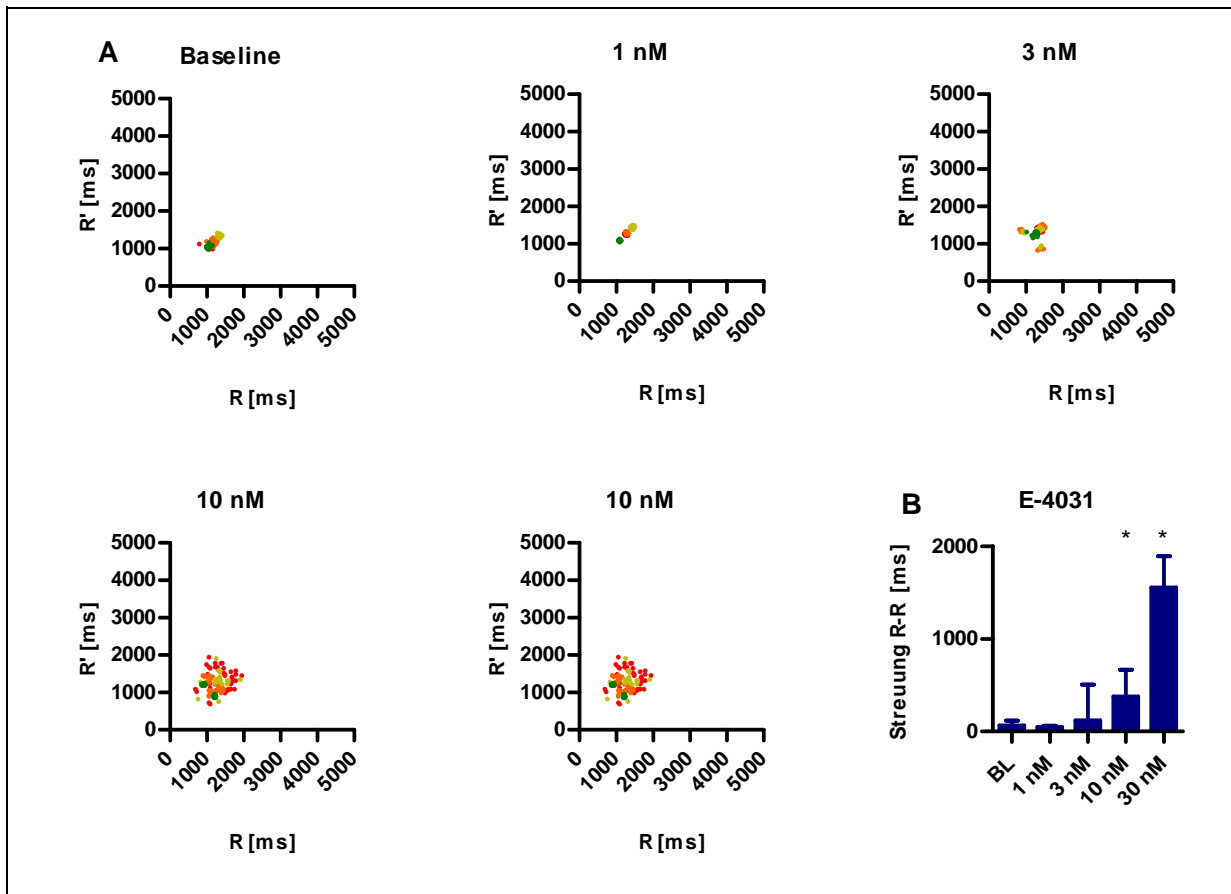


Abbildung 50: E-4031, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=4, * = P < 0,05.

3.14.3.6 Thioridazin

Bei der Messung von Thioridazin waren auch bei der Referenzmessung einzelne unregelmäßige Kontraktionen aufgetreten, die in der R-R'-Analyse deutlich zu erkennen waren. Dies war bis zu einer Konzentration von 300 nM unverändert, die einzelnen irregulären Kontraktionen traten allerdings bei unterschiedlichen EHTs auf. Thioridazin in einer Konzentration von 3000 nM führte zu einer deutlichen Vergrößerung der Streuung. Ebenso nahmen die Abstände der Kontraktionen zu, was zu einer Verschiebung der Punkte im R-R'-Diagramm nach rechts oben führte. Bei 30000 nM war dies besonders deutlich.

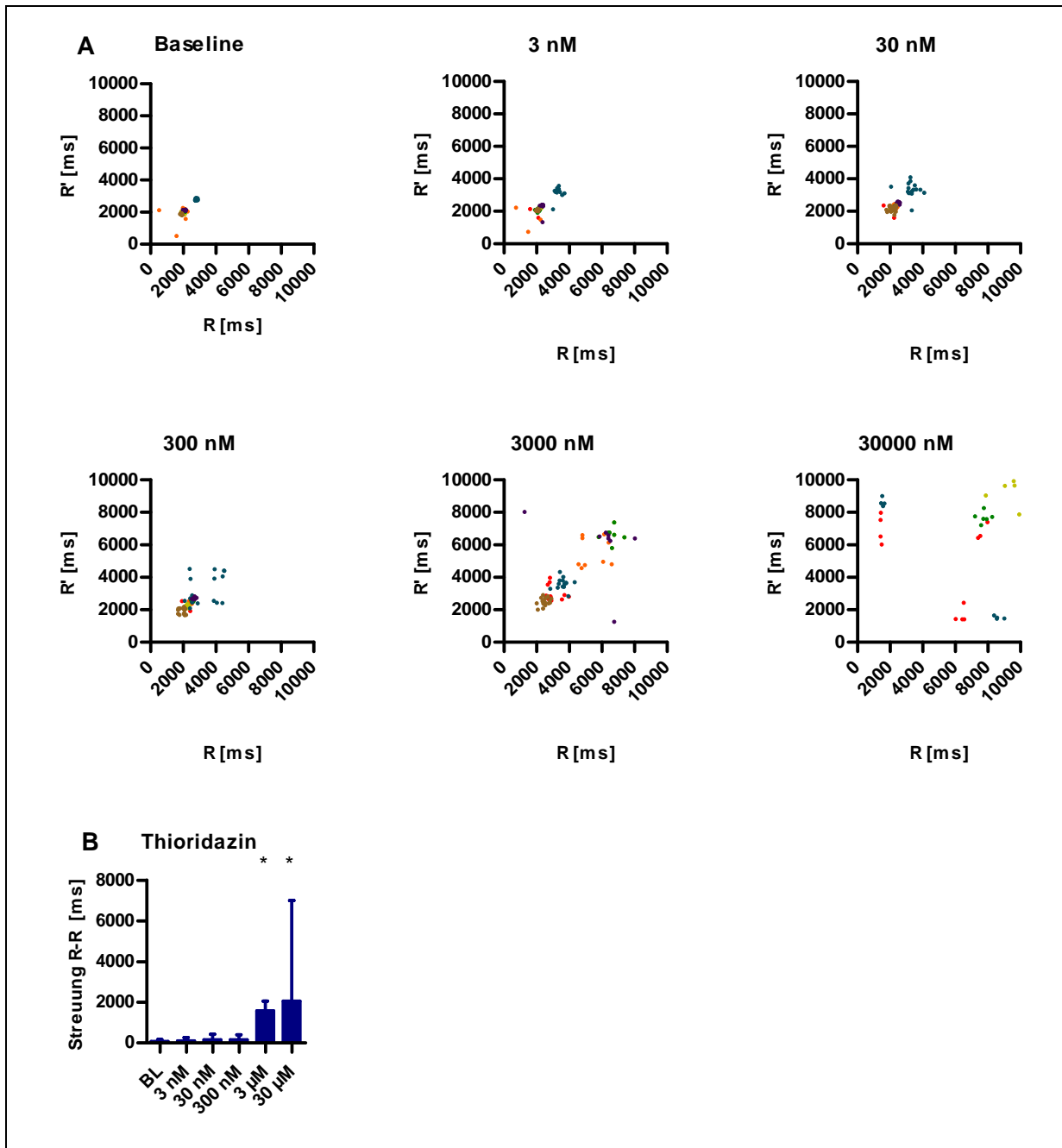


Abbildung 51: Thioridazin, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=7, * = P < 0,05.

3.14.3.7 Dofetilid

Die Referenzmessung zeigte hier einige EHTs, deren Kontraktionen nicht komplett gleichmäßig waren. Unter dem Einfluss von Dofetilid in Konzentrationen von 0,3 bzw. 1 nM konnte eine Tendenz zu gleichmäßigeren Kontraktionen beobachtet werden, ohne dass sich dies in der statistischen Auswertung zeigte. Bei Dofetilid in einer Konzentration von 3 nM zeichnete sich eine Umkehrung dieser Trends ab, bei einigen EHTs waren hier die typischen Muster von frühen Extra-Kontraktionen zu erkennen. 10 und 30 nM führten zu komplett

unregelmäßigen Kontraktionen und zu einer deutlichen Variabilität der R-R Intervalle. In der statistischen Auswertung nahm die Streuung von 10 nach 30 nM ab.

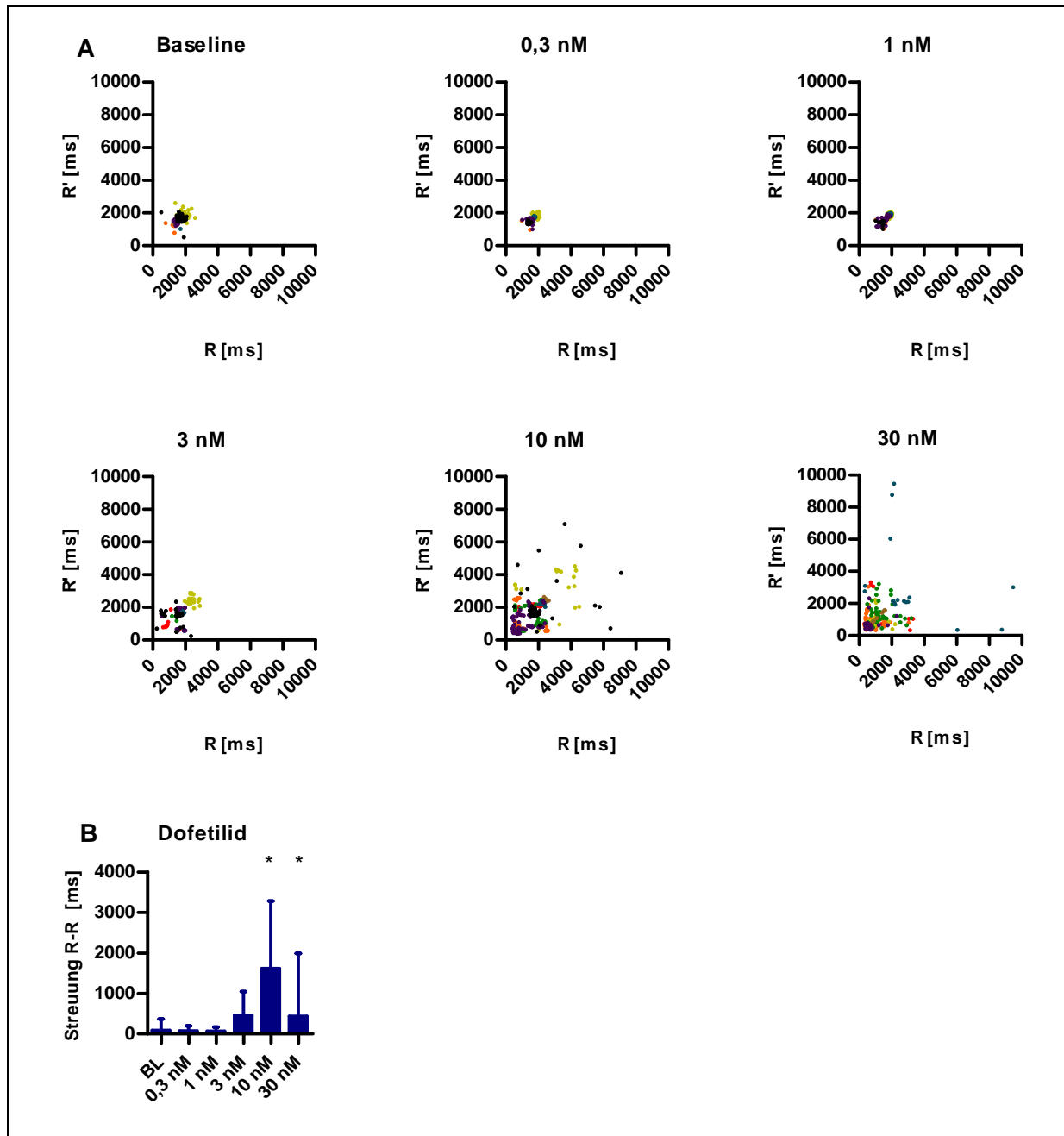


Abbildung 52: Dofetilid, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=7, *=P<0,05.

3.14.3.8 Ibutilid

Die Referenzmessung zeigte einige EHTs, die nicht komplett gleichmäßig kontrahierten. Dieses Bild war ähnlich bis zu einer Konzentration von 10 nM, bei der allerdings Muster von verfrühten Extra-Kontraktionen auftraten. Im R-R' Diagramm tauchten hier bei einigen EHTs die typischen Muster der frühen Extra-Kontraktionen auf. Ibutilid in einer Konzentration von 30 und 100 nM führte zu unregelmäßigen Kontraktionen und deutlicher Streuung der R-R Intervalle, die auch statistisch signifikant größer waren, als die der Referenzmessung.

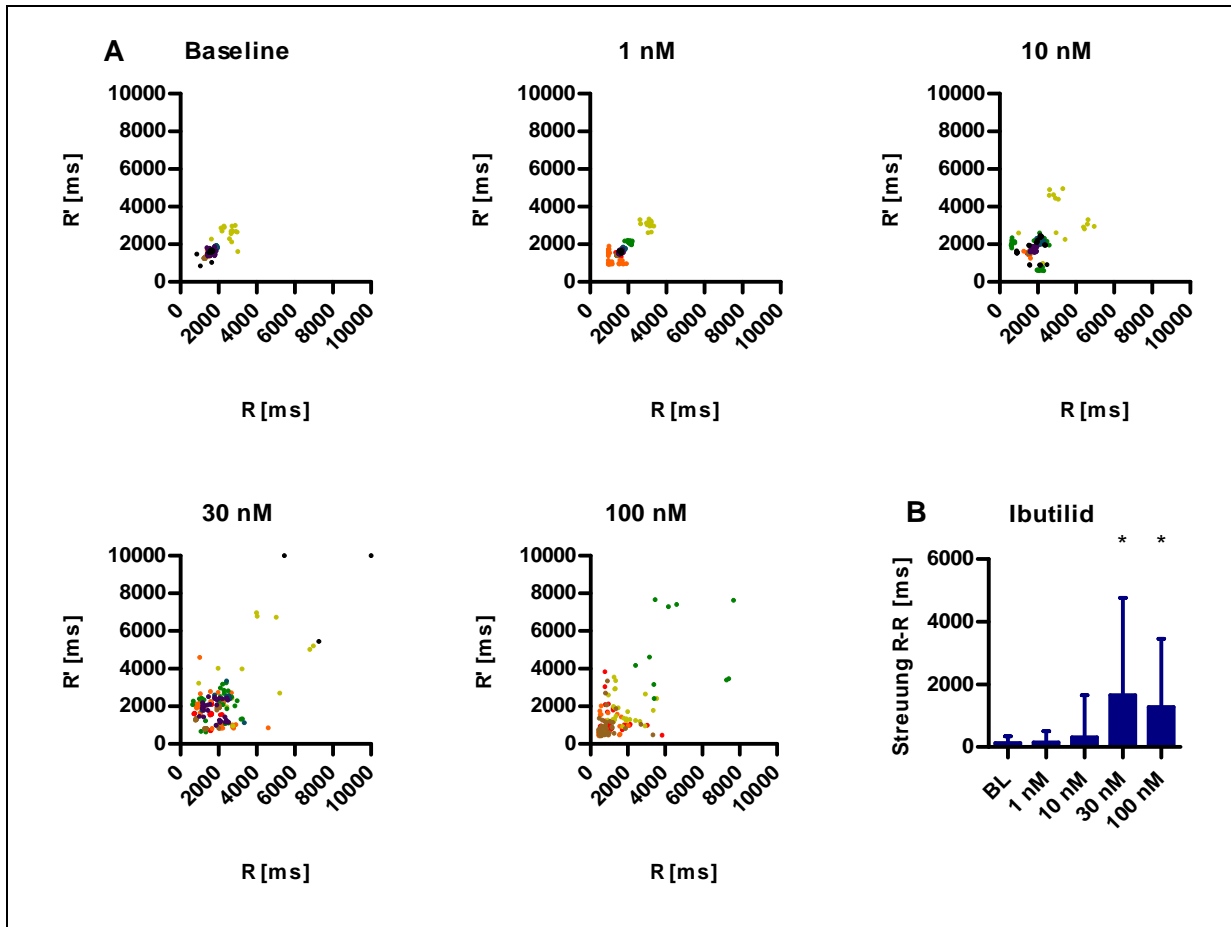


Abbildung 53: Ibutilid, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=7, *=P<0,05

3.14.3.9 Amiodaron

Bei der Messung von Amiodaron kam es zu einer Vergrößerung der R-R Abstände aufgrund sinkender Frequenz. Dadurch verschoben sich die Punkte in den R-R' Diagrammen nach rechts oben. Insgesamt nahm die Variabilität der R-R Intervalle zu, nach 250 min war dieser Unterschied auch statistisch signifikant. Die typischen Muster der frühen Extra-Kontraktionen traten allerdings nicht auf.

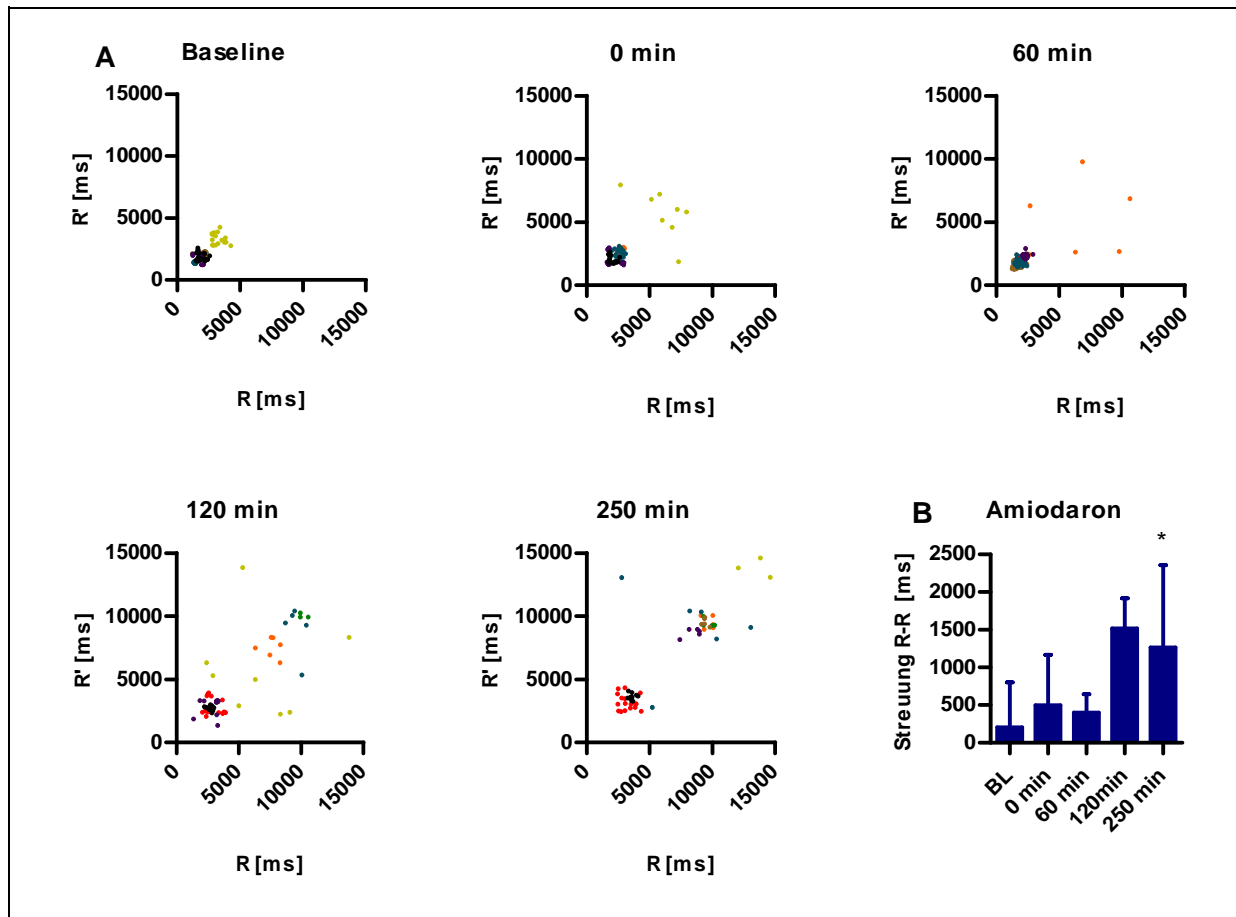


Abbildung 54: Amiodaron, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=8, *= $P < 0,05$.

3.14.3.10 Ampicillin

Unter dem Einfluss von Ampicillin waren keine statistisch signifikanten Veränderungen des Rhythmus festzustellen. Die Frequenz der EHTs variierte, so dass sich die Populationen auf der Achse $x=y$ verschoben. Bei der Messung von 100 μM Ampicillin traten einzelne frühe Extra-Kontraktionen auf.

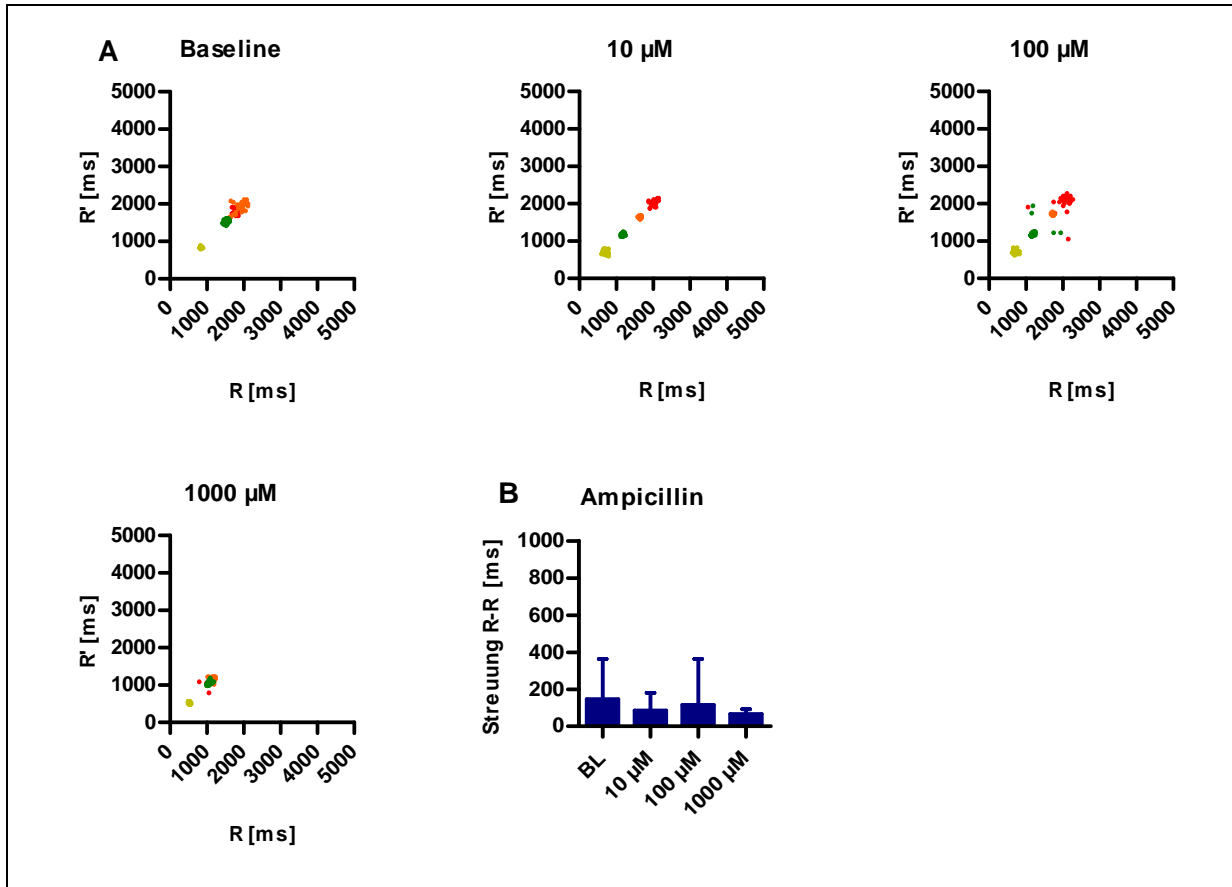


Abbildung 55: Ampicillin, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, $n=4$, $*=P<0,05$.

3.14.3.11 Verapamil

Der Einfluss von Verapamil brachte keine signifikanten Veränderungen der Regelmäßigkeit der Kontraktionen. Bei der Messung der Ausgangslage zeigten sich bereits interindividuelle Unterschiede, die auf unterschiedliche Frequenzen zurückzuführen waren. Eine Konzentration von 30 nM führte bei einigen EHTs zu unregelmäßigen Kontraktionen, insgesamt war die Veränderung aber nicht signifikant.

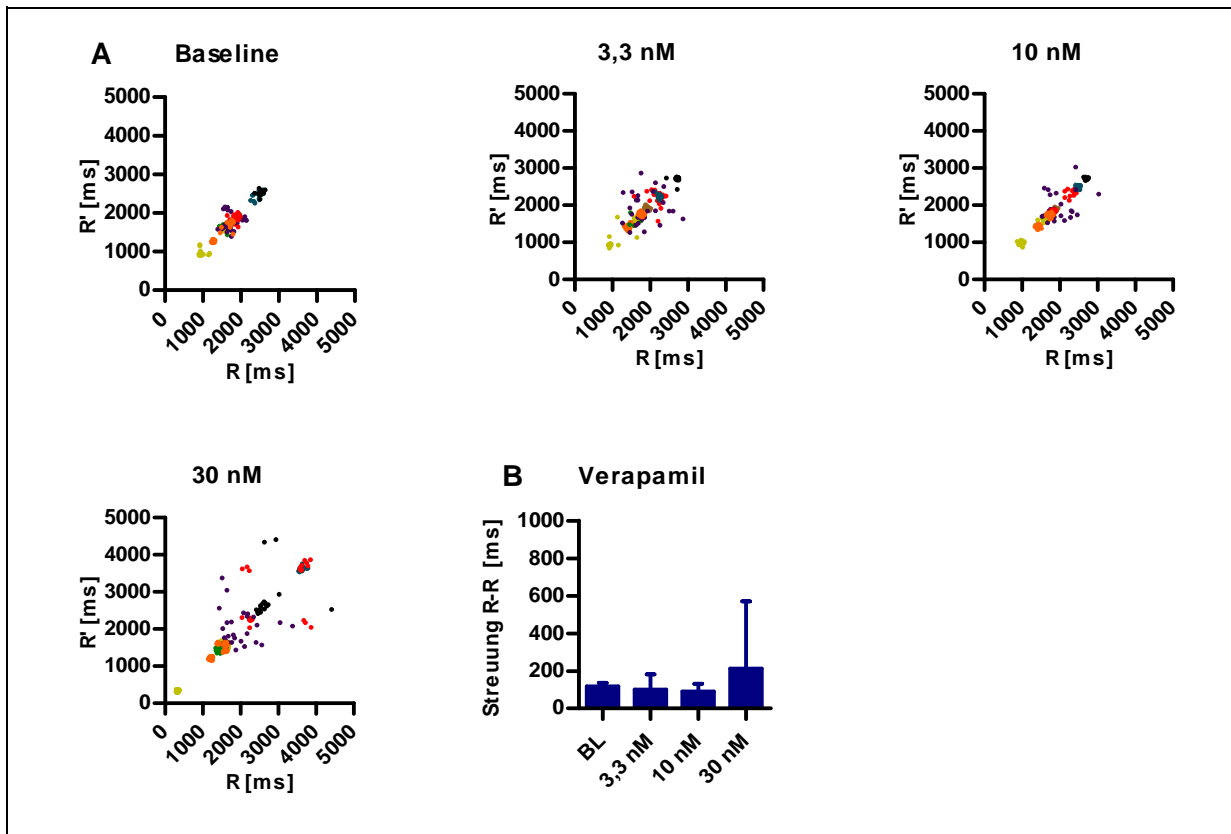


Abbildung 56: Verapamil, (A) R-R' Analyse, jede Farbe stellt ein EHT dar, (B) Auswertung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen als Streuung des R-R Intervalls, Median \pm IQR, n=12, *=P<0,05.

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte folgendes gezeigt werden:

- Ein Protokoll zur kardialen Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen konnte etabliert werden und damit Kardiomyozyten in hoher Konzentration erschaffen werden.
- Aus dieser humanen Zellpopulation konnten spontan kontrahierende künstliche Herzgewebe hergestellt werden.
- Und an diesen künstlichen Herzgeweben konnten konzentrationsabhängige Effekte von proarrhythmischen Substanzen nachgewiesen werden.

4.1 Zellkultur von Stammzellen

Ein guter allgemeiner Zustand der Kultur von undifferenzierten humanen embryonalen Stammzellen (hESC) war eine wichtige Voraussetzung und der Ausgangspunkt für alle weiteren Versuche, die mit diesen Zellen unternommen wurden. Das größte Problem bei der Handhabung von hESC war die spontane Differenzierung der Zellen, die bei Fehlern in der Zellkulturtechnik schnell auftrat. Je größer der Anteil an differenzierten Zellen in der Kultur, desto weniger standardisiert war die Zellpopulation und desto schlechter ließen sich Versuche mit diesen Zellen durchführen und reproduzieren. Dies konnte soweit führen, dass die Kultur bei zu hohem Anteil an differenzierten Zellen verworfen werden musste.

Zu typischen Fehlern bei der Kultur von hESC zählte zum Beispiel das Versäumen der rechtzeitigen Passage. Aus Gründen, die nicht genauer verstanden sind, neigten große Kolonien zur spontanen Differenzierung von der Mitte aus (siehe auch Abbildung 13), so dass eine um einen Tag verspätete Passage schnell zu zahlreichen differenzierten Bereichen führen konnte. Ähnlich wichtig waren der tägliche Wechsel des Mediums und das Vorwärmen aller Flüssigkeiten, mit denen die Zellen in Kontakt kamen. Kam es doch zu vereinzelt differenzierten Bereichen in der Kultur, so wurden diese gezielt entfernt, so dass sie bei der Passage nicht mitgeführt wurden.

Ein weiterer typischer Fehler war eine falsche Größe der Fragmente bei der Passage. Da Stammzellen aufgrund ihrer Neigung zur Apoptose nach Vereinzeln (Anoikis) in Fragmenten passagiert werden, spielte die richtige Größe dieser Fragmente eine wichtige Rolle. Waren sie zu klein, wuchsen sie nicht an, sondern starben ab. Waren sie zu groß, wuchsen die Kolonien haufenartig und neigten zur spontanen Differenzierung. Erschwerend kam hinzu, dass sich unterschiedliche Linien von Stammzellen graduell unterschiedlich verhielten.

Die Kulturbedingungen mussten also für jede Zelllinie individuell angepasst werden. Dazu zählten die Größe der Fragmente, die Inkubationszeit mit Kollagenase bei der Passage, der Einsatz vom Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 nach der Passage und die Konzentration an FGF-2 im Medium. FGF-2 wird mit anti-apoptischen und differenzierungs-hemmenden Eigenschaften in Verbindung gebracht und spielt daher bei der Stabilisierung des undifferenzierten Status der Zellen eine wichtige Rolle (Lanner & Janet Rossant 2010; Greber et al. 2007).

Die Zellkulturtechnik ohne Kokultur mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) wurde im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt (C. Xu et al. 2001). Für die andere Methode der Kultivierung auf murinen Fibroblasten (siehe unter 2.2) mussten diese Zellen ständig als Zelllinie mitgeführt werden. Da sie nur in Passage 4 verwendet werden konnten, bedeutete dies recht viel Aufwand und genaue Planung. Zusätzlich war es erforderlich, dass diese Zellen vor der Kokultur mitotisch inaktiviert wurden, da sie sonst die Stammzellen überwuchert hätten. Für diesen Zweck wurde Mitomycin C eingesetzt, ein potentiell krebserregendes Zytostatikum, dessen Einsatz immer ein gewisses Risiko birgt. Die alternative und bevorzugte Methode basierte auf Zellkulturplatten, die mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet wurden (Matrigel™), und auf Medium, welches für 24 h auf murinen Fibroblasten inkubiert und so konditioniert wurde. Dieses konditionierte Medium war bei -80° C über einige Zeit stabil, so dass es für Monate im Voraus hergestellt und nach Bedarf aufgetaut werden konnte. Die deutlich vereinfachte Handhabung war der Grund für die bevorzugte Verwendung dieses Protokolls.

Die Haltung von humanen embryonalen Stammzellen erfordert also einige Erfahrung, und Fehler werden schnell bestraft. Ein guter Allgemeinzustand der Zellen zu Beginn eines Experiments ist Voraussetzung für dessen Gelingen und dessen Reproduzierbarkeit.

4.2 Embryoidkörperchen und Differenzierung

In den bisher veröffentlichten Protokollen zur kardialen Differenzierung (siehe Tabelle 3) basiert die Herstellung von EBs auf Stammzellen, welche auf MEFs kultiviert werden. Da diese Methode der Kultivierung entscheidende Nachteile mit sich brachte, vor allem in der Handhabung, war es ein bedeutender Schritt, EBs von auf Matrigel™ kultivierten Stammzellen herstellen zu können. Ursächlich für die bisherigen Schwierigkeiten könnte die etwas andere Morphologie der Kolonien gewesen sein. Die auf MEFs gewachsenen Kolonien erschienen eher kompakt und etwas haufenartig, im Gegensatz zu den eher dünnen und flächigen Kolonien der auf Matrigel™ gewachsenen Zellen (Abbildung 13). Die kompakte Morphologie schien die EB-Formation zu begünstigen, innerhalb von 24 h in Zellkulturflaschen mit niedriger Adhäsion bildeten sich EBs. Die Fragmente der dünnen und flächigen Kolonien (Matrigel™) starben innerhalb der ersten 24 Stunden größtenteils ab, es waren nur vereinzelte EBs zu beobachten.

Der Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 war in der Lage, genau die Signalkaskade zu blockieren, welche in Stammzellen nach Vereinzelung aktiviert wird und die Apoptose einleitet (Watanabe et al. 2007). Zusätzlich kam konditioniertes Medium in den ersten 24 h zum Einsatz, da die Zellen in dieser Umgebung optimale Bedingungen vorfanden. Dadurch konnte das Absterben der Zellen innerhalb der ersten 24 h gezielt verhindert und so die Formation von EBs wesentlich verbessert werden.

Die Differenzierung der EBs funktionierte auch nach zahlreichen Versuchen nicht wie im zugrundeliegenden Protokoll (Yang et al. 2008) beschrieben. Zur Optimierung wurden verschiedene Aspekte modifiziert, sie wurde anhand von drei Parametern beurteilt: erstens die Morphologie der EBs, zweitens die Anzahl von kontrahierenden EBs nach 15 Tagen Differenzierung und drittens die Expression von PDGFR2 und KDR nach drei Tagen Differenzierung, als postulierte frühe Marker von kardialen Zellen unter den mesodermalen Progenitoren (Kattman et al. 2011).

Das Medium, welches als Grundlage während der Differenzierung verwendet wurde, hatte einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie der EBs. Der Wechsel von StemPro-34 auf RPMI/B-27 ging mit deutlich weniger Zerfall, weniger nekrotischen, schwarz verfärbten EBs und einer besseren Morphologie insgesamt einher.

Während der Differenzierung war die erste Stufe des Protokolls die wichtigste, da sich hier die Zellen noch in alle Zelltypen aus allen drei Keimblättern entwickeln konnten. Je weiter die Differenzierung voranschreitet, desto kleiner wird der Spielraum für die weitere Entwicklung. Entwickeln sich die Zellen in den ersten Tagen hauptsächlich in endodermale oder ektodermale Zellen, hat man keine Möglichkeit mehr, Kardiomyozyten aus ihnen zu gewinnen. Entwickeln sie sich hingegen in Zellen des mesodermalen Keimblatts, können sie zu kardialen Vorläuferzellen werden.

Die Wachstumsfaktoren BMP-4 und Activin A, beides Proteine der TGF- β (*transforming growth factor* beta) Superfamilie, spielten eine wichtige Rolle in dieser frühen Phase der Entwicklung. Die Analyse der Expression von KDR und PDGFRA ergab, dass verschiedene Konzentrationen in unterschiedlichen Kombinationen dieser beiden Wachstumsfaktoren zu erheblichen Veränderungen führten. Bei KDR lag der maximale Unterschied in der Expression bei einem Faktor von etwa 32 (über fünf CT-Werte), bei PDGFR bei einem Faktor von etwa 1024 (über zehn CT-Werte). Dies belegte den erheblichen Einfluss dieser Faktoren auf die Differenzierung. Versuche mit anderen Zelllinien ließen den Schluss zu, dass die optimale Zusammensetzung der Wachstumsfaktoren in Stufe 1 des Protokolls für jede Zelllinie individuell bestimmt werden muss. Dies könnte auf unterschiedliche endogene Expression der Faktoren, aber auch deren Rezeptoren zurückzuführen sein.

Die Beobachtung, dass eine ineffiziente Differenzierung durch eine Veränderung der Inkubationsdauer von Stufe 1 moduliert werden konnte, spricht für die Tatsache, dass die Zeit ebenfalls eine wichtige Variable war. Die mesodermale Entwicklung der Zellen ist nach der höchsten Expression von T (Brachyury) abgeschlossen und ab diesem Zeitpunkt muss der Einfluss von WNT-Signalen mit DKK-1 unterbunden werden, um die Zellen in Kardiomyozyten zu überführen. Die mesodermale Entwicklung schien also variabel zu sein und sich mit der Dauer in Kultur oder mit geringen Veränderungen der Kulturbedingungen (anderer

Hersteller von FGF-2, unterschiedliche Chargen von konditioniertem Medium, etc.) zu verändern. Es ist bekannt, dass WNT-Signale zu Beginn der Differenzierung für die mesodermale Entwicklung sehr wichtig sind, so dass eine vorzeitige Inhibition durch DKK-1 die vollständige Abwesenheit von kontrahierenden EBs nach der Differenzierung erklären kann, wie bei einigen Chargen beobachtet werden konnte.

Eine variable Qualität der undifferenzierten Zellen könnte ebenfalls die Differenzierung beeinflusst haben. Dieser Aspekt war allerdings schlecht zu kontrollieren, so dass sich die Schwierigkeit ergab, einen wichtigen Parameter nicht im Laufe der einzelnen Charge bestimmen zu können. Die Qualität der undifferenzierten Zellen sollte für diese Experimente also so standardisiert wie möglich sein.

Die Expressionsprofile, die von Proben an Tag zwei, vier, sechs und acht angefertigt wurden, zeugen von einem reproduzierbaren Protokoll. Alle untersuchten Chargen zeigten bei allen untersuchten Transkripten ähnliche Profile mit geringer Abweichung. Weiterhin waren alle Gene in der zu erwartenden zeitlichen Reihenfolge exprimiert. Die Surrogate für mesodermale Entwicklung (Brachyury und MESP1) wurden an Tag zwei maximal exprimiert. Gene, die für sehr frühe kardiale Vorläufer stehen (PDGFRA und KDR), wurden ab Tag vier exprimiert und ISL1, als früh-kardialer Transkriptionsfaktor ab Tag sechs. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Gene, welche für sarkomerische Proteine kodieren (vor allem MYH6, aber auch TNNT1 und TNNT2), bereits ab dem vierten Tag der Differenzierung deutlich exprimiert wurden und damit vor dem als früh-kardialen Marker beschriebenen ISL1. Dies lässt vermuten, dass das kardiale Schicksal der Zellen bereits vier Tage nach Einsetzen der Differenzierung entschieden ist.

Das Ergebnis der gerichteten Differenzierung war mit durchschnittlich 72% spontan kontrahierenden EBs und 40% Kardiomyozyten im Vergleich mit den veröffentlichten Protokollen ein guter Wert (Kehat et al. 2001; Mummery et al. 2003; Laflamme et al. 2007; Yang et al. 2008; X. Q. Xu et al. 2008; siehe auch Tabelle 3). Die höchste veröffentlichte Effizienz bei der kardialen Differenzierung wird von Yang und Kollegen mit 40 bis 50% Kardiomyozyten angegeben. Allerdings kamen auch immer wieder Chargen vor, die nicht erfolgreich in Kardiomyozyten differenziert wurden und kaum spontan kontrahierende EBs

aufwiesen. Die Gründe hierfür sind unklar, es konnte kein systematischer Fehler bei diesen Chargen festgestellt werden. Potentielle Fehlerquellen waren zum Beispiel der Zustand der hESCs vor der EB-Formation (unterschiedliche Größe der Kolonien), die Größe der Fragmente und damit die Größe der EBs und die Adhäsion der EBs an die Zellkulturflaschen trotz Oberfläche mit niedriger Zelladhäsion. Die durch diese Umstände bedingte verzögerte mesodermale Entwicklung und der verfrühte Einsatz von DKK-1 könnten eine mögliche Erklärung sein. Weiterhin kam es durch mangelnde Möglichkeiten der Kontrolle von Anzahl und Größe der EBs und die lange Verweildauer in den Stufen gelegentlich zur Übersäuerung des Mediums.

4.3 Exkurs: Expression von Troponin in hESC

Der Troponinkomplex, bestehend aus Troponin T, C und I, ist Bestandteil des Sarkomers. Er ist im dünnen Filament lokalisiert und an Tropomyosin gebunden. Bei der elektromechanischen Kopplung nimmt der Troponinkomplex eine zentrale Rolle ein, da er das Calciumsignal im Zytoplasma in die Kontraktion des Sarkomers übersetzt. Es ist nicht bekannt, dass Troponine eine physiologische Rolle außerhalb der Muskelkontraktion spielen. Aus diesem Grund gibt es auch keine Hypothese, welche die Expression in undifferenzierten hESC erklären könnte. Es wurden allerdings einige Schritte unternommen, um systematische Fehler als Ursache für die gefundene Expression auszuschließen. Die amplifizierten Transkripte wurden aufgereinigt und sequenziert, mit dem Ergebnis, dass tatsächlich mRNA von Troponin I und T amplifiziert wurde. Weiter wurde der Nachweis auf die Protein-Ebene übertragen, indem Troponin T per Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wurde.

Drei Tatsachen an diesen Beobachtungen waren besonders interessant. Erstens war es die hohe Reproduzierbarkeit der qPCR. Es wurden insgesamt 13 Experimente untersucht und bei allen war die Expression von TNNT2 und TNNI3 nach zwei Tagen deutlich vermindert. Zweitens war es die Analogie der Ergebnisse der Immunfluoreszenz mit den Daten der qPCR. Differenzierte Zellen zeigten eine deutlich verminderte Expression auf mRNA-Ebene und ein vermindertes Signal in der Immunfluoreszenz. Und drittens war es die Beobachtung, dass die Reduktion des Expressionsniveaus unabhängig vom weiteren Verlauf der Differenzierung war. Partielle Differenzierung konnte also nicht als Ursache gelten.

4.4 EHTs

Der Anteil an Kardiomyozyten nach der Differenzierung spielte eine wesentliche Rolle für die Herstellung von EHTs aus diesen Zellen. Durch einige misslungene Versuche mit Chargen, die einen Anteil von geschätzten 20 bis 40% kontrahierenden EBs enthielten (und damit geschätzte 10 bis 20% Kardiomyozyten), konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass es eine Art Schwellenwert des Anteils an Kardiomyozyten geben muss, um koordiniert kontrahierende EHTs herzustellen. Wurde dieser Schwellenwert bei der Differenzierung unterschritten, befanden sich zu wenig Kardiomyozyten im EHT, so dass diese kein Synzytium bilden konnten. Es konnte so kein Netzwerk von Muskelzellen entstehen, welches sich über das gesamte EHT erstreckte und in dem alle Zellen elektrisch gekoppelt waren. Dies war die Voraussetzung für eine koordinierte Kontraktion, bei der das schnellste Schrittmacherzentrum den Rhythmus vorgibt. Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in der Entwicklung der EHTs nach der Herstellung wieder. Nach etwa ein bis zwei Tagen konnte man in der Matrix einzelne Zellen erkennen, die spontan und unabhängig voneinander kontrahierten. Nach drei bis vier Tagen waren kleinere Bereiche zu erkennen, die synchron kontrahierten. EHTs mit zu wenig Kardiomyozyten blieben auf dieser Entwicklungsstufe stehen, während sich EHTs mit ausreichender Dichte an Kardiomyozyten weiter entwickelten, so dass sie zu synchronen Kontraktionen fähig waren. EHTs, welche sich gut entwickelten und die Silikonstäbchen sichtbar auslenkten, stammten alle aus Chargen, bei denen im Mittel ca. 80% der EBs spontan kontrahierten. So konnte der Schwellenwert auf etwa 30% Kardiomyozyten geschätzt werden.

Bemerkenswert war die Ausrichtung der Zellen im EHT. Wie in den Immunfluoreszenzaufnahmen (Abbildung 26) und HE-Färbungen (Abbildung 25) gezeigt, bildeten sich aus den vereinzelt Zellen in der Fibrinmatrix Stränge von Kardiomyozyten, die sich wie ein Netzwerk durch das gesamte EHT zogen. Dabei war die Orientierung stets entlang der Kraftlinien, also zwischen den Silikonstäbchen. Diese Orientierung setzte bereits nach wenigen Tagen ein und war an Tag acht gut zu erkennen. Um die Orientierung der Zellen und die Organisation in Strängen zu erklären, diente das Modell der Kraftlinien. Bereiche in den EHTs, durch die keine Kraftlinien führten, entwickelten auch keine Stränge von Kardiomyozyten. Ein Bereich, in dem sich schnell Kardiomyozyten zu einem Strang zusammenschlossen und so Spannung aufbauten, konnte benachbarte Bereiche entlasten.

Die Zellen in diesen Bereichen ohne Kraftlinien schienen sich nicht zu entwickeln und starben schließlich ab. Diese Hypothese unterstützt die relativ homogene Verteilung von langgestreckten Kardiomyozyten in acht Tage alten EHTs und die Muskelstränge mit wenigen Zellen in den Zwischenräumen in 42 Tage alten EHTs (Abbildung 25).

Die Färbung vom intermediären Filament Vimentin, als Marker für Fibroblasten-artige Zellen, zeigte ebenfalls eine hohe Organisationsstufe für diese Zellen im EHT. Im Inneren der EHTs waren kaum Vimentin-positive Zellen zu finden, wohingegen die äußere Schicht komplett mit Fibroblasten bedeckt war (Abbildung 26). Möglicherweise wanderten diese Zellen gezielt an die Oberfläche des EHT und proliferierten dort, so dass ein Pseudoepithel gebildet wurde. Eine solche Orientierung der Zellen steht den bisher veröffentlichten Ergebnissen von kaum ausgerichteten Kardiomyozyten in EBs (Mummery et al. 2003; Laflamme et al. 2007) gegenüber. Auch in künstlichen Herzmuskelkonstrukten konnte bis vor kurzem keine ähnliche Orientierung gezeigt werden (Shapira-Schweitzer et al. 2009; Caspi et al. 2007). Erst Tulloch und Kollegen konnten Konstrukte aus Kardiomyozyten von humanen embryonalen Stammzellen zeigen, die eine ansatzweise Orientierung zeigen (Tulloch et al. 2011). Eine Elongation der Zellen ist aber auch in dieser Arbeit kaum zu erkennen, ebenso wenig eine gleichmäßige Verteilung der Querstreifung (Abbildung 26).

Man erkennt auch, dass in den EHTs noch Platz für mehr Kardiomyozyten war. EHTs aus neonatalen Zellen der Ratte bestehen aus 400 000 Zellen, für die humanen EHTs wurde die Zellzahl bereits auf 600 000 erhöht, um den hohen Anteil an Nicht-Kardiomyozyten in der differenzierten Zellpopulation auszugleichen. EHTs aus neonatalen Zellen der Ratte entwickeln trotzdem zwei- bis dreifach höhere Kräfte als es die humanen EHTs taten (Hansen et al. 2010). Hätte man die Zahl der eingesetzten Zellen in den humanen EHTs weiter auf zum Beispiel 800 000 oder 1 000 000 erhöht, wäre man auf zwei Probleme gestoßen. Erstens war die gesamte Ausbeute an Zellen pro Differenzierung begrenzt, so dass eine Halbierung der produzierten EHTs ein empfindlicher Einschnitt gewesen wäre. Zweitens kamen in den älteren humanen EHTs Nester von Zellen vor, die auf eine Proliferation nach dem Gießen der EHTs schließen ließ (Abbildung 25). Diese Beobachtung überraschte nicht, da davon ausgegangen werden musste, dass ein beträchtlicher Teil der Nicht-Kardiomyozyten in den differenzierten EBs aus Fibroblasten-artigen oder wenig differenzierten Zellen bestand, die

hoch proliferativ waren. Zu viele und zu große Ansammlungen solcher proliferativen Zellen hätten die Ausbildung der Muskelstränge beeinflussen können. Für diese Arbeit unerheblich, aber in Zukunft eventuell interessant, ist die Frage, ob die Zellen, aus denen diese Nester hervorgehen, nach Transplantation *in vivo* auch zu neoplastischen Ereignissen (Teratomen) führen könnten.

4.4.1 Reifung

Um den Entwicklungsgrad der Kardiomyozyten im EHT-Format zu beurteilen, wurden die Genexpression, die Morphologie und die Elektrophysiologie untersucht. Die Reifung auf der Ebene der Genexpression wurde teilweise anhand von Transkripten untersucht, bei denen fetale und adulte Expressionsmuster bekannt sind. Bei Troponin I gilt die langsame, skeletale Isoform (*slow skeletal troponin I*, ssTNI, TNNI1) als fetale kardiale Variante, welche mit der Zeit von kardialem Troponin I (cTNI, TNNI3) abgelöst wird (Bhavsar et al. 1991; Krüger et al. 2006). Ähnlich verhält es sich bei α - und β -MHC (MYH6 und MYH7), hier gilt α -MHC als die fetale und β -MHC als die adulte humane Isoform (Lompre et al. 1981; Lompré et al. 1984). Die Expression von SLC8A1 (Natrium-Calcium-Austauscher, NCX) und ACTC1 (kardiales α -Aktin) korreliert mit der Anzahl und Größe der Kardiomyozyten, es sind keine unterschiedlichen Expressionsmuster oder Isoformen in adulten und fetalen Kardiomyozyten bekannt. Das Genexpressionsmuster der beiden Transkripte SLC8A1 und ACTC1 (Abbildung 27) sprach dafür, dass es eine Tendenz zur zunehmenden Ausbildung von Kardiomyozyten im untersuchten Zeitraum gab. Die festgestellten Unterschiede in der Expression waren allerdings nicht signifikant. Diese Tendenz zu vermehrter Expression wurde von histologischen Untersuchungen unterstützt (HE-Färbung, Abbildung 25; Immunfluoreszenz, Abbildung 26). Die in die Länge gewachsenen Kardiomyozyten waren auf beiden Darstellungen gut zu erkennen und konnten eine vermehrte Expression von kardialem α -Aktin und NCX erklären. Die Expressionsmuster der untersuchten Troponin und Myosin Isoformen deuteten auf einen Wechsel vom fetalen in ein adultes Genprogramm hin, der im EHT-Format besonders deutlich wurde. Hier stieg die Expression der beiden adulten Isoformen cTNI (TNNI3) und β -MHC (MYH7) deutlich an, während die beiden fetalen Isoformen vermindert exprimiert wurden. Diese Beobachtung unterstützte die Hypothese, dass das EHT-Format die Reifung der Kardiomyozyten begünstigte.

Die Immunfluoreszenz zeigte eine deutliche morphologische Veränderung der Kardiomyozyten im EHT-Format im Gegensatz zu den EBs. Wie bereits erwähnt, waren die Zellen im EHT langgestreckt (Abbildung 26) und nicht mehr rund bis polygonal von ihrer Erscheinung wie im EB-Format (Abbildung 23). Die Orientierung entlang der Kraftlinien und die gleichmäßige sarkomerische Organisation des α -Aktinin stachen hervor. Weiterhin fanden sich zahlreiche dünne und lange Zellkerne, was einer Annäherung an die typisch Zigarren-förmigen Zellkerne im adulten Herz entsprach. Diese Formation ähnelte dem adulten menschlichen Herz wesentlich mehr, als die Kardiomyozyten im EB-Format, auch wenn ein unphysiologisches Verhältnis von Länge zu Durchmesser nicht dem Aspekt adulter Kardiomyozyten entsprach.

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen sprachen nicht einheitlich für einen verbesserten Reifungsprozess im EHT. Die Aufstrichgeschwindigkeit (dT/dV) war weit unter den Werten von adulten Kardiomyozyten. Zusätzlich deutete das maximale Diastolische Potential (MDP) auf sehr wenig ausgereifte Zellen in den EHTs hin. Überraschenderweise war es sogar weniger negativ als in den EBs vor der Dissoziation (-58 vs. -49 mV). Die Gründe hierfür blieben unklar. Die spontanen Aktionspotentiale ließen sich mit Nisoldipin komplett unterdrücken, nicht aber mit Tetrodotoxin. Die Depolarisation schien also von Calcium-Strömen getragen zu werden, im Gegensatz zur Natrium-Strom getragenen schnellen Depolarisation in adulten Zellen des Ventrikels. Die eher geringe Aufstrichgeschwindigkeit von 5,6 bis 10,4 V/s sprach ebenso gegen eine Depolarisation durch Natrium-Kanäle. TTX reduzierte die Aufstrichgeschwindigkeit deutlich, so dass von einem Anteil an Natrium-Strömen ausgegangen werden konnte. Ein stabiles MDP von -80 mV, wie in adulten Kardiomyozyten, war allerdings auch nicht zu erwarten, wenn man bedenkt, dass die Zellen im EHT spontan depolarisierten. Diese spontanen Depolarisationen wurden durch instabile Membranpotentiale nahe dem Schwellenpotential für Natrium-Kanäle verursacht. Ein geringes MDP im Bereich von -50 bis -70 mV wurde bereits mehrfach für Kardiomyozyten aus hESC beschrieben (Pekkanen-Mattila et al. 2010; F. Cao et al. 2008; He et al. 2003; Mummery et al. 2003). Die spontane Depolarisation war einerseits ein Zeichen für unreife Zellen, gleichzeitig aber auch eine Voraussetzung für die spontanen Kontraktionen der EHTs. Ein elektrophysiologischer Parameter, der in Ansätzen für die Reifung der Zellen im EHT-Format sprach, war die Länge des Aktionspotentials (APD). Das AP

der Gruppe mit längerer APD ähnelte dem von ventrikulären Kardiomyozyten (*APD long*, Abbildung 28 C), eine Plateauphase war deutlich zu erkennen. Ebenfalls wies diese Gruppe eine im Gegensatz zur Gruppe mit kürzerer APD etwas höhere Aufstrichgeschwindigkeit auf, auch wenn diese noch weit unter den Werten von adulten ventrikulären Kardiomyozyten lagen (dV/dT bis zu 350 V/s). Die Werte der Aufstrichgeschwindigkeit hängen direkt mit den Werten des MDPs zusammen, da nur bei niedrigen MDPs von mindestens -80 mV alle Natriumkanäle in einem aktivierbaren Zustand sind. Bei weniger negativen MDPs sind die Kanäle teilweise inaktiv, so dass nur ein Teil für die Depolarisation zur Verfügung steht (Pekkanen-Mattila et al. 2010).

Betrachtet man den Reifungsprozess der EHTs insgesamt, ergibt sich ein gemischtes Bild. Die Genexpressionsanalyse und die Morphologie sprachen eher für die Reifung der Zellen im EHT-Format, allerdings unterschieden sie sich elektrophysiologisch sehr von reifen Kardiomyozyten. Die betrachtete Zeitspanne könnte ein Grund für den geringen Grad an Reife der Zellen sein. Der spätere Zeitpunkt der Messung lag etwa sieben bis acht Wochen nach Beginn der Differenzierung, das humane Herz beginnt etwa ab der dritten bis vierten Woche der Embryonalentwicklung an zu schlagen. Für die Messung müsste man sich also an einem Herz orientieren, welches gerade vier bis fünf Wochen lang geschlagen hat, und nicht am adulten, welches 20, 30 oder 40 Jahre lang kontinuierlich geschlagen hat. Anhand der Daten von Mummery und Kollegen lassen sich die Kardiomyozyten aus Stammzellen in etwa mit 16 Wochen alten fetalen Kardiomyozyten vergleichen (Mummery et al. 2003).

4.5 Parameter der automatisierten Messung

Bei der automatisierten Messung der EHTs wurden diese für 60 Sekunden aufgenommen und die entwickelte Kraft über der Zeit aufgetragen. Aus diesen Kontraktionsdiagrammen wurden die Parameter Frequenz, Kraft, Kontraktionszeit (T1), Relaxationszeit (T2), Kontraktionsgeschwindigkeit (CV) und Relaxationsgeschwindigkeit (RV) von der Software berechnet. An diesen Parametern, bzw. deren Veränderung, sollte der Einfluss von proarrhythmischen Substanzen nachvollzogen werden. Das erste Problem bei der Auswertung war die starke Schwankung der Werte auch innerhalb derselben Charge von EHTs, besonders die Kraftentwicklung konnte um einen Faktor von zwei variieren. Da für alle EHTs einer Charge dieselbe Zellsuspension verwendet wurde, lagen die Ursachen für die

Unterschiede in der Entwicklung der EHTs. So könnten unterschiedlich ausgebildete Kardiomyozytenstränge im EHT unterschiedliches Schlagverhalten erklären. Um hier eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen, wurden alle nach einer Intervention gemessenen Werte auf den Wert der Ausgangsmessung des jeweiligen EHTs bezogen (Referenzmessung oder Ausgangslage), so dass die gemittelte Veränderung der Parameter für die Bewertung betrachtet wurde. Für die statistische Auswertung wurden die absoluten Messwerte verwendet und gepaarte Testverfahren angewendet. So konnten falsch positive und falsch negative Ergebnisse aufgrund von intra- und interindividuellen Schwankungen der Werte vermieden werden. Die Variabilität der Frequenz stellte ein geringeres Problem dar, weil sie deutlich kleineren Schwankungen unterlag (siehe Kapitel 3.14.3).

Ein weiteres Problem war die Abhängigkeit der Parameter untereinander. T1, T2, CV und RV waren stark von der Frequenz und der Kraft der EHTs beeinflusst. Die Messungen der Calcium-Konzentrationswirkungskurve (Abbildung 29) und der Einfluss von Verapamil (Abbildung 31) zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen Kraft und RV. T1 und T2 waren von der Frequenz abhängig, da bei höherer Frequenz die einzelnen Kontraktionen schneller abliefen als bei niedriger. Die Phase der Kontraktion und der Relaxation lief also schneller ab und benötigte weniger Zeit. Gleichzeitig war bei erhöhter Frequenz die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit erhöht, da innerhalb weniger Zeit die maximale Kraft erreicht wurde. Bei vermehrter Kraftentwicklung musste innerhalb der gleichen Zeit eine höhere Kraft erreicht werden, so dass die Kontraktionsgeschwindigkeit (und damit auch die Relaxationsgeschwindigkeit) zunahm. In der Praxis ließen sich diese Effekte nicht klar voneinander trennen und auch nicht genauer bestimmen. Es war aufgrund der Heterogenität der EHTs nicht zu erwarten, dass diese Effekte linear oder berechenbar sind, so dass man die störenden Faktoren nach der Messung hätte herausrechnen können. Es sind Schwellenwert-Effekte vorstellbar, da zum Beispiel ein EHT mit sehr niedriger Frequenz mit deutlich erhöhter Frequenz schlagen kann, ohne dass sich die Morphologie der einzelnen Kontraktionen ändern muss, solange nicht eine Kontraktion unmittelbar auf die nächste trifft.

Da die getesteten Substanzen ihr arrhythmogenes Potential über eine verminderte Repolarisation der Zellen verwirklichen (Blockade vom hERG-Kanal und dadurch

verminderter I_{Kr}) und sich die Repolarisationsphase des Aktionspotentials auf die Relaxation auf mechanischer Ebene projiziert, wurde besonders auf eine Veränderung der Relaxationsphase der EHTs geachtet. Die Parameter T2 und RV charakterisierten die Relaxation der EHTs, sie wurden allerdings auch von Kraft und Frequenz beeinflusst. Dies stellte ein Problem dar, denn auch Substanzen, welche spezifisch den hERG-Kanal blockierten, hatten in höheren Konzentrationen einen Einfluss auf die Kraftentwicklung der EHTs. Dieser Einfluss war kein negativ-inotroper Effekt im eigentlichen Sinn, sondern vielmehr eine Folge von unkoordinierten Kontraktionen mit mehreren Foci, die keine optimalen Verkürzungen des EHTs zuließen. Weiterhin war es möglich, dass die verminderte Kraftentwicklung darauf zurückzuführen war, dass die Repolarisationshemmung das MDP weiter anhub und so die Zellen nicht mehr erregbar waren, so dass ein Teil der Zellen nicht mehr aktiv an der Kontraktion teilnahm. Dafür sprach, dass bei nochmals höheren Konzentrationen keine Kontraktionen mehr zu beobachten waren.

Fielen bei der Messung einer Substanz verminderte Kraft und reduzierte RV zusammen, kam es kaum zu einer Verlängerung der T2, da sich die Effekte gegenseitig aufhoben. Der Effekt auf die RV musste in diesem Fall sehr deutlich sein, damit die Verlängerung der T2 wahrgenommen werden konnte. Dies führte bei der Beurteilung der T2 leicht zu falsch-negativen Ergebnissen. Andererseits konnte es bei der Beurteilung der RV leicht zu falsch-positiven Ergebnissen kommen, da die Reduktion der RV nicht unbedingt von einem direkten Effekt der Substanzen verursacht sein musste, sondern auch von einem indirekten Effekt durch reduzierte Kraft. T2 und RV waren also keine absolut verlässlichen Parameter für die Beschreibung der Relaxation der EHTs.

Zwei Ansätze zur Lösung dieses Problems standen zur Verfügung. Erstens konnte eine isolierte Verminderung der Relaxationsgeschwindigkeit ein wichtiges Kriterium sein. Dabei war die RV bei einer Konzentration vermindert, die noch keinen Einfluss auf die Parameter Kraft und Frequenz hatte. Der zweite Ansatz basierte auf dem Verhältnis von CV zu RV. Der Gedanke hinter diesem Parameter war, dass durch unspezifische, sekundäre Einflüsse auf die CV und RV durch primär verminderte Kraft oder veränderte Frequenz beide Parameter gleichermaßen betroffen waren. Wenn durch eine Substanz beides beeinflusst wurde, so sollte eine repolarisationshemmende Wirkung einen zusätzlichen Effekt auf die

Relaxationsgeschwindigkeit haben und das Verhältnis CV/RV sollte ansteigen. Auf die Kontraktionsgeschwindigkeit wirkte nur der indirekte, sekundäre Effekt der veränderten Kraft oder Frequenz, auf die RV dagegen zusätzlich der direkte Effekt der repolarisationshemmenden Substanzen. Das Verhältnis CV/RV war vom Ausmaß der Effekte auf die beiden Parameter abhängig. So waren Situationen möglich, in denen ein signifikanter Effekt auf die RV auftrat, kein Effekt auf die CV, aber das Verhältnis CV/RV trotzdem nicht signifikant verändert war.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Auswertung der Parameter war die Konzentration der jeweiligen Substanz, welche man für die Beurteilung betrachtete. Alle getesteten proarrhythmischen Substanzen führten bei diesen Versuchen in hohen Konzentrationen zu komplett unregelmäßigen Kontraktionsmustern. Eine Auswertung solcher Kontraktionsdiagramme führte leicht zu irreführenden Ergebnissen. Prinzipiell war eine Auswertung hier stark von den eingestellten Schwellenwerten abhängig. Wenn zum Beispiel unkoordinierte Kontraktionen bei der Messung zu einem Kontraktionsdiagramm mit vielen Spitzen unterschiedlicher Kräfte führte, war die Anzahl der ausgewerteten Kontraktionen, und damit auch das Ergebnis, direkt vom eingestellten Schwellenwert der Kraft abhängig. CV und RV waren wiederum von der Kraft abhängig, und die Frequenz war von der Anzahl der erkannten Kontraktionen abhängig. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass die Auswertung der Parameter von komplett unregelmäßigen Kontraktionen nicht sinnvoll ist. Es sollten also Konzentrationsstufen betrachtet werden, bei denen eventuell erste irreguläre Ereignisse auftreten, die aber sonst in Kraft und Frequenz weitgehend unverändert sind gegenüber der Referenzmessung.

Für die Auswertung der Parameter sollten folgende Voraussetzungen gegeben sein:

- Die Beurteilung einer Konzentrationsstufe, welche zu komplett unregelmäßigen Kontraktionen führt, ist nicht sinnvoll.
- Frequenz und Kraft sollten weitgehend unverändert sein gegenüber der Referenzmessung.

Folgende Veränderungen geben einen Hinweis auf eine verzögerte Relaxation:

- Die RV ist vermindert (idealerweise ohne Veränderung von Kraft oder Frequenz).
- Das Verhältnis CV/RV ist erhöht.
- Die T2 ist verlängert.

4.5.1 Einfluss der Substanzen

Substanz	RV↓	CV/RV↑	T2↑	Komplett unregelmäßig ab	IC ₅₀ (hERG)	FPS
Chinidin	300 nM	-	-	1000 nM	500 nM	30
Sertindol	10 nM	-	-	100 nM	14 nM	30
Cisaprid	30 nM*	-	-	100 nM	9,4 nM	30
Procainamid	100 µM	100 µM	-	300 µM	139 µM	30
E-4031	3 nM	10 nM	-	30 nM	7,7 nM	30
Thioridazin	3 µM	3 µM	3µM	30 µM	(30 nM)***	100
Dofetilid	1 nM	3 nM	3 nM	10 nM	3 nM	100
Ibutilid	10 nM	10 nM	10 nM	30 nM	10 nM	100
Ampicillin	-	-	-	-	-	30
Verapamil	10 nM*	-	-	-	200 nM	100
Amiodaron**	250 min*	-	-	-	1 µM	100

Tabelle 8: Einfluss der getesteten Substanzen auf die Parameter Relaxationsgeschwindigkeit (RV↓), das Verhältnis Kontraktions-/ Relaxationsgeschwindigkeit (CV/RV↑) und Relaxationszeit (T2↑), angegeben ist die niedrigste Konzentration, bei der ein signifikanter Effekt auftritt, IC₅₀(hERG) nach Redfern und Kollegen (Redfern et al. 2003), FPS= Bilder pro Sekunde bei der Messung, *= Kraft ebenfalls signifikant reduziert, **= Konzentration 1 µM, gemessen über ca. 4 h, ***= IC₅₀(hERG) von Thioridazin nicht eindeutig.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Untersuchungen noch einmal zusammengefasst. Von den insgesamt elf getesteten Substanzen haben zehn eine Affinität zum hERG-Kanal (basierend auf hERG-Kanal Assays) und bei acht Substanzen wurde in den untersuchten Konzentrationen ein Effekt erwartet. Verapamil konnte aufgrund der potenteren Wirkung auf den L-Typ Calciumkanal nicht im Bereich der hERG-blockierenden Konzentration getestet werden, die Kontraktionen der EHTs wurden bereits in einer Konzentration von 100 nM komplett unterbunden (Daten nicht gezeigt). Alle acht Substanzen, bei denen ein Effekt zu erwarten war, zeigten eine Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit. Die relevanten Konzentrationen lagen nah an den im hERG-Assay ermittelten IC₅₀ Werten. Verapamil führte in diesen Experimenten zu einer verminderten RV, ebenso Amiodaron. Allerdings führten beide Substanzen nicht zu einer isolierten Verminderung der RV, sondern beeinflussten gleichzeitig die Kraftentwicklung. Im Fall von Verapamil konnte man die verminderte RV als falsch positives Ergebnis werten, basierend auf den Konzentrationen, welche laut hERG-

Assays einen Effekt auf die Repolarisationsphase haben sollten. Betrachtet man unter diesen Aspekten die acht Substanzen, bei denen ein Effekt auf die Relaxation zu erwarten war, stellt man fest, dass bei sieben die RV isoliert vermindert war. Das Verhältnis CV/RV war bei fünf der acht Substanzen verringert. Cisaprid bildete bei beiden Betrachtungen (isolierte RV Verminderung und CV/RV) die Ausnahme und führte daher die Grenzen der Auswertung nach Parametern vor.

Betrachtet man die Ausmaße der Kraftverminderung, welche zu signifikanter Reduktion der RV führten, ergibt sich folgendes Bild: bei Verapamil (76,4% Kraft der Ausgangslage bei 10 nM) und bei der Calcium-KWK (56,3% bei 0,6 mM Ca^{2+}) war die Kraftentwicklung etwas mehr reduziert als bei Cisaprid (81,9% bei 30 nM). Man könnte also argumentieren, dass unter Cisaprid bereits eine geringere Veränderung der Kraft zu Reduktion der RV führte, so dass es auch einen direkten Einfluss der Substanz auf die RV geben musste. Ob in Zukunft tatsächlich mit solchen Schwellenwerten gearbeitet werden kann, müssen weitere Versuche zeigen. Die Ergebnisse von Cisaprid waren unter den gegebenen Voraussetzungen nur eingeschränkt beurteilbar.

Ein isolierter Effekt auf die RV war in dieser Gruppe von elf Substanzen der bedeutendste Surrogatparameter für eine Veränderung der Relaxationsphase und für einen Effekt von hERG-blockierenden Substanzen. Die in diesen Experimenten relevanten Konzentrationen stimmten mit denen in hERG-Kanal Assays ermittelten überein. Der Quotient CV/RV unterstützte diese Ergebnisse, schien aber selbst zu wenig empfindlich zu sein, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zuverlässig zu erkennen. Bei Cisaprid führte auch die Betrachtung von CV/RV nicht zu einem eindeutigen Ergebnis.

Die Relaxationszeit T2 als weiterer Parameter, der die Relaxationsphase der EHTs beschreibt, war bei drei Substanzen signifikant erhöht. Dies war insofern ein vielversprechendes Ergebnis, als dass diese drei Substanzen als einzige mit einer neueren Version der Messanlage untersucht wurden, und mit einer Auflösung von 100 Bildern pro Sekunde aufgenommen wurden. Eventuell war die Empfindlichkeit bei niedriger zeitlicher Auflösung zu gering, so dass ein Effekt auf die T2 nicht detektiert werden konnte. Weitere

Untersuchungen mit hoher zeitlicher Auflösung werden zeigen, ob die T2 ein verlässlicher Parameter ist.

4.6 Auswertung nach irregulären Ereignissen

Bei der genaueren Betrachtung der Kontraktionsdiagramme fiel auf, dass die ersten unregelmäßigen Kontraktionen bei vielen Substanzen als typische Muster erschienen. Es kam zu einzelnen, verfrühten Extra-Kontraktionen, die vom Erscheinungsbild im Kontraktionsdiagramm frühen Nachdepolarisationen (*early after depolarisation* - EAD) in Aktionspotential-Ableitungen ähnelten. Sie traten bei Konzentrationen auf, welche noch nicht zu komplett unregelmäßigen Kontraktionen führten. Die Regelmäßigkeit, Kraft und Frequenz der EHTs waren wenig beeinflusst.

Durch die Blockade des hERG-Kanals durch die getesteten Substanzen kam es zur Verlängerung der Repolarisationszeit und damit zur Verlängerung der Refraktärzeit der Kardiomyozyten. Es musste außerdem davon ausgegangen werden, dass fast alle Zellen im EHT aufgrund ihres unreifen Zustandes noch das Potential hatten, spontan zu depolarisieren. Die Arbeitshypothese bislang war, dass unter normalen Bedingungen, ohne Einfluss von Substanzen, eine Zelle, oder eine Gruppe von Zellen, welche die höchste Eigenfrequenz hat, die Frequenz für das gesamte EHT vorgab. So ließen sich der zum Teil sehr präzise Rhythmus und die Gleichförmigkeit der Kontraktionen der meisten EHTs erklären.

Überträgt man die Erkenntnisse der proarrhythmischen Wirkung von Substanzen am Herz auf das EHT-Model, kann man den Übergang von einem regulären in ein irreguläres Schlagmuster anhand von zwei Mechanismen theoretisch erklären. Erstens könnte es in geringerer Konzentration der Substanzen zu einer Verlängerung der Refraktärzeit kommen, die einige Zellen aufgrund unterschiedlicher Reife oder aufgrund der Position im EHT (regionale Konzentrationsunterschiede) stärker beeinflusst als andere, so dass es zu unterschiedlich verminderter Repolarisationsreserve kommt. Bedingt durch die längere Repolarisationsphase und die dadurch verlängerte Plateauphase, kommt es zu vermehrtem Calciumeinstrom in die Zelle. Dadurch steigt auch die Menge an Calcium im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und damit die Rate bzw. die Größe spontaner Calciumfreisetzungen (*calcium sparks*). Dieses Calcium wird durch den elektrogenen

Natrium-Calcium-Austauscher (NCX) aus dem Cytosol entfernt, wodurch es wegen des Einstroms von Natrium zur Depolarisation der Zelle kommt. Erreicht diese Depolarisation den Schwellenwert der Natriumkanäle, wird ein Aktionspotential ausgelöst. Die Tatsache, dass das maximale diastolische Potential (MDP) dieser Zellen mit ca. -50 mV nur wenige mV unter dem Schwellenwert der Natriumkanäle (ca. -40 mV) liegt, begünstigt die Entstehung von frühen Nachdepolarisationen. Die Zellen depolarisieren außerhalb des Rhythmus und führen so zu mitunter unvollständigen, verfrühten Kontraktionen, welche im Kontraktionsdiagramm als typische Doppelschläge erschienen. Zweitens könnte es in höherer Konzentration zu einer Art Dispersion im EHT kommen, so dass sich unterschiedliche Empfindlichkeiten der Zellen auf die Substanzen in elektrophysiologischen Barrieren äußern. So kann sich die Depolarisationswelle nicht mehr über das gesamte EHT erstrecken, sondern bleibt auf Teile des EHTs beschränkt. Bei genauer Betrachtung der Kontraktionen war gut zu erkennen, wie Teile des EHTs in unterschiedlichen Frequenzen kontrahierten und so gegeneinander arbeiteten. Auf diese Weise entstanden die eher chaotisch wirkenden Kontraktionsdiagramme, bei denen nur vereinzelte Kontraktionen die volle Kraft der Referenzmessung erreichten. Bei noch höheren Konzentrationen wurden die Depolarisationen und damit die Kontraktionen der EHTs komplett unterbunden. Bedingt durch den unreifen Charakter der Kardiomyozyten und dem damit verbunden weniger negativen MDP, kann es durch Blockade des I_{Kr} leicht zur kompletten Depolarisationshemmung kommen, so dass die Zellen nicht mehr erregbar sind.

Diese theoretischen Überlegungen wurden für die Auswertung nach irregulären Ereignissen zugrunde gelegt. Die vier Kategorien spiegelten die unterschiedlichen Kontraktionsmuster der EHTs wieder. Kategorie A bedeutete normales Schlagverhalten ohne verfrühte Kontraktionen. Der Rhythmus musste hier allerdings nicht gleichförmig sein, wie es besonders bei älteren EHTs häufig auftrat. EHTs in Kategorie B wiesen hauptsächlich ein normales Schlagmuster auf, allerdings waren einige irreguläre Ereignisse zu erkennen. Kategorie C bedeutete viele irreguläre Ereignisse bzw. ein komplett unregelmäßiges Schlagmuster mit unterschiedlichen Kräften bei jeder Kontraktion. In Kategorie D kontrahierten die EHTs nicht mehr.

Diese Methode hatte den Nachteil, dass die Auswertung subjektiv war. Dadurch war sie prinzipiell nicht so verlässlich wie eine automatisch ausgewertete, objektive Messmethode. Abhilfe hätte eine Verblindung der auswertenden Person geschaffen, wodurch der Aufwand gestiegen wäre. Ein weiterer Schwachpunkt der Methode lag in der Definition von irregulären Ereignissen und deren Variabilität. Die Kriterien waren eher weich, Beispiele waren zur Erklärung notwendig. Zusätzlich sahen die verfrühten Extra-Kontraktionen bei jedem EHT etwas anders aus, und bei manchen kamen sie gar nicht vor. Es wäre also denkbar, dass unterschiedliche Auswerter zu verschiedenen Ergebnissen gekommen wären.

4.6.1 Einfluss der Substanzen

Substanz	≤50% in Kategorie A	IC ₅₀ (hERG)
Chinidin	1 µM	500 nM
Sertindol	100 nM	14 nM
Cisaprid	30 nM	9,4 nM
Procainamid	100 µM	139 µM
E-4031	3 nM	7,7 nM
Thioridazin	30 µM	(30 nM)**
Dofetilid	10 nM	3 nM
Ibutilid	30 nM	10 nM
Ampicillin	-	-
Verapamil	-	200 nM
Amiodaron*	-	1 µM

Tabelle 9: Auswertung nach irregulären Ereignisse, angegeben ist die Konzentrationen, ab der die Hälfte oder weniger der EHTs noch in Kategorie A sind, *= Konzentration 1 µM, gemessen über 4 h, **= IC₅₀(hERG) nicht eindeutig

In Tabelle 9 sind die Konzentrationen angegeben, bei denen maximal die Hälfte der EHTs nicht mehr regelmäßig kontrahierte (Kategorie A), also entweder einige irreguläre Ereignisse zeigten (Kategorie B), komplett unregelmäßig kontrahierten (Kategorie C) oder gar nicht mehr kontrahierten (Kategorie D). Acht der elf getesteten Substanzen führten wie erwartet zu irregulären Ereignissen, wobei die relevanten Konzentrationen bei den meisten Substanzen etwas über der IC₅₀(hERG) lagen. Thioridazin bildete eine Ausnahme, hier lag die Konzentration um den Faktor 1000 über der

IC₅₀(hERG). Weder Ampicillin noch Amiodaron oder Verapamil zeigten in dieser Auswertung einen Effekt. Bei Ampicillin entsprach dies den Erwartungen, ebenso bei Verapamil, da Konzentrationen deutlich unter der IC₅₀(hERG) gemessen wurden. Amiodaron führte zwar zu einer drastischen Verminderung der Frequenz, so dass die Kontraktionen zwar keinem striktem Rhythmus mehr folgten, aber die typischen frühen Extra-Kontraktionen wurden durch diese Substanz nicht ausgelöst.

4.7 Analyse der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen

Das Ziel der Auswertung der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen bestand darin, die Mängel der Auswertung nach irregulären Ereignissen zu überwinden. Die Nachteile der nicht unproblematischen Definition der Ereignisse und die Subjektivität sollten durch eine automatische, definierte Auswertung überwunden werden, die einen messbaren Parameter als Surrogat benutzt, um unregelmäßige Kontraktionen zu identifizieren. Der Parameter, welcher zur Auswertung verwendet wurde, war das Ausmaß der Streuung des Abstands zwischen aufeinanderfolgenden Kontraktionen. Es wurden also alle Abstände von einer Kontraktion zur nachfolgenden aufgetragen und aus diesen Werten der Abstand zwischen der 10. und der 90. Perzentile (Dezile) berechnet. Die etwas unübliche Größe des Abstands der Dezilen sollte eine höhere Empfindlichkeit der Analyse garantieren, üblich ist bei Berechnungen der Streuung der Abstand der Quartilen. Aufgrund der Neigung zu bestimmten Mustern in den Kontraktionsdiagrammen, konnten keine Methoden zur Auswertung verwendet werden, die eine Normalverteilung der Werte voraussetzen.

Bei dieser Analyse wurden etwas andere Parameter stärker hervorgehoben als bei der Auswertung nach irregulären Ereignissen. Der Abstand von Kontraktion zu Kontraktion konnte stark variieren, wenn zum Beispiel die Frequenz sehr niedrig war, ohne dass irreguläre Ereignisse in Form von frühen Extra-Kontraktionen auftraten. Andererseits hatten

Substanz	Änderung Streuung R-R	IC ₅₀ (hERG)
Chinidin	1 µM	500 nM
Sertindol	300 nM	14 nM
Cisaprid	30 nM	9,4 nM
Procainamid	100 µM	139 µM
E-4031	10 nM	7,7 nM
Thioridazin	3 µM	30 nM
Dofetilid	10 nM	3 nM
Ibutilid	30 nM	10 nM
Ampicillin	-	-
Verapamil	-	200 nM
Amiodaron	1 µM / 250 min	1 µM

Tabelle 10: Auswertung der Gleichmäßigkeit der Kontraktionen, angegeben ist die Konzentration, ab der sich die Streuung R-R signifikant ändert

einzelne Extra-Kontraktionen kaum einen Einfluss auf die Variabilität über die gesamte Messung, da sie in der Menge der Kontraktionen pro Messzeitraum untergingen.

4.7.1 Einfluss der Substanzen

In Tabelle 10 sind die Konzentrationen der gemessenen Substanzen zusammengefasst, welche zu einer signifikanten Veränderung der Variabilität führten. Alle getesteten Substanzen mit arrhythmogenem Potential führten konzentrationsabhängig zu einer

signifikanten Steigerung der Streuung. Die Konzentrationen waren für alle Substanzen mit Ausnahme von Sertindol und Thioridazin in etwa im Bereich der hERG-Kanal blockierenden Konzentrationen, bei den meisten Substanzen leicht darüber. Von Sertindol und Thioridazin mussten Konzentrationen eingesetzt werden, die ein bis zwei Log-Stufen über den hERG-inhibierenden lagen. Ampicillin und Verapamil führten nicht zu unregelmäßigen Kontraktionen, Amiodaron hingegen schon. Unter Amiodaron kam es zu stark vereinzelt Kontraktionen, die im Abstand von bis zu 10 s erfolgten (Abbildung 54), welche aber gleichzeitig von ihrer Erscheinung her unauffällig waren. Die Software war nicht in der Lage, solche Kontraktionsmuster von komplett arrhythmischen Kontraktionen zu unterscheiden.

4.8 Gemeinsame Auswertung

4.8.1 Substanzen

Substanz	RV↓	CV/RV↑	T2↑	≤50% in Kategorie A	Änderung Streuung R-R	IC ₅₀ (hERG)
E-4031	3 nM	10 nM	-	3 nM	10 nM	7,7 nM
Dofetilid	1 nM	3 nM	3 nM	10 nM	10 nM	3 nM
Ibutilid	10 nM	10 nM	10 nM	30 nM	30 nM	10 nM
Chinidin	300 nM	-	-	1 µM	1 µM	500 nM
Sertindol	10 nM	-	-	100 nM	300 nM	14 nM
Cisaprid	30 nM*	-	-	30 nM	30 nM	9,4 nM
Procainamid	100 µM	100 µM	-	100 µM	100 µM	139 µM
Thioridazin	3 µM	3 µM	3µM	30 µM	3 µM	30 nM
Ampicillin	-	-	-	-	-	-
Verapamil	10 nM*	-	-	-	-	200 nM
Amiodaron**	250 min*	-	-	-	1 µM / 250 min	1 µM

Tabelle 11: Zusammengefasste Auswertung aller getesteten Substanzen, CV= Kontraktionsgeschwindigkeit, RV= Relaxationsgeschwindigkeit, CV/RV= Verhältnis CV zu RV, T2= Relaxationszeit, *= Kraft ebenfalls signifikant reduziert, **= Konzentration 1 µM.

Zur Auswertung der überprüften Substanzen wurden insgesamt drei verschiedene Verfahren angewendet. Um die repolarisationshemmende Wirkung auf die Kontraktionen zu beschreiben, wurden die Parameter RV und T2 ausgewertet, zusätzlich das Verhältnis CV/RV (Kapitel 3.14.1). Um den Übergang von einem regulären Kontraktionsmuster in ein irreguläres zu beschreiben, wurden die EHTs nach irregulären Ereignissen („≤50% in Kategorie A“, Kapitel 3.14.2) und nach der Regelmäßigkeit der Kontraktionen ausgewertet („Änderung Streuung R-R“, Kapitel 3.14.3).

Unter den getesteten Substanzen waren mit E-4031, Dofetilid und Ibutilid drei spezifische Inhibitoren des hERG-Kanals, deren $IC_{50}(hERG)$ im nanomolaren Bereich liegen (Redfern et al. 2003). Bei allen drei Substanzen führten Konzentrationen zu einer verminderten RV, die exakt mit denen im hERG-Assay ermittelten übereinstimmten (Ibutilid, Dofetilid), oder die sogar darunter lagen (E-4031). Die Betrachtung des Verhältnis CV/RV, welches bei zwei der drei Substanzen erhöht war, bedeutete hier keinen zusätzlichen Nutzen, da bei allen drei Substanzen die RV isoliert vermindert war, also ohne gleichzeitig verminderte Kraftentwicklung. Der Übergang von einem regulären in ein irreguläres Kontraktionsmuster fand bei allen drei Substanzen in einer Konzentration statt, welche etwas über der lag, die zur isoliert verminderten RV führte und damit etwas über dem Bereich der $IC_{50}(hERG)$. Damit entsprach die Auswertung nach Parametern der Erwartung, den Übergangsbereich zwischen normaler Kontraktion und komplett unregelmäßiger Kontraktion zu charakterisieren.

Die nächste Gruppe an getesteten Substanzen umfasste Chinidin, Sertindol, Cisaprid und Procainamid. Jede dieser vier Substanzen hat eine Affinität zum hERG-Kanal und verursacht nachweislich *in vivo* Arrhythmien vom Torsades de pointe Typ (Tabelle 2, www.qtdrugs.org). Gleichzeitig haben sie ihre pharmakologische Hauptwirkung abseits vom hERG-Kanal, zum Teil sind die Substanzen sehr unspezifisch. Auch bei dieser Gruppe lagen die Konzentrationen, die zu einer isolierten Verminderung der RV führten, im Bereich der $IC_{50}(hERG)$, bzw. etwas darüber. Cisaprid bildete hier die Ausnahme, da es gleichzeitig zu einer verminderten Kraft führte, so dass die Aussagekraft der verminderten RV eingeschränkt war. Auch die beiden zusätzlich ausgewerteten Parameter CV/RV und T2 brachten keinen weiteren Erkenntnisgewinn. Allerdings führten alle vier Substanzen, und damit auch Cisaprid, zu einem Übergang vom regulären zum irregulären Kontraktionsmuster, und dass in Konzentrationen, welche etwas über denen lagen, die zur verminderten RV führten. Hier bildete Sertindol die Ausnahme, da die benötigten Konzentrationen sich deutlich voneinander unterschieden.

Setzt man den in der Publikation von Redfern und Kollegen angegebenen Wert für die $IC_{50}(hERG)$ voraus, fiel bei Thioridazin die Diskrepanz zwischen den Konzentrationen, die im hERG-Assay ermittelt wurden, und denen, die im EHT-Modell zu Veränderungen führten, noch deutlicher auf. Eine verminderte RV, ein erhöhtes Verhältnis CV/RV und eine

verlängerte T2 waren bei Konzentrationen zu messen, die der 100-fachen $IC_{50}(hERG)$ entsprachen. Um die Regelmäßigkeit der Kontraktionen zu beeinflussen waren 100 bis 1000-fache Konzentrationen notwendig. Es gibt bei Thioridazin allerdings auch eine deutlich Diskrepanz zwischen $IC_{50}(hERG)$ und der Konzentration, bei der *in vivo* Arrhythmien vom Torsades de pointe Typ auftreten (Redfern et al. 2003). Diese Konzentration liegt mit etwa $10 \mu M$ in dem Bereich, in dem es zur Veränderung der Parameter im EHT-Model kommt. Es ist also möglich, dass diese Diskrepanz in den Eigenschaften der Substanz begründet liegt. Denkbar ist eine Modulation verschiedener Rezeptoren und Ionenkanälen, in deren Zusammenspiel der repolarisationshemmende Effekt auf die Kardiomyozyten abgeschwächt wird, oder eine Interaktion von Thioridazin mit dem hERG-Kanal an anderer Stelle als der porenformenden α -Untereinheit, welche im hERG-Assay heterolog exprimiert wird. Möglicherweise ist es also als Vorteil des EHT-Modells anzusehen, dass hier Konzentrationen zu Veränderungen führten, die nicht den Daten des hERG-Assays entsprachen, sondern den *in vivo* Daten. Eine wesentlich einfachere Erklärung wäre die Tatsache, dass der bei Redfern und Kollegen angegebene Wert für die $IC_{50}(hERG)$ nicht korrekt ist (Redfern et al. 2003), sondern der Wert eher im Bereich von $1 \mu M$ liegt, wie er in anderen Publikationen angegeben wird (Drolet et al. 1999; Tie et al. 2000; Pacher & Kecskemeti 2004).

Weitere Einsicht in den Wert der am EHT-Model generierten Daten lieferte die Analyse von Amiodaron. Unter dem Einfluss von Amiodaron kam es einerseits zur Verminderung der RV, andererseits aber auch zur Verminderung der Kraft. Weiterhin nahm die Streuung der R-R Intervalle zwar zu, aber ein komplett unregelmäßiges Kontraktionsmuster oder irreguläre Ereignisse traten nicht auf. Tatsächlich spiegeln diese diversen Ergebnisse den Charakter von Amiodaron wider. Als Klasse III Antiarrhythmikum zählt es zu den Kaliumkanalblockern, hat aber gleichzeitig eine Wirkung auf zahlreiche andere Strukturen („Klasse I bis IV Antiarrhythmikum). Klinisch betrachtet ist Amiodaron eines der wenigen Antiarrhythmika, das häufig eingesetzt wird, da es mit geringer proarrhythmischer Wirkung einhergeht, obwohl es eine deutliche Affinität zum hERG-Kanal hat.

Verapamil führte eine weitere Grenze des EHT-Modells vor. Und zwar war es nicht möglich, diese Substanz in einem Bereich zu messen, der nahe der $IC_{50}(hERG)$ liegt. Die potentere Wirkung auf L-Typ Calciumkanäle unterdrückte die Kontraktionen der EHTs. Die gemessenen

Konzentrationen zeigten die Auswirkungen einer primär negativ inotropen Intervention auf das System, vor allem die mit der Kraft verminderte RV legte die Verknüpfung dieser beiden Parameter offen und validierte damit die Betrachtung der isoliert verminderten RV.

Zu Bedenken ist, dass alle getesteten Substanzen, mit Ausnahme von E-4031, Ibutilid und Dofetilid, andere pharmakologische Ziele als den hERG-Kanal mit höherer Affinität beeinflussen. Chinidin zum Beispiel beeinflusst nicht nur den hERG-Kanal, sondern auch Natrium-Kanäle, Calcium-Kanäle und Acetylcholinrezeptoren. So konnte nie ausgeschlossen werden, dass nicht andere pharmakologische Wirkungen die gemessenen Parameter veränderten, sei es entweder direkt oder indirekt über Kraft oder Frequenz. Auch wenn die indirekten Effekte über die Kontrolle von Frequenz und Kraft ausgeschlossen werden sollen, so hatten auch solche Effekte einen Einfluss auf die Parameter, die statistisch nicht signifikant waren. Gerade durch das eher heterogene Auftreten von verschiedenen EHTs aus verschiedenen Chargen, wurden kleinere Veränderungen von der Statistik nicht erfasst.

4.8.2 Fazit

Die wichtigsten Erkenntnisse der Auswertung sind folgende:

- Substanzen mit Affinität zum hERG-Kanal führen zu Veränderungen der Kontraktionen im humanen EHT-Model
- Das einzige Kriterium, welches bei allen Substanzen mit proarrhythmischen Potential erfüllt war und gleichzeitig bei allen anderen Substanzen nicht erfüllt war, ist der Übergang von regelmäßigen zu unregelmäßigen Kontraktionen.
- Konzentrationen, die zu unregelmäßigen Kontraktionsmustern oder irregulären Ereignissen führen, liegen oberhalb von Konzentrationen, die zur Veränderung der Parameter RV, CV/RV oder T2 führen.
- Von den Parametern, welche die Relaxation der EHTs beschreiben (RV, CV/RV und T2), ist die isolierte Verminderung der RV der aussagekräftigste.

Bei der Betrachtung der Parameter fiel auf, dass die Empfindlichkeit, eine Veränderung der Relaxationsphase der EHTs zu detektieren, in der Reihenfolge RV, CV/RV, T2 abzunehmen schien. Die RV sollte allerdings zusammen mit der Kraft betrachtet werden, da sie sonst,

aufgrund der Abhängigkeit von Kraft und RV voneinander (siehe Calcium-KWK, Abbildung 29 und Messung von Verapamil, Abbildung 31) zu empfindlich war. Es kann in Zukunft eventuell mit Schwellenwerten für die Reduktion der Kraft gearbeitet werden, allerdings sind dafür weitere Versuche notwendig, um den Zusammenhang von Kraft und RV genauer zu bestimmen. Eine isolierte Verminderung der RV trat bei sieben von acht Substanzen auf, bei denen ein Effekt zu erwarten war (Ausnahme: Cisaprid), und sie trat nicht auf bei Verapamil, Amiodaron und Ampicillin. Damit war sie der zuverlässigste der drei Parameter. Das Verhältnis CV/RV (bei fünf von acht erhöht) und die Relaxationszeit T2 (bei drei von acht verlängert) könnten in Zukunft wichtig werden. Theoretisch sind es Parameter, die eine Veränderung der Relaxation der EHTs anzeigen, praktisch traf dies bei den elf bisher getesteten Substanzen eher nicht zu. Das Verhältnis CV/RV wurde aus den beiden Parametern CV und RV errechnet, die beide einer gewissen Variabilität unterlagen. Dadurch flossen beide Varianzen in diesen Parameter mit ein und infolgedessen war er wahrscheinlich nicht sensitiv genug, um die meist geringen Unterschiede zu detektieren. Bei der T2 spielte möglicherweise die zeitliche Auflösung der Aufnahme eine Rolle, so dass sie in Zukunft ein für die Auswertung nutzbarer Parameter sein könnte, da nur noch mit 100 Bildern pro Sekunde aufgenommen wird. Diese erhöhte Empfindlichkeit könnte auch die Aussagekraft des Quotienten CV/RV verbessern.

Da die Konzentrationen, welche zu Veränderung der Parameter RV, CV/RV oder T2 führten, bei jeder getesteten Substanz unterhalb der Konzentration lag, welche zu unregelmäßigen Kontraktionen führte, kann man davon ausgehen, dass hier die Übergangsphase charakterisiert wurde und die verlangsamte Relaxation tatsächlich ursächlich für die irregulären Kontraktionsmustern war.

Bisher sieht es so aus, als sei im Model der humanen EHTs das Auftreten von komplett unregelmäßigen Kontraktionen der spezifischste Surrogatparameter für ein proarrhythmisches Potential einer Substanz. Es ist der der einzige Parameter, der in diesen Experimenten bei allen Substanzen, bei denen ein Effekt zu erwarten war, verändert und bei allen Kontrollen unverändert war. Allerdings trat der Effekt bei relativ hohen Konzentrationen der Substanzen auf.

Um komplett unregelmäßige Kontraktionen zu identifizieren, war die mathematische Auswertung der Gleichmäßigkeit der subjektiven Methode der Auswertung von irregulären Ereignissen prinzipiell überlegen, da sie unabhängig von der auswertenden Person war und ihr außerdem klar definierte Regeln zugrunde lagen. Sie hatte allerdings den Nachteil, dass sie mehr Replikate benötigte, um präzise Aussagen treffen zu können. Vier Replikate sind die mathematische Mindestanforderung, um die statistische Signifikanz per Mann-Whitney-U Test errechnen zu können. Weiterhin wurde die mathematische Auswertung der Gleichmäßigkeit unzuverlässig, wenn die Frequenz sehr stark verringert war, wie am Beispiel von Amiodaron zu sehen.

4.8.3 Vergleich mit bisherigen Systemen

In der präklinischen Entwicklung werden bisher zur Evaluation des proarrhythmischen Potentials einer Substanz hERG-Kanal Assays, Untersuchungen an isolierten Purkinje-Fasern (vor allem aus Kaninchen) und Untersuchungen an lebenden Kaninchen, Hunden oder Schweinen eingesetzt. Bei allen Kandidaten, die als neue Arzneimittel zugelassen werden sollen, sind diese Untersuchungen von der EMA und FDA vorgeschrieben („*S7B Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals*“, U.S. Food And Drug Administration, www.fda.gov). Diese Untersuchungen sind aufwändig und teuer aufgrund der intensiven Tierversuche und in ihrer Aussagekraft nur begrenzt auf den Menschen übertragbar. Seit der erfolgreichen Generation von humanen embryonalen Stammzellen wurden einige Ansätze veröffentlicht, wie der Effekt von Substanzen auf humane Kardiomyozyten getestet werden kann. Diese Systeme basieren auf humanen Kardiomyozyten, die aus Stammzellen gewonnen werden, und in MEAs (*multielectrode array*) gemessen werden (Pekkanen-Mattila et al. 2010; Braam et al. 2010; Caspi et al. 2009; Liang et al. 2010). Bei MEA handelt es sich um Zellkulturschalen, in deren Boden Elektroden im Abstand von einigen Mikrometern eingearbeitet sind. So lassen sich die Feld-Potentiale messen, die von den Kardiomyozyten während der Kontraktion produziert werden. In den oben zitierten Arbeiten wurden die Effekte von einigen arrhythmogenen Substanzen gemessen, die sich zum Teil mit denen in der vorliegenden Arbeit getesteten überschneiden. Es deutet sich an, dass sich die von den Substanzen verursachten Veränderungen in den Messungen des Feldpotentials erst in deutlich höheren Konzentrationen zeigen, als im Modell der humanen EHTs. Ein weiterer Indikator, der für

eine höhere Empfindlichkeit des EHT-Modells spricht, ist die Tatsache, dass in diesen Arbeiten maximale Konzentrationen gemessen werden können, die im EHT-Modell keine Kontraktionen mehr zulassen (z. B. 5 μ M E-4031 bei Liang und Kollegen).

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene System besitzt einige Alleinstellungsmerkmale gegenüber den bisher veröffentlichten Systemen:

- Die Ausbildung eines eindeutig längs orientierten, elektrisch gekoppelten Herzmuskelgewebes.
- Die einfache Handhabung der Messung und Auswertung.
- Die Verwendung von humanen Kardiomyozyten und der damit einhergehenden Empfindlichkeit gegenüber arrhythmogenen Substanzen.

4.9 Engpässe bei der Anwendung

Um das in dieser Arbeit beschriebene Assay zu Evaluierung von arrhythmogenem Potential in größerem Maßstab einsetzen zu können, müssen noch einige Hürden überwunden werden. Die Differenzierung der Zellen ist zurzeit ein limitierender Faktor. Wenn durchgehend Zellen mit dem beschriebenen Protokoll differenziert werden, können etwa alle zwei Wochen maximal zwischen drei und fünf humane EHTs hergestellt werden. Um an größere Mengen von humanen Kardiomyozyten zu gelangen, müsste die Differenzierung ausgeweitet werden. Damit würden aber auch Kosten und Arbeitsaufwand ausgeweitet, da das benötigte Material teuer ist und die Differenzierung aufwändig. Zusätzlich müssten mehr undifferenzierte Zellen bereitgestellt werden.

4.10 Flussdiagramm

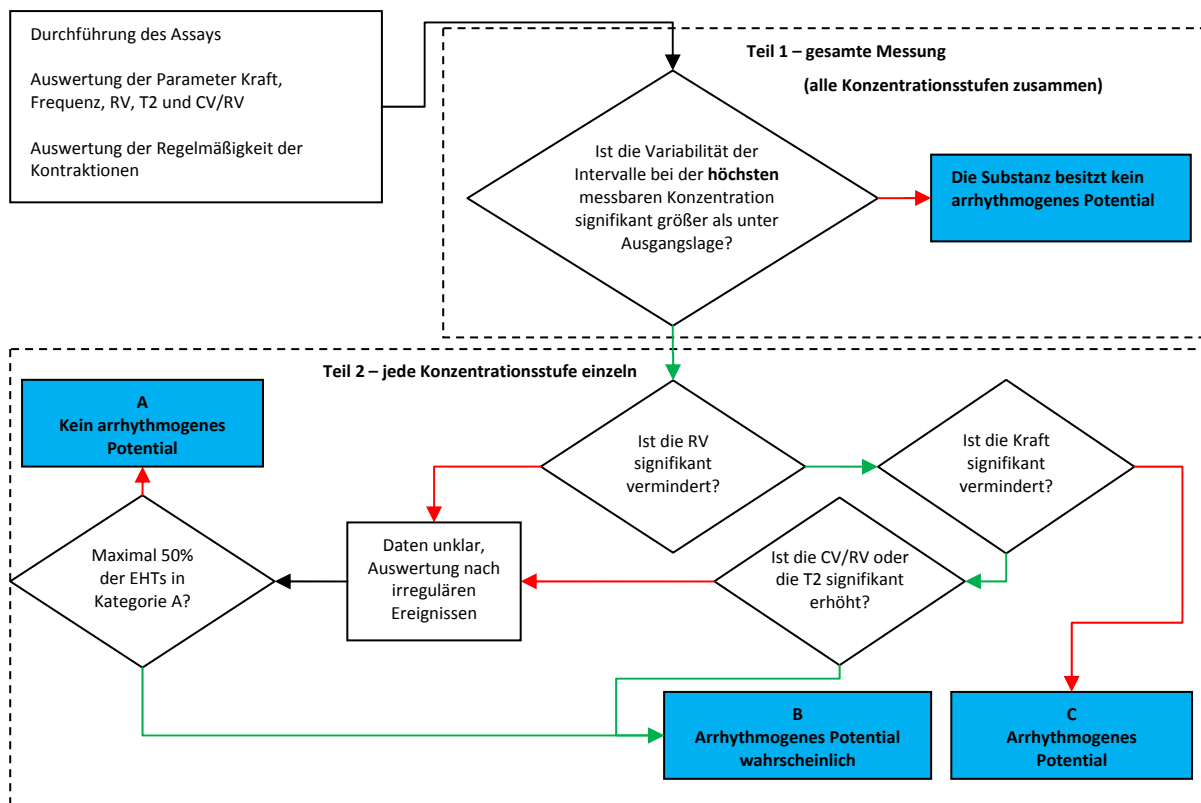


Abbildung 57: Erkenntnisse der Auswertung der elf getesteten Substanzen als Flussdiagramm, anhand dessen zukünftige Ergebnisse beurteilt werden könnten, roter Pfeil bedeutet NEIN, grüner Pfeil bedeutet JA, blau unterlegte Felder sind Endpunkte.

Die Erkenntnisse und Ergebnisse der verschiedenen Bewertungen sind in Abbildung 57 als Flussdiagramm dargestellt. Diese Art der Auswertung ist als vorläufig anzusehen, da sie sich sehr stark an den Ergebnissen der elf Substanzen orientiert und daher auf diese zugeschnitten ist. Mit der Untersuchung von weiteren Substanzen kann die Methode verfeinert werden, so dass am Ende ein Assay mit klar definierten Regeln und Endpunkten stehen kann.

In Teil 1 des Diagramms werden Substanzen als nicht arrhythmogen eingestuft, welche bei der gesamten Messung, also auch in hohen Konzentrationen, nicht zu einer Vergrößerung der Kontraktionsintervalle führen. Teil 2 wird dann für jede Konzentrationsstufe einzeln durchlaufen, es gibt drei verschiedene Endpunkte: A - „Kein arrhythmogenes Potential“, B - „Arrhythmogenes Potential wahrscheinlich“ und C - „Arrhythmogenes Potential“. Die Auswertung nach unregelmäßigen Ereignissen nimmt eine Position als Ersatzmethode ein, falls die Auswertung der Parameter RV, CV/RV und T2 nicht zu eindeutigen Ergebnissen

Substanz	Konzentration					
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Chinidin	A	A	A	C	B	
Sertindol	A	A	C	C	B	B
Cisaprid	A	A	A	A	B	B
Procainamid	A	A	A	A	C	B
E-4031	A	A	C	B	B	
Thioridazin	A	A	A	A	C	B
Dofetilid	A	A	C	C	B	B
Ibutilid	A	A	C	C	B	
Ampicillin	-					
Verapamil	-					
Amiodaron*	A	A	A	A	A	

Tabelle 12 Übersicht über die Auswertung per Flussdiagramm, die gestrichelte Linie (!) gibt den Bereich der $IC_{50}(hERG)$ wieder, bei zwei gestrichelten Linien sind die $IC_{50}(hERG)$ und die Konzentration gleich, *bei Amiodaron sind die Ergebnisse der Zeitpunkte angegeben.

führt. Ähnlich verhält es sich mit der Auswertung von CV/RV und T2. Werden die elf Substanzen nach diesem Flussdiagramm bewertet, so ergibt sich folgendes Bild: Ampicillin und Verapamil werden bereits in Teil 1 als nicht arrhythmogen eingestuft, Amiodaron führt bei allen Zeitpunkten zu Ergebnis A, kann also nach der sekundären Auswertung als nicht arrhythmogen eingeordnet werden. Alle anderen Substanzen, mit der Ausnahme von Cisaprid,

führen bei mindestens einer Konzentration zu Ergebnis C. Die Auswertung von Cisaprid führt maximal zu Ergebnis B. Eine Übersicht ist in Tabelle 12 dargestellt.

4.11 Ausblick

Das Protokoll zur kardialen Differenzierung wird sich in Zukunft sicherlich noch verändern, da die Entwicklung auf diesem Gebiet weitergeht. Die Tatsache, dass die verschiedenen Arbeitsgruppen, welche weltweit an kardialer Differenzierung arbeiten, auf unterschiedliche Protokolle setzen (Tabelle 3), deutet darauf hin, dass das optimale Protokoll zur kardialen Differenzierung noch nicht gefunden wurde. In der letzten Zeit wurden einige weitere interessante Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht, deren Ergebnisse in das zurzeit verwendete Protokoll noch einfließen können (Kattman et al. 2011; Burrige et al. 2011). So kann die Differenzierung in Zukunft eventuell effizienter und günstiger gestaltet werden. Vor allem die Substitution vom Wachstumsfaktor DKK-1 brächte einen großen Vorteil, da dieses Protein allein über die Hälfte der Materialkosten der Differenzierung ausmacht. So könnte die Anzahl der verfügbaren humanen Kardiomyozyten erhöht werden, und damit die Anzahl an humanen EHTs, die für die Messung von Substanzen einsetzbar ist. Es sollte ein Ziel sein, jede Substanz mit mehr biologischen Replikaten als bisher zu untersuchen. Einige der Substanzen in dieser Arbeit wurden bereits an acht oder mehr Replikaten untersucht, dies sollte der Standard werden.

Um die Methode selbst weiter zu entwickeln, bzw. um ihre prädiktiven Aussagen zu testen, könnten verblindete Versuche mit bekannten Substanzen durchgeführt werden. Auf diese Weise könnten die prädiktiven Qualitäten dieses Assays getestet und bestätigt werden. In der Veröffentlichung, an der sich bisher orientiert wurde (Redfern et al. 2003), sind noch zahlreiche Substanzen mit proarrhythmischem Potential charakterisiert, welche für solche Experimente genutzt werden können. Viele der bisher untersuchten Substanzen sind sehr unspezifisch und interagieren mit vielen verschiedenen pharmakologischen Zielen. Um herauszufinden, ob Interaktionen abseits von hERG-Kanal und Calcium-Kanälen einen Einfluss auf das Schlagverhalten hat, sollten zusätzlich solche Substanzen untersucht werden, die zwar sehr unspezifisch sind, aber nicht dafür bekannt sind, *in vivo* Herzrhythmusstörungen auszulösen, beziehungsweise keine Affinität zum hERG-Kanal besitzen.

Die Tatsache, dass humane künstliche Herzgewebe hergestellt werden können, eröffnet aber auch ganz andere Möglichkeiten, abseits der Untersuchung von arrhythmogenen Substanzen. Zum Beispiel sollte es in Zukunft möglich sein, die erstellten Protokolle auf induziert-pluripotente Stammzellen (iPS) zu übertragen. IPS können von Menschen gewonnen werden, die an Erkrankungen durch genetische Veränderungen leiden, wie zum Beispiel dem hereditären LQT Syndrom oder der familiären hypertrophen Kardiomyopathie (FHC). So könnten die Auswirkungen dieser Mutationen am humanen künstlichen Herzgewebe untersucht werden, die Krankheit besser verstanden und eventuell neue Therapien entwickelt werden. Erste Experimente zur kardialen Differenzierung von induziert-pluripotenten Stammzellen wurden bereits erfolgreich durchgeführt. Weitere Möglichkeiten bietet die Transduktion der differenzierten Kardiomyozyten mit viralen Vektoren. Dies stellt ein simples Verfahren dar, um Zellen genetisch zu modifizieren. Die Expression von Genen kann ausgeschaltet werden (*knock out, knock down*) oder Gene können überexprimiert werden, bzw. überhaupt exprimiert werden (*knock in*). So kann der Einfluss von bestimmten Proteinen auf das Schlagverhalten der EHTs untersucht werden. Die virale Transduktion ist eine gängige und vielerprobte Methode, sie konnte bisher aber nicht auf humane Kardiomyozyten angewendet werden, da diese Zellen schwer verfügbar sind und als Primärzellen nur kurze Zeit *in vitro* überleben. Außerdem war es bisher nur schwer möglich,

Untersuchungen an humanem kardialem Muskelgewebe durchzuführen. Das Modell des EHT eignet sich prinzipiell sehr gut für die virale Transduktion, an EHTs aus Zellen der Ratte wurde dies schon vielfach durchgeführt. Die Viren werden in der gewünschten MOI einfach bei der Herstellung der Zellsuspension dazu gegeben.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, künstliche Herzgewebe (EHT) aus humanen Kardiomyozyten herzustellen und zu untersuchen, ob diese als System verwendet werden können, um Substanzen auf ihr proarrhythmisches Potential zu testen. Effekte einer Repolarisationshemmung durch hERG-Kanal-blockierende Substanzen standen dabei im Mittelpunkt des Interesses, da dies der Mechanismus von häufigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen ist, die mitunter zu ventrikulären Tachykardien vom Torsades de pointe Typ führen kann. Das proarrhythmische Potential neuer Substanzen ist in den bisher zur Verfügung stehenden Tests nur unvollständig einzuschätzen und weil Torsades de pointe Arrhythmien zwar gravierend, aber sehr selten sind, wurde diese kardiotoxische unerwünschte Arzneimittelwirkung in der Vergangenheit bei einigen Substanzen erst in der späten klinischen Anwendung offengelegt. Die nach Todesfällen notwendige Marktrücknahme (z. B. Cisaprid, Terfenadin, Sparfloxacin, etc.) ist daher bis heute ein großes Problem in der Arzneimittelentwicklung. Bessere präklinische Testsysteme, vor allem solche, die auf humanen Kardiomyozyten basieren, könnten hier Abhilfe schaffen.

Zur Umsetzung dieses Ziels wurden als Zellquelle humane embryonale Stammzellen *in vitro* expandiert. Es wurden Protokolle etabliert und modifiziert, um aus diesen Zellen Embryoidkörperchen herzustellen und diese in Kardiomyozyten zu differenzieren. Das Differenzierungsprotokoll basierte auf drei Stufen, in denen jeweils unterschiedliche Kombinationen der Wachstumsfaktoren Activin A, BMP-4, FGF-2, DKK-1 und VEGF in genauer zeitlicher Abfolge zur kardialen Differenzierung führten. Es wurde eine Effizienz von über 40% α -Aktinin-positiven Zellen in der differenzierten Zellpopulation erreicht, und es konnten pro Ansatz 1 bis 2×10^6 differenzierte Zellen gewonnen werden, was im internationalen Vergleich sehr viel ist. Analysiert wurde die Differenzierung durch quantitative PCR von Genen, die in bestimmten Phasen der kardialen Entwicklung exprimiert werden. Aufgrund der hohen Ausbeute konnten aus dieser Zellpopulation ohne vorausgehende Selektion künstliche Herzgewebe hergestellt werden. Dabei wurde eine Methode verwendet, welche im Institut entwickelt worden ist und unter Verwendung von Fibrin und Silikonhaltern zur Ausbildung streifenförmiger Herzgewebe führt. Deren spontane Kontraktilität konnte in einer selbstentwickelten, video-optischen Messanlage automatisiert

untersucht werden. Per Figurerkennung wurde die Kontraktion der EHTs gemessen und in Kraft umgerechnet. Aus den Rohdaten der Kraft über der Zeit wurden die Parameter Frequenz, Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit und –zeit errechnet, welche die Kontraktilität der EHTs genau beschrieben. Die bekannten proarrhythmischen Substanzen Chinidin, Sertindol, Cisaprid, Procainamid, E-4031, Thioridazin, Dofetilid, und Ibutilid führten konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Relaxationsgeschwindigkeit und Veränderung der Regelmäßigkeit der Kontraktionen. Die Schwellenkonzentrationen für diese beiden Parameter lagen bei allen Substanzen im Bereich der im hERG-Assay ermittelten IC_{50} Werte, wobei die Veränderung der Regelmäßigkeit sich als etwas weniger empfindlich herausstellte als die Verminderung der Relaxationsgeschwindigkeit.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass sich humane EHTs zur Testung des proarrhythmischen Potentials von Substanzen prinzipiell eignen. In Zukunft könnte so die Palette der präklinischen Untersuchungen zur kardialen Toxikologie erweitert, Substanzen vor der Markteinführung besser charakterisiert und die Tierversuch-intensiven Untersuchungsmethoden reduziert werden.

6 Summary

The aim of this study was to create engineered heart tissue from a human cardiomyocytes and to investigate the feasibility of testing substances on proarrhythmic properties with this system. Effects due to repolarisation block caused by blocking of hERG-channels (human ether-a-go-go related gene) were the main focus, since it is a common adverse drug reaction that can lead to ventricular tachycardias of the torsades de pointe type. Since the proarrhythmic potential of new Substances cannot be completely fathomed with the preclinical tests available, in addition torsades de pointe arrhythmias are a rare event, this cardiotoxic side effect has only been recognised in clinical use in several substances in the past decade. The necessary withdrawal from the market after deaths caused by these substances (e.g. cisapride, terfenadine, sparfloxacin, etc.) still represents a main problem in drug development. Improved preclinical test-panels, especially those based on human cardiomyocytes, might contribute to a solution.

Human embryonic stem cells were expanded *in vitro* and protocols for the generation of embryoid bodies and for highly efficient cardiac differentiation were established and modified. The protocol for differentiation was based on three strictly timed stages, each containing a specific combination of growth factors like Activin A, BMP-4, FGF-2, DKK-1 and VEGF. An efficiency of more than 40% of α -actinin-positive cells in the differentiated population was reached, and 1 to 2 x 10⁶ cells per run were obtained, which are high numbers in international comparison. Q-PCR analysis of gene-expression of specific markers during development of cardiomyocytes served as a control of differentiation. Due to the high yield of cardiomyocytes, engineered heart tissue could be generated from this population without further selection. Using a method, which was developed in the institute and is based on fibrin and silicon-posts, strip format EHTs were generated. Their spontaneous contractile activity could be video-optically measured in a custom built device in an automated manner. Using figure recognition, the contractions were measured and translated into force. Furthermore, the parameters frequency and both time and velocity of contraction and relaxation were calculated from this data, in order to precisely describe the contractility. The known proarrhythmic drugs quinidine, sotalolol, cisapride, procainamide, E-4031, thioridazine, dofetilid and ibutilid lead to a concentration dependant decrease in relaxation

velocity and regularity of contractions. For all substances tested, relevant concentrations were in the range of IC_{50} values found in hERG-channel assays. Furthermore, in all substances concentrations which lead to a reduction in velocity of relaxation were lower than concentrations, which influenced the beating pattern.

This shows that human EHTs are able to test substances on their proarrhythmic potential. In future drug development this system might be added to the test panel of preclinical cardiotoxicity screens, better characterizing substances before release on the market and reducing animal experiments.

7 Literatur

- Behfar, A., Perez-Terzic, C., Faustino, R.S., Arrell, D.K., Hodgson, D.M., Yamada, S., Puceat, M., Niederländer, N., Alekseev, A.E., Zingman, L.V. & Terzic, A., 2007. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *The Journal of experimental medicine*, 204(2), pp.405-20.
- Bhavsar, P.K., Dhoot, G.K., Cumming, D.V., Butler-Browne, G.S., Yacoub, M.H. & Barton, P.J., 1991. Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart. *FEBS letters*, 292(1-2), pp.5-8.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R. & Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), pp.947-56.
- Braam, S.R., Tertoolen, L., Stolpe, A. van de, Meyer, T., Passier, R. & Mummery, C.L., 2010. Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem cell research*, 4(2), pp.107-16.
- Brattelid, T., Kvingedal, A.M., Krobert, K. a, Andressen, K.W., Bach, T., Hystad, M.E., Kaumann, A.J. & Levy, F.O., 2004. Cloning, pharmacological characterisation and tissue distribution of a novel 5-HT4 receptor splice variant, 5-HT4(i). *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 369(6), pp.616-28.
- BurrIDGE, P.W., Thompson, S., Millrod, M. a, Weinberg, S., Yuan, X., Peters, A., Mahairaki, V., Koliatsos, V.E., Tung, L. & Zambidis, E.T., 2011. A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability. M. Pera, ed. *PloS one*, 6(4), p.e18293.
- Cao, F., Wagner, R.A., Wilson, K.D., Xie, X., Fu, J.-D., Drukker, M., Lee, A., Li, R.A., Gambhir, S.S., Weissman, I.L., Robbins, R.C. & Wu, J.C., 2008. Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. M. Csete, ed. *PloS one*, 3(10), p.e3474.
- Carpenter, M.K., Rosler, E. & Rao, M.S., 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning and stem cells*, 5(1), pp.79-88.
- Caspi, O., Itzhaki, I., Kehat, I., Gepstein, A., Arbel, G., Huber, I., Satin, J. & Gepstein, L., 2009. In vitro electrophysiological drug testing using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem cells and development*, 18(1), pp.161-72.
- Caspi, O., Lesman, A., Basevitch, Y. & Gepstein, A., 2007. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circulation*, 100(2), pp.263-72.
- Chambers, I. & Tomlinson, S.R., 2009. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development (Cambridge, England)*, 136(14), pp.2311-22.

- Drolet, B., Vincent, F., Rail, J., Chahine, M., Deschênes, D., Nadeau, S., Khalifa, M., Hamelin, B. a & Turgeon, J., 1999. Thioridazine lengthens repolarization of cardiac ventricular myocytes by blocking the delayed rectifier potassium current. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 288(3), pp.1261-8.
- Eschenhagen, T., Fink, C., Remmers, U., Scholz, H., Wattchow, J., Weil, J., Zimmermann, W.-H., Dohmen, H.H., Schäfer, H., Bishopric, N., Wakatsuki, T. & Elson, E.L., 1997. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *The FASEB journal*, 11(8), pp.683-94.
- Evans, M. J. & Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), pp.154-6.
- Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H. & Bergman, Y., 2006. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nature cell biology*, 8(2), pp.188-94.
- Gan, Q., Tadashi Yoshida, Oliver G. McDonald & Gary K. Owens, 2007. Concise Review: Epigenetic Mechanisms Contribute to Pluripotency and Cell Lineage Determination of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 25(1), pp.2-9.
- Golob, J.L., Paige, S.L., Muskheli, V., Pabon, L. & Murry, C.E., 2008. Chromatin remodeling during mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Developmental dynamics* □: an official publication of the American Association of Anatomists, 237(5), pp.1389-98.
- Greber, B., Lehrach, H. & Adjaye, J., 2007. Silencing of core transcription factors in human EC cells highlights the importance of autocrine FGF signaling for self-renewal. *BMC developmental biology*, 7, p.46.
- Hansen, A., Eder, A., Bönstrup, M., Flato, M., Mewe, M., Schaaf, S., Aksehirlioglu, B., Schwörer, A., Uebeler, J. & Eschenhagen, T., 2010. Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. *Circulation research*, 107(1), pp.35-44.
- He, J.-Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J.A. & Kamp, T.J., 2003. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circulation Research*, 93(1), pp.32-9.
- Irion, S., Luche, H., Gadue, P., Fehling, H.J., Kennedy, M. & Keller, G.M., 2007. Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(12), pp.1477-82.
- Ishizaki, T., Uehata, M., Tamechika, I., Keel, J., Nonomura, K., Maekawa, M. & Narumiya, S., 2000. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Molecular pharmacology*, 57(5), pp.976-83.
- Jaenisch, R. & Young, R., 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132(4), pp.567-82.

- James, D., Levine, A.J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A., 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)*, 132(6), pp.1273-82.
- Justo, D., Prokhorov, V., Heller, K. & Zeltser, D., 2005. Torsade de pointes induced by psychotropic drugs and the prevalence of its risk factors. *Acta psychiatrica Scandinavica*, 111(3), pp.171-6.
- Kattman, S.J., Adler, E.D. & Keller, G.M., 2007. Specification of Multipotential Cardiovascular Progenitor Cells During Embryonic Stem Cell Differentiation and Embryonic Development. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 17(7), pp.240-246.
- Kattman, S.J., Huber, T.L. & Keller, G.M., 2006. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Developmental Cell*, 11(5), pp.723-32.
- Kattman, S.J., Witty, A.D., Gagliardi, M., Dubois, N.C., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J. & Keller, G.M., 2011. Stage-Specific Optimization of Activin/Nodal and BMP Signaling Promotes Cardiac Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Cell stem cell*, 8(2), pp.228-40.
- Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L., 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*, 108(3), pp.407-14.
- Keller, G.M., 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Current opinion in cell biology*, 7(6), pp.862-9.
- Klug, M.G., Soonpaa, M H, Koh, G.Y. & Field, L J, 1996. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *The Journal of clinical investigation*, 98(1), pp.216-24.
- Koestenbauer, S., Zech, N.H., Juch, H., Vanderzwalmen, P., Schoonjans, L. & Dohr, G., 2006. Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. □: 1989)*, 55(3), pp.169-80.
- Krüger, M., Kohl, T. & Linke, W. a, 2006. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 291(2), pp.H496-506.
- Laake, L.W. van, Passier, R., Monshouwer-Kloots, J., Verkleij, A.J., Lips, D.J., Freund, C., Ouden, K. den, Ward-van Oostwaard, D., Korving, J., Tertoolen, L.G., Echteld, C.J. van, Doevendans, P.A. & Mummery, C.L., 2007. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem cell research*, 1(1), pp.9-24.

- Laflamme, M.A., Chen, K. & Naumova, A.V., 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature*, 25(9), pp.1015-24.
- Lanner, F. & Rossant, Janet, 2010. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development (Cambridge, England)*, 137(20), pp.3351-60.
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsigos, A., Ong, C.T., Low, H.M., Kin Sung, K.W., Rigoutsos, I., Loring, J. & Wei, C.-L., 2010. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Research*, 20(3), pp.320-331.
- Liang, H., Matzkies, M., Schunkert, H., Tang, M., Bonnemeier, H., Hescheler, J. & Reppel, M., 2010. Human and murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes serve together as a valuable model for drug safety screening. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 25(4-5), pp.459-66.
- Lompre, A.M., Mercadier, J.J., Wisnewsky, C., Bouveret, P., Pantaloni, C., D'Albis, A. & Schwartz, K., 1981. Species- and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Developmental biology*, 84(2), pp.286-90.
- Lompré, A.M., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V., 1984. Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *The Journal of biological chemistry*, 259(10), pp.6437-46.
- Martin, G.R. & Evans, M J, 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(4), pp.1441-5.
- Mirams, G.R., Cui, Y., Sher, A., Fink, M., Cooper, J., Heath, B.M., McMahon, N.C., Gavaghan, D.J. & Noble, D., 2011. Simulation of multiple ion channel block provides improved early prediction of compounds' clinical torsadogenic risk. *Cardiovascular research*, 91(1), pp.53-61.
- Molokhia, M., Pathak, A., Lapeyre-Mestre, M., Caturla, L., Montastruc, J.L. & McKeigue, P., 2008. Case ascertainment and estimated incidence of drug-induced long-QT syndrome: study in Southwest France. *British journal of clinical pharmacology*, 66(3), pp.386-95.
- Mummery, C.L., Ward-van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., Den Brink, S. van, Hassink, R., Der Heyden, M. van, Opthof, T., Pera, M., La Riviere, A.B. de, Passier, R. & Tertoolen, L., 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*, 107(21), pp.2733-40.
- Murry, C.E. & Keller, G.M., 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 132(4), pp.661-80.
- Möllmann, H., Nef, H. & Hamm, C.W., 2010. Stammzellen beim Myokardinfarkt. *Der Kardiologe*, 4(1), pp.13-22.

- Nagy, A., Gócza, E., Diaz, E.M., Prideaux, V.R., Iványi, E., Markkula, M. & Rossant, J, 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 110(3), pp.815-21.
- Naito, H., Melnychenko, I., Didié, M., Schneiderbanger, Karin, Schubert, Pia, Rosenkranz, S., Eschenhagen, T. & Zimmermann, W.-H., 2006. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation*, 114(1 Suppl), pp.172-8.
- Nerbonne, J.M., Nichols, C.G., Schwarz, T.L. & Escande, D., 2001. Genetic manipulation of cardiac K(+) channel function in mice: what have we learned, and where do we go from here? *Circulation research*, 89(11), pp.944-56.
- Ng, H.-H. & Surani, M.A., 2011. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nature Cell Biology*, 13(5), pp.490-496.
- Pacher, P. & Kecskemeti, V., 2004. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? *Current pharmaceutical design*, 10(20), pp.2463-75.
- Pekkanen-Mattila, M., Chapman, H., Kerkelä, E., Suuronen, R., Skottman, H., Koivisto, A.-P. & Aalto-Setälä, K., 2010. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: demonstration of a portion of cardiac cells with fairly mature electrical phenotype. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 235(4), pp.522-30.
- Rampe, D., Murawsky, M.K., Grau, J. & Lewis, E.W., 1998. The antipsychotic agent sertindole is a high affinity antagonist of the human cardiac potassium channel HERG. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 286(2), pp.788-93.
- Redfern, W.S., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P.K.S., Strang, I., Sullivan, A.T., Wallis, R., Camm, A.J. & Hammond, T.G., 2003. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovascular research*, 58(1), pp.32-45.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. & Bongso, A., 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*, 18(4), pp.399-404.
- Ridley, J.M., Milnes, J.T., Benest, A.V., Masters, J.D., Witchel, H.J. & Hancox, J.C., 2003. Characterisation of recombinant HERG K⁺ channel blockade by the Class Ia antiarrhythmic drug procainamide. *Biochemical and biophysical research communications*, 306(2), pp.388-93.
- Roden, D.M., 2004. Drug-induced prolongation of the QT interval. *The New England journal of medicine*, 350(10), pp.1013-22.

- Roden, D.M., 2008. Long-QT syndrome. *The New England journal of medicine*, 358(2), pp.169-76.
- Royer, A., Demolombe, S., El Harchi, A., Quang, K. Le, Piron, J., Toumaniantz, G., Mazurais, D., Bellocq, C., Lande, G., Terrenoire, C., Motoike, H.K., Chevallier, J.-C., Lousouarn, G., Clancy, C.E., et al., 2005. Expression of human ERG K⁺ channels in the mouse heart exerts anti-arrhythmic activity. *Cardiovascular research*, 65(1), pp.128-37.
- Shapira-Schweitzer, K., Habib, M., Gepstein, L. & Seliktar, D., 2009. A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(2), pp.213-24.
- Sheldon, R.S., Cannon, N.J. & Duff, H.J., 1987. A receptor for type I antiarrhythmic drugs associated with rat cardiac sodium channels. *Circulation research*, 61(4), pp.492-7.
- Taniyama, K., Nakayama, S., Takeda, K., Matsuyama, S., Shirakawa, J., Sano, I. & Tanaka, C., 1991. Cisapride stimulates motility of the intestine via the 5-hydroxytryptamine receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 258(3), pp.1098-104.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. & Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), pp.1145-7.
- Tie, H., Walker, B.D., Valenzuela, S.M., Breit, S.N. & Campbell, T.J., 2000. The heart of psychotropic drug therapy. *Lancet*, 355(9217), p.1825.
- Toga, T., Kohmura, Y. & Kawatsu, R., 2007. The 5-HT₄ Agonists Cisapride, Mosapride, and CJ-033466, a Novel Potent Compound, Exhibit Different Human Ether-a-go-go-Related Gene (hERG)-Blocking Activities. *Journal of Pharmacological Sciences*, 105(2), pp.207-210.
- Tulloch, N.L., Muskheli, V., Razumova, M.V., Korte, F.S., Regnier, M., Hauch, K.D., Pabon, L., Reinecke, H. & Murry, C.E., 2011. Growth of Engineered Human Myocardium With Mechanical Loading and Vascular Coculture. *Circulation research*.
- Ungrin, M.D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C. & Zandstra, P.W., 2008. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS one*, 3(2), p.e1565.
- Vandenburgh, H., Shansky, J., Benesch-Lee, F., Barbata, V., Reid, J., Thorrez, L., Valentini, R. & Crawford, G., 2008. Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle. *Muscle & nerve*, 37(4), pp.438-47.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S.-ichi, Muguruma, K. & Sasai, Y., 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(6), pp.681-6.

- Wong, S.L., Cao, G., Mack, R.J. & Granneman, G.R., 1997. Pharmacokinetics of sertindole in healthy young and elderly male and female subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 62(2), pp.157-64.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D. & Carpenter, M.K., 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), pp.971-4.
- Xu, X.Q., Graichen, R.E., Soo, S.Y., Balakrishnan, T., Bte Rahmat, S.N., Sieh, S., Tham, S.C., Freund, C., Moore, J., Mummery, C.L., Colman, A., Zweigerdt, R. & Davidson, B.P., 2008. Chemically defined medium supporting cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Differentiation; Research in Biological Diversity*.
- Yang, L., Soonpaa, Mark H, Adler, E.D., Roepke, T.K., Kattman, S.J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G.W., Linden, R.M., Field, Loren J & Keller, G.M., 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 453(7194), pp.524-8.
- Zhou, Z., Gong, Q., Ye, B., Fan, Z., Makielski, J.C., Robertson, G.A. & January, C.T., 1998. Properties of HERG channels stably expressed in HEK 293 cells studied at physiological temperature. *Biophysical journal*, 74(1), pp.230-41.
- Zimmermann, W.-H. & Eschenhagen, T., 2007. Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering. *Trends in cardiovascular medicine*, 17(4), pp.134-40.
- Zimmermann, W.-H., Didié, M., Wasmeier, G.H., Nixdorff, U., Hess, A., Melnychenko, I., Boy, O., Neuhuber, Winfried L, Weyand, M. & Eschenhagen, T., 2002. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation*, 106(12 Suppl 1), pp.1151-7.
- Zimmermann, W.-H., Melnychenko, I. & Eschenhagen, T., 2004. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials*, 25(9), pp.1639-47.
- Zimmermann, W.-H., 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. *Nature medicine*, 12(4), pp.452-8.
- Zimmermann, W.-H., Schneiderbanger, K, Schubert, P, Didié, M., Münzel, F., Heubach, J.F., Kostin, S., Neuhuber, W L & Eschenhagen, T., 2002. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circulation research*, 90(2), pp.223-30.
- Zwi, L., Caspi, O., Arbel, G., Huber, I., Gepstein, A., Park, I.-H. & Gepstein, L., 2009. Cardiomyocyte Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation*, 120(15), pp.1513-1523.

8 Anlage

8.1 Abkürzungen

	Englisch	Deutsch
AP	Actionpotential	Aktionspotential
APA	Action potential amplitude	Aktionspotentialamplitude
APD	Action potential duration	Aktionspotentialdauer
ATP2A2	Serca	Serca
BMP4	Bone morphogenic protein 4	
BPM	Beats per minute	Schläge pro Minute
CT	Cycle threshold (qPCR)	Zyklus-Schwellenwert (qPCR)
CV	Contraction velocity	Kontraktionsgeschwindigkeit
d	Day	Tag
DMSO		Dimethylsulfoxid
EAD	Early after depolarisation	Frühe Nachdepolarisation
EB	Embryoid Body	Embryoidkörperchen
EDTA		Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	Engineered Heart Tissue	Künstliches Herzgewebe
EKG		Elektrokardiogramm
EMA	European medicines agency	(Die europäische Arzneimittelbehörde)
EPC	Endothelial progenitor cells	Endotheliale Vorläuferzellen
F	Force	Kraft
FACS	Fluorescence activated cell sorting	
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration	(Die amerikanische Behörde für Arzneimittel)
FGF2	Fibroblast growth factor 2 (basic)	
FHC	Familial hypertrophic cardiomyopathy	Familiäre hypertrophe Kardiomyopathie
GUSB	Glucuronidase beta	
HE		Hämatoxylin und Eosin
HEK293	Human embryonic kidney	Humane embryonale Nierenzellen (Zelllinie)
HEPES		4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HERG	Human ether-a-go-go related gene	
hESC	Human embryonic stem cells	Humane embryonale Stammzelle
IC₅₀		Mittlere inhibitorische Konzentration
IGF	Insulin like growthfactor	
I_{Kr}	Inward delayed rectifier, rapid	Kaliumaustrom, schnell
I_{Ks}	Inward delayed rectifier, slow	Kaliumaustrom, langsam
IPS	Induced-pluripotent stem cells	Induziert-pluripotente Stammzellen
ISL1	Islet-1	
KDR	Kinase domain inert receptor	VEGF-Rezeptor
KWK		Konzentrations-Wirkungs-Kurve
LIF	Leukemia inhibitory factor	
LQT	Long-QT syndrome	Long-QT Syndrom
MDP	Maximum diastolic potenial	Maximales diastolisches Potential
MEA	Multielectrode array	
MEF	Mouse embryonic fibroblast	Murine embryonale Fibroblasten

	Englisch	Deutsch
MESP1	Mesoderm posterior 1 homolog	
MOI	Multiplicity of infection	
MYH6	Myosin heavy chain, alpha	Myosin, schwere Kette, alpha
MYH7	Myosin heavy chain, beta	Myosin, schwere Kette, beta
NANOG	Nanog	
PBS	Phosphate buffered saline	Gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor	
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor	PDGF-Rezeptor
POU5F1	POU class 5 homeobox 1, Oct-4	
PS	Primitive Streak	Primitivstreifen
qPCR		Quantitative Real-Time PCR
RPM	Revolutions per minute	Umdrehungen pro Minute
RV	Relaxation velocity	Relaxationsgeschwindigkeit
SLC8A1	NCX (sodium calcium exchanger)	Natrium-Calcium-Austauscher
T	Brachyury homolog	
T1		Kontraktionszeit
T2		Relaxationszeit
TdP		Torsades de pointe
TGF-β	Transforming growth factor	
TNNI1	slow skeletal troponin I	Skeletales Troponin I
TNNI3	cardiac troponin I	Kardiales Troponin I
TNNT2	cardiac troponin T	Kardiales Troponin T
ULA	Ultra low attachment	Ultra-niedrige Zelladhäsion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	

8.2 Zusätzliche Informationen

8.2.1 Rohdaten zur Messung von E-4031

Die Rohdaten, also die Kontraktionsdiagramme, der Messung von E-4031 sind in Abbildung 58 gezeigt. Es wurden vier EHTs gemessen, in insgesamt fünf unterschiedlichen Konzentrationen.

8.2.2 Messung der kontraktiven Calcium-Antwort bei vorgegebener Frequenz

Der Einfluss von unterschiedlichen extrazellulären Calciumkonzentrationen ohne elektrische Stimulation ist in Kapitel 3.13.2 beschrieben. Der Einfluss von Calcium bei vorgegebener Frequenz ist in Abbildung 59 dargestellt. Aufgrund des komplizierten Versuchsaufbaus und der nicht gegebenen Sterilität wurde an nur einem EHT der Einfluss von Calcium unter elektrischer Stimulation exemplarisch gezeigt.

Die stufenweise Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration hatte zwei deutliche Effekte auf das EHT. Zum einen stieg die Kraft bei jeder Zugabe von Calcium deutlich an. Bei 2,2 mM Ca^{2+} entsprach die entwickelte Kraft etwa das Fünffache des Wertes bei 0,2 mM Ca^{2+} und bei niedrigeren Konzentrationen waren die Unterschiede zwischen Stufen deutlich stärker ausgeprägt. Zum anderen konnte eine Zunahme der diastolischen Grundspannung beobachtet werden, deutlich zu erkennen am oberen abfallenden Verlauf des Mechanogramms (Abbildung 59).

8.2.3 Sympathische und Parasympathische Stimulation bei vorgegebener Frequenz

Der Einfluss von sympathischer Stimulation durch den β -Rezeptor-Agonisten Isoprenalin kann unter elektrischer Stimulation und damit vorgegebener Frequenz wesentlich besser gezeigt werden, als ohne Stimulation (siehe Kapitel 3.13.3). Besonders der positiv inotrope Effekt von β -adrenerger Stimulation kann nur unter vorgegebener Frequenz beurteilt werden, da sonst der positiv chronotrope Effekt überwiegt und es zu einer Überlagerung mit der Kraft-Frequenz-Beziehung kommt, die bei EHTs in der Regel negativ ist (sinkende Kraft mit steigender Frequenz, siehe auch Kapitel 3.13.5). Für die parasympathische Stimulation wurde das Acetylcholin-Analogon Carbachol verwendet. Aufgrund des komplizierten Versuchsaufbaus und der nicht gegebenen Sterilität, wurde auch hier nur an einem EHT der Einfluss von Isoprenalin und Carbachol unter elektrischer Stimulation exemplarisch gezeigt.

Der positiv inotrope Effekt von Isoprenalin ist deutlich zu erkennen (Abbildung 60), ebenso wie der negativ inotrope Effekt von Carbachol. Im Gegensatz zu den Daten ohne vorgegebene Frequenz, ist eine Veränderung der Kraft deutlich zu erkennen.

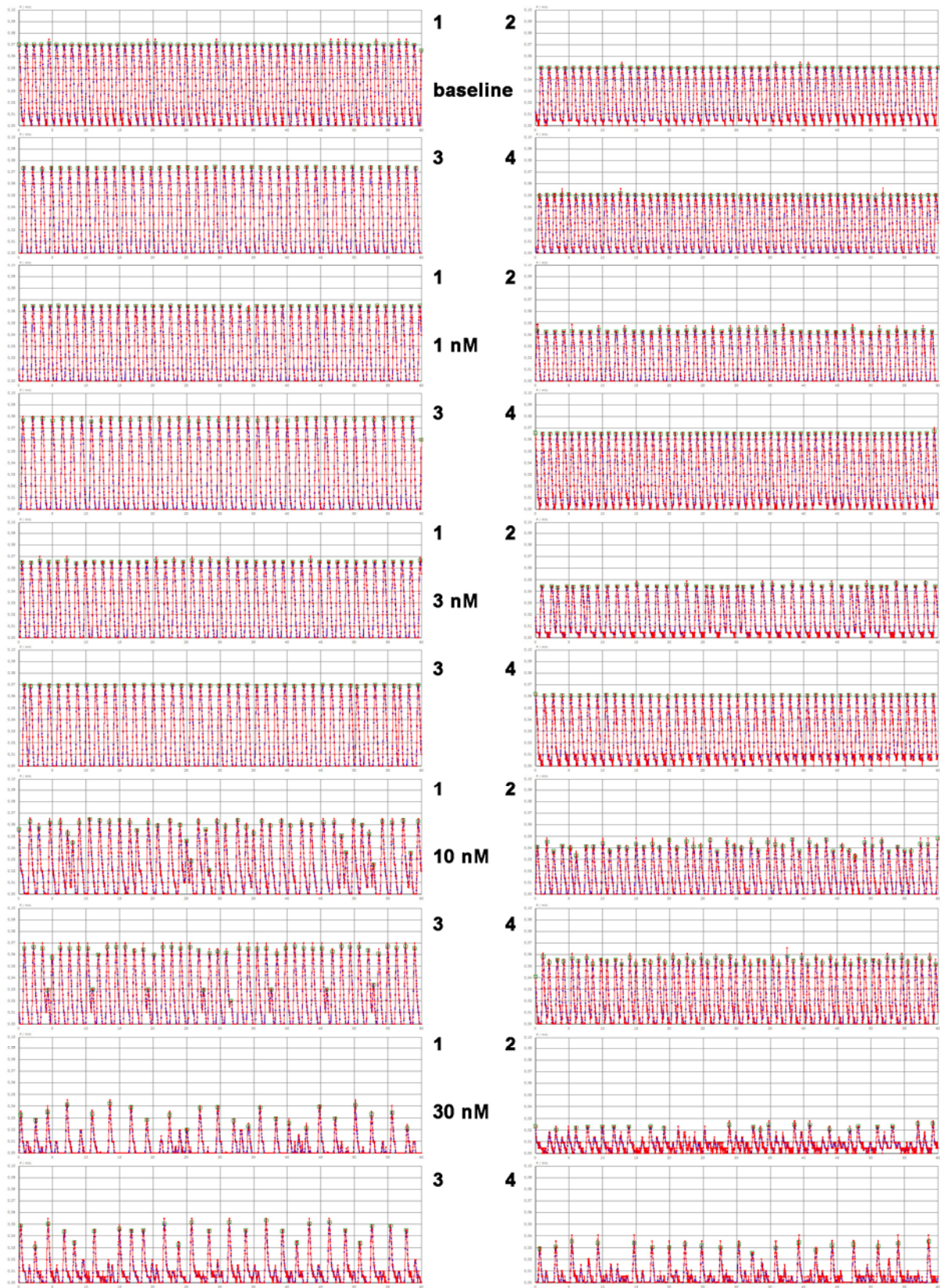


Abbildung 58: Originale Kontraktionsdiagramme von der Messung von E-4031, 1 bis 4 bezeichnet jeweils ein EHT, die grünen Quadrate markieren Kontraktionen, Abszisse: Kraft in mN, Ordinate: Zeit in s.

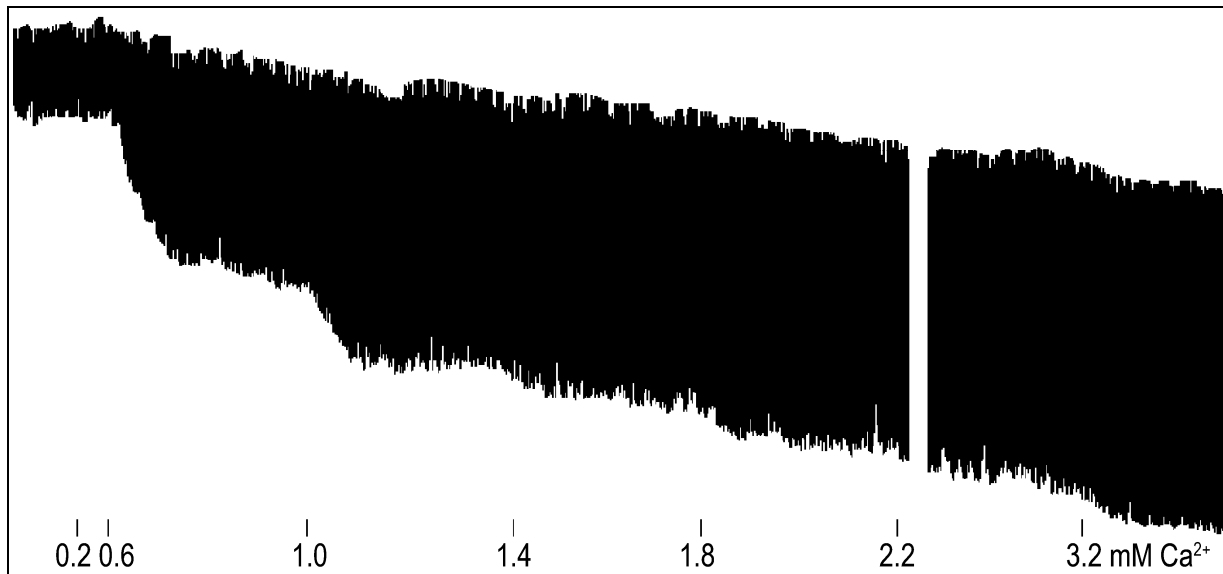


Abbildung 59: Mechanogramm, Einfluss von extrazellulären Calciumkonzentrationen auf die Kraftentwicklung eines EHTs unter elektrischer Stimulation (1,5 Hz), die breite der schwarzen Fläche gibt die Auslenkung der Silikonstäbchen wieder (ohne Einheit).

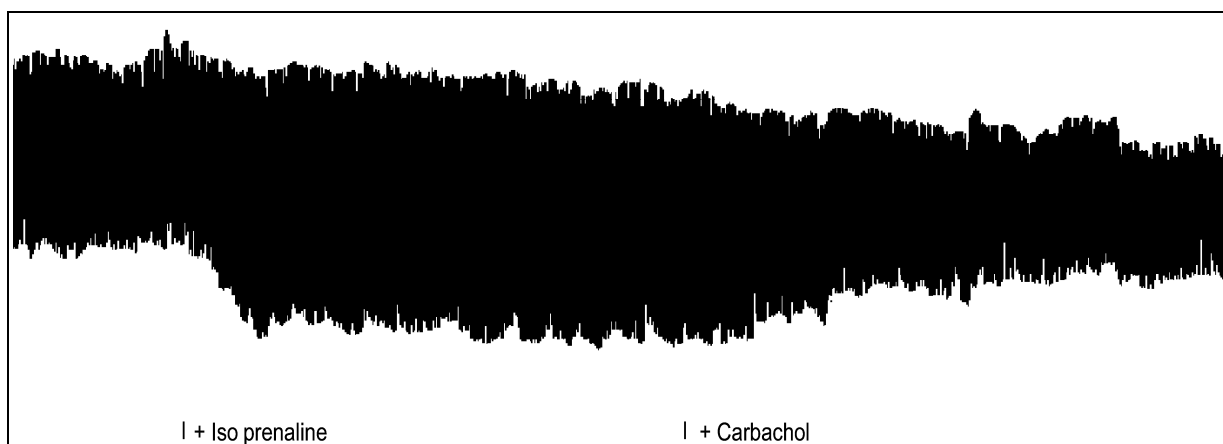


Abbildung 60: MEchanogramm, Einfluss von Isoprenaline (100 nM) und Carbachol (10 µM) auf die Kraftentwicklung einer EHTs unter elektrischer Stimulation (1,5 Hz), die breite der schwarzen Fläche gibt die Auslenkung der Silikonstäbchen wieder (ohne Einheit).

8.3 Material und Methoden

8.3.1 Medien für die Zellkultur

hESC Medium:

- DMEM/F12
- 20% KnockOut Serum Replacement
- 1% L-Glutamin
- 1% NEAA
- 0,5% Penicillin/ Streptomycin
- β -Mercaptoethanol
- 10 ng/ml basic FGF

Differenzierungsmedium (DM):

- KnockOut DMEM
- 20% FCS
- 1% L-Glutamin
- 1% NEAA
- 0,5% Penicillin/ Streptomycin
- β -Mercaptoethanol

RPMI/B27:

- RPMI 1640
- 2% B-27 Supplement
- 10 mM HEPES
- 0,5% Penicillin/ Streptomycin

MEF-Medium:

- DMEM
- 10% FCS
- 1% L-Glutamin
- 1% NEAA
- 1% Penicillin/ Streptomycin

EHT-Medium:

DMEM

10% Pferdeserum

2% Chick Embryo Extract

1% Penicillin/ Streptomycin

10 µg/ml Insulin

400 µM Tranexamsäure

33 µg/ml Aprotinin

Mess-Medium:

DMEM

0,5% Penicillin/ Streptomycin

10 mM HEPES

Mess-Medium (Calcium-frei)

DMEM (ohne Calcium)

0,5% Penicillin/ Streptomycin

10 mM HEPES

Mess-Medium (elektrische Stimulation)

DMEM

0,5% Penicillin/ Streptomycin

10 mM HEPES

100 µM Acetylcystein

8.3.2 Lösungen

Blockierlösung:

TBS 0,05 M (auf pH 7,4 eingestellt)

10% FCS (fetales Kälberserum)

1% BSA (bovines Serum-Albumin)

0,5% Triton X-100

Antikörperlösung:

TBS 0,05 M (auf pH 7,4 eingestellt)

1% BSA (bovines Serum-Albumin)

0,5% Triton X-100

8.3.3 Hilfsmittel und Geräte

Abi Prism 7000HT (Applied Biosystems)	pH-Meter, digital (Mettler Toledo)
Analysenwaage Genius (Sartorius AG)	Pipetten 10/100/1000 µl (Eppendorf, Peqlab)
BD FACSCanto II Flow Cytometer (BD)	Pipettenspitzen (Sarstedt)
Combispin FVL-2400N mit Vortex (PeqLab)	Pipettenspitzen mit Filter Biosphere® (Sarstedt)
Dampfsterilisator Varioklav (Medi-Tech)	Pipettierhilfe accu-jet® pro (Brand)
Digitalwaage Ohaus Precision Advanced (Ohaus)	Positiv-Formen, Teflon (eigene Herstellung)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems 4368814)	Qiagen RNeasy Kit (Qiagen 74104)
Inkubatoren für die Zellkultur (Thermo Fischer)	QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen 28704)
Konfokales Laser Scan Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta)	Reaktionsgefäße konisch 15 ml, 50 ml (Sarstedt)
Mikroskop Axioskop mit Kamera (Zeiss)	Reaktionsgefäße Safe Lock 0,2 bis 2ml (Eppendorf)
Mikroskop Axiovert mit Kamera (Zeiss)	Serologische Pipetten (Sarstedt)
Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fischer)	Sicherheitswerkbank HERAsafe® (Thermo)
Neubauer-Zählkammer (Karl-Hecht KG)	Silikon-Matten (Jäger Gummi und Kunststoff GmbH & Co. KG)
Objektträger mit Zellkulturkammer (Lab-Tek™ Chamber Slide, Nunc)	Sterilfilter Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt)
Objektträger mit Vertiefung (Thermo Scientific / Menzel Gläser)	Thermomixer (Eppendorf)
Objektträger Superfrost/Plus (Hecht-Assistent)	Zellkulturflaschen 25, 75, 175 cm ² (Sarstedt)
Oligonukleotide (MWG)	Zellkulturflaschen mit ultra-niedriger Zelladhäsion, 25 cm ² (T25, Corning 3815) und 75 cm ² (T75, Corning 3814)
PCR-Einzelgefäße Multiply® 0,2 ml (Sarstedt)	Zellkulturschalen, 6-Wells (Nunc 140.675)
PCR-Folie MicroAmp® Optical Adhesive Film (Applied Biosystems)	Zellkulturschalen, 12-Wells (Nunc)
PCR-Gerät GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)	Zellkulturschalen, 24-Wells (Nunc)
PCR-Platte MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate (Applied Biosystems)	Zellschaber (Sarstedt)
	Zentrifuge 5415 R (Eppendorf)
	Zentrifuge 5810 R (Eppendorf)
	Zentrifuge Universal 30 RF (Hettich)

8.3.4 Immunfluoreszenz/ FACS

Primäre Antikörper:

Alpha Aktinin (Maus, IgG, monoklonal, Sigma A7811)
Troponin T (Maus, IgG, monoklonal, R&D MAB1874)
Vimentin (Ratte, IgG, monoklonal, R&D MAB2105)
Connexin-43 (Maus, IgG, monoklonal, BD 610061)
Oct-4 (Kaninchen, IgG, polyklonal, Abcam AB19857)

Sekundäre Antikörper:

Goat-anti-mouse Alexa-488 (Ziege, IgG, Invitrogen)
Goat-anti-mouse Alexa-546 (Ziege, IgG, Invitrogen)
Goat-anti-rabbit Alexa-488 (Ziege, IgG, Invitrogen)
Goat-anti-rabbit Alexa-546 (Ziege, IgG, Invitrogen)
Goat-anti-rat NorthernLights-557 (Ziege, IgG, R&D NL013)

Phalloidin-Alexa-488 (Invitrogen A-12379)
DRAQ5 (Biostatus BOS-889-001-R050)
Fluoromount-G (SouthernBiotech 0100-01)
BD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences 554722)

8.3.5 Proteine

BMP-4 (R&D Systems 314-BP)
Activin A (R&D Systems 338-AC)
FGF2 (basic FGF, R&D Systems 233-FB)
FGF2 (Universität Hannover)
VEGF (R&D Systems, 293-VE)

DKK-1 (R&D Systems 5439-DK)
Proteinase K (Qiagen 19131)
Aprotinin (Sigma-Aldrich F4753)
Thrombin (Sigma-Aldrich T7513)
Insulin (Sigma-Aldrich I9278)

8.3.6 Zellkultur

B-27 Supplement (Gibco 17504)
Collagenase IV (Gibco 17104)
DMEM (Gibco 41965)
DMEM ohne Calcium (Gibco 21068)
DMEM/ F12 (Gibco 21331)
Fetales Kälberserum (PAA A15-151)
Growth Factor Reduced BD Matrigel™ Matrix (BD 354230)
KnockOut DMEM (Gibco 10829)
KnockOut Serum Replacement (Gibco 10828)

L-Glutamin (Gibco 25030)
NEAA (Gibco 11140)
PBS (Gibco 14190)
Penicillin/ Streptomycin (Gibco 15140)
Pferdeserum (Gibco 26050)
RPMI 1640 (Gibco 21875)
StemPro-34 (Gibco 10639)
Trypsin 0,05% (Gibco 25300)
Trypsin 0,5% (Gibco 15400)
Trypsin0,25% (Gibco 25200)

8.3.7 Substanzen

Aceton (J.T. Baker)
Agarose (Invitrogen)
Amiodaron (Sigma-Aldrich)
Ampicillin (Sigma-Aldrich)
Ascorbinsäure (Merck)
Bovines Serum Albumin (Roth)
Calciumchloridhexahydrat (Sigma-Aldrich)
Carbachol
Chinidin (Carl Roth)
Cisaprid (Sigma-Aldrich)
Dimethylsulfoxid, DMSO (Sigma D8418-50ML)
Dofetilid (Sigma-Aldrich)
E-4031 (Sigma-Aldrich)
Ethanol, absolut (J.T. Baker)
Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (Sigma-Aldrich)
Fluoromount G (Southern Biotech)
Glucose (Sigma-Aldrich)
HEPES (Sigma-Aldrich)
Histofix (Roth P087.3)
Ibutilid (Sigma-Aldrich)

Isoprenalin, DL-Isoproterenol hydrochloride (Sigma-Aldrich)
Isopropanol, >99,8% (Merck)
Mowiol 4-88 (Hoechst)
Mitomycin C (Serva 29805)
Natriumazid, NaN₃ (Serva)
Natriumhydroxid, NaOH (Merck)
Natriumhydrogencarbonat (Merck)
Natriumdihydrogenphosphat (Merck)
Paraformaldehyd, PFA (Sigma-Aldrich)
Procainamid (Sigma-Aldrich)
Salzsäure, HCl (Merck)
Sertindol (Sigma-Aldrich)
β-Mercaptoethanol (Gibco)
SYBR Green (Fermentas K0222)
Sylgard 184 (Dow Corning)
Thioridazin (Sigma-Aldrich)
Tranexamsäure (Sigma-Aldrich 857653)
Verapamil (Sigma-Aldrich)
Wasser für Injektionszwecke (Baxter GmbH)
Y-27632 (Biaffin PKI-Y27632-010)

8.3.8 Zusätzliche Methoden

8.3.8.1 Messung der kontraktiven Calcium-Antwort bei vorgegebener Frequenz

Die Konzentrationswirkungskurve (KWK) von Calcium wurde an einem modifiziertem IonOptix Perfusionssystem gemessen. Bei den Systemen der Firma IonOptix handelt es sich primär um Anlagen zur Analyse von Calcium-Transienten, aber auch Längenmessungen können an diesen Geräten durchgeführt werden. Der Vorteil dieses Systems liegt in der Möglichkeit, das Messobjekt elektrisch stimulieren zu können. Elektrische Stimulation macht jedoch bei kleinen Volumina eine Perfusion unverzichtbar, weshalb ein Perfusionssystem ebenfalls zur Anlage gehörte. Der Standardaufbau, mit dem in der Regel einzelne Kardiomyozyten untersucht werden, wurde so modifiziert, dass EHTs in ähnlicher Weise analysiert werden konnten. Abbildung 61 zeigt den schematischen Aufbau des modifizierten Mehrkomponentensystems.

Die Messungen wurden hier in Tyrode (120 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,4 mM NaH₂PO₄; 22,6 mM NaHCO₃; 5 mM Glukose; 0,05 mM EDTA; 0,3 mM Ascorbinsäure; CaCl je nach Konzentration) durchgeführt. Die Perfusionsrate betrug etwa 4 ml/min, damit sich die während der elektrischen Stimulation (1,5 Hz, 15 V) entstehende hypochlorige Säure nicht auf die Kontraktilität auswirken konnte. Zunächst wurde zur Aufnahme der Ausgangslage 30 min mit Tyrode perfundiert (1,8 mM Ca²⁺). Anschließend wurden die folgenden Konzentrationen an Calcium gemessen, jeweils für 10 min: 0,2; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8; 2,2 und 3,2 mM.

8.3.8.2 Sympathische und parasympathische Stimulation bei vorgegebener Frequenz

Die Messung der sympathischen und parasympathischen Stimulation bei vorgegebener Frequenz wurde im selben System durchgeführt, wie unter 8.3.8.1 beschrieben. Der Einfluss von Isoprenalin (100 nM) zur sympathischen Stimulation und Carbachol (10 µM) zur parasympathischen Stimulation wurde bei einer submaximalen Calciumkonzentration von 0,6 mM untersucht. Elektrisch stimuliert wurde mit 1,5 Hz bei 15 V.

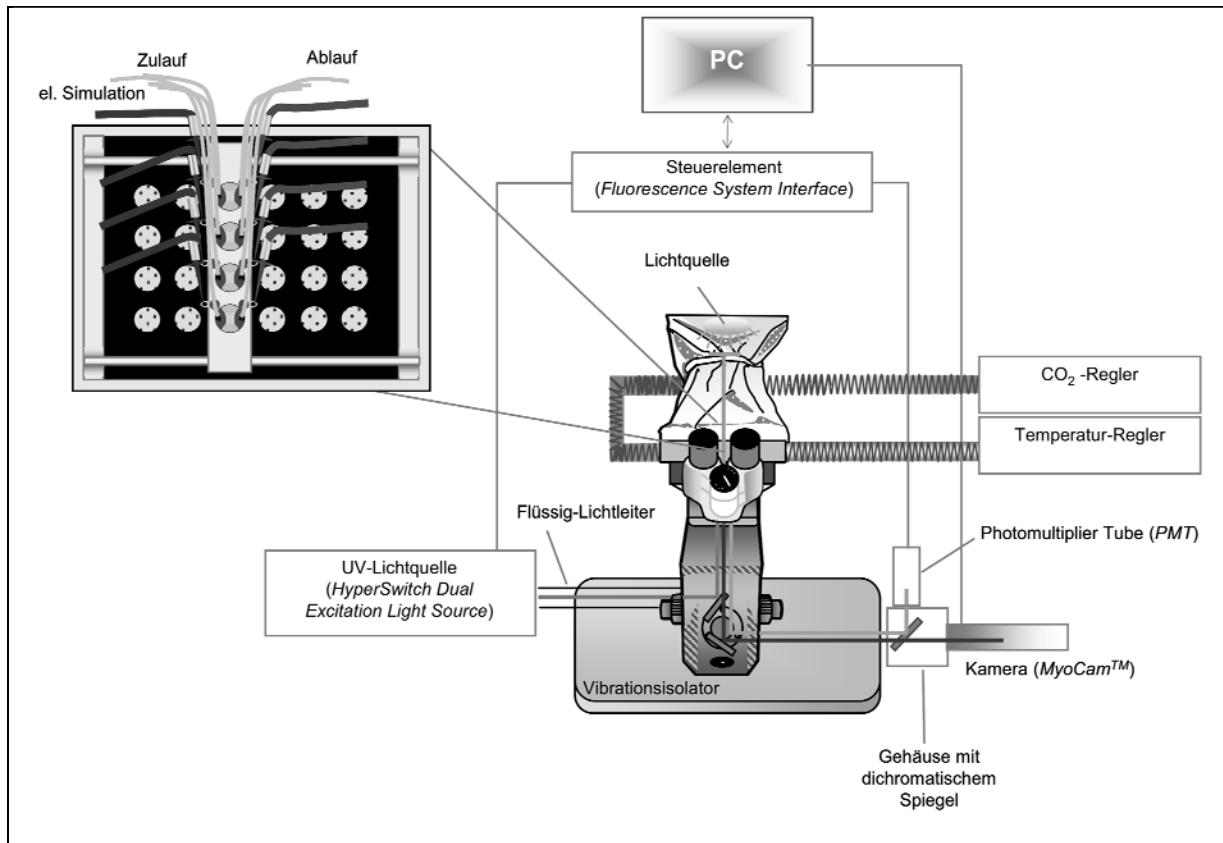


Abbildung 61: Schematische Darstellung des modifizierten IonOptix Systems.

8.3.9 Primer

Die verwendeten Primer für die quantitative PCR wurden mit dem Programm NCBI Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) entworfen. Der amplifizierte Bereich überspannt bei jedem untersuchten Gen mindestens ein Intron (*intron spanning*). Die Schmelztemperatur beträgt bei allen Primern zwischen 59° und 61° C, die Länge des PCR-Produkts liegt zwischen 150 und 250 Basenpaaren. Sämtliche Oligonukleotide wurde bei der Firma MWG/Eurofins eingekauft.

Name	Gen	NM nummer	Primer (vorwärts)	Primer (rückwärts)
Serca	ATP2A2	NM_170665.3	TTGATGAACTCAACCCCTCC	CCAATCTCGGCTTTCTTCAG
Glucuronidase beta	GUSB	NM_000181.1	AAACGATTGCAGGGTTTCAC	CTCTCGTCGGTGACTGTTCA
Islet	ISL1	NM_002202.1	GTTACCAGCCACCTTGAAAA	GGACTGGCTACCATGCTGTT
Kinase insert domain receptor, VEGFR2	KDR	NM_002253.1	GCGATGGCCTTCTGTAAAG	ACACGACTCCATGTTGGTCA
Mesoderm posterior 1 homolog	MESP1	NM_018670.1	GAAGTGGTTCCTTGGCAGAC	TCCTGCTTGCCTCAAAGTGT
Alpha MHC	MYH6	NM_002471	TTCATTGACTTTGGCATGGA	GGCTTCTGGAAATTGTTGGA
Beta MHC	MYH7	NM_000257.2	CACAGCTCTGCTCTGCTCTG	TTCTAGCCGCTCCTTCTCTG
Nanog	NANOG	NM_024865.1	GATTTGTGGGCTGAAGAAA	AAGTGGGTTGTTGCCTTTG
Oct4 POU class 5 homeobox 1	POU5F1	NM_203289.2 NM_002701.3	CGAAAGAGAAAGCGAACCAG	GCCGGTTACAGAACCACACT
NCX (sodium calcium exchanger)	SLC8A1	NM_021097.2	GCTCGAATTCCAGAATGATGA	CAGGTTGGCCAAACAGGTAT
Brachyury homolog	T	NM_003181.2	GCAAAAAGCTTTCCTTGATGC	ATGAGGATTTGCAGGTGGAC
Slow skeletal troponin I	TNNI1	NM_003281.3	GTGCCCTGCAGGACCTGTGC	CCGAGACACGGACTCGACGC
Cardiac troponin I	TNNI3	NM_000363.4	CGGAGAGTGAGGATCTCTGC	TCCATTCCACTCAGTGCATC
Cardiac troponin T (total)	TNNT2	NM_001001432 Etc.	TTCGACCTGCAGGAGAAGTT	GAGCGAGGAGCAGATCTTTG
Cardiac troponin T (variant 1)	TNNT2	NM_000364.2	CTGGAGAGAGGACGAAGACG	TTGGTTTGGACTCCTCCAT
Cardiac troponin T (variant 2 and 3)	TNNT2	NM_001001431.1	GCTGTTGAAGAGCAGGAGGA	CTCTCTCCATCGGGGATCTT
Cardiac troponin T (variant 4)	TNNT2	NM_001001432.1	AGGAGCAGGAAGAGCAGGA	CTCTCTCCATCGGGGATCTT

Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Primer.

8.4 Sicherheitsinformationen

Substanz	CAS Nummer	H-Sätze	P-Sätze	Symbole	KMR
Aceton	67-64-1	H: 225-319-336	P: 210-233-305+351+338	2, 7	
Amiodaron	19774-82-4	H312-H332	P280	7	
Ampicillin	69-52-3	H317-H334	P261-P280-P342 + P311	8	
Ascorbinsäure	50-81-7				
Calciumchlorid	07774-34-7	H: 319	P: 305+351+338	7	
Carbachol	51-83-2	H: 300	P: 264-301+310	6	
Chinidin	56-54-2	H301	P301 + P310	6	
Cisaprid	260779-88-2	H318	P280-P305 + P351 + P338	5	
DMSO	67-68-5				
Dofetilid	115256-11-6	H302-H319-H360	P201-P305+P351+P338- P308+P313	7,8	
E-4031	113559-13-0				
EDTA	60-00-4	H: 319	P: 305+351+338	7	
Ethanol, abs.	64-17-5	H: 225	P: 210	2	
Glucose	50-99-7				
HEPES	7365-45-9				
Ibutilid	122647-32-9	R22		7	
Isoprenalin	51-30-9	H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338	7	
Isoprenalin	7683-59-2				
Isopropanol	67-63-0	H: 225-319-336	P: 210-233-305+351+338	2, 7	
Mitomycin C	50-07-7	H300-H351	P264-P281-P301 + P310	7,8	K: 2
NaH ₂ PO ₄	10028-24-7				
NaHCO ₃	144-55-8				
Natriumazid	26628-22-8	H: 300-400-410	P: 273-309-310	6, 9	
Natriumhydroxid	1310-73-2	H: 314	P: 280-301+330+331-309-310- 305+351+338	5	
Paraformaldehyd	30525-89-4	H: 228-302-332-351- 335-315-319-317	P: 281-302+352-305+351+338- 308+313-304+340	2, 7, 8	
Procainamid	614-39-1	H302-H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338	7	
Salzsäure	7647-01-0	H: 314-335	P: 260-301+330+331- 303+361+353-305+351+338- 405-501	5, 7	
Sertindol	106516-24-9	H315-H319-H335-H413	P261-P305 + P351 + P338	7	
Thioridazin	130-61-0	H302-H315-H319-H335- H410	P261-P273-P305 + P351 + P338-P501	7, 9	
Tranexamsäure	1197-18-8	H315-H319-H335	P261-P305 + P351 + P338	7	
Verapamil	152-11-4	H301-H311-H331	P261-P280-P301 + P310-P311	6	
Y-27632	331752-47-7	H302-H312-H332	P280	7	
β-Mercaptoethanol	60-24-2	H: 301-310-330-315- 318-400-410	P: 280-273-302+352-304+340- 305+351+338-309-310	5, 6, 9	

Tabelle 14: Sicherheitsinformationen zu allen verwendeten Substanzen, Bedeutung der H- und P-Sätze siehe unter 8.4.1 und 8.4.2.

8.4.1 H-Sätze

- H200 Instabil, explosiv.
- H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.
- H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.
- H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.
- H220 Extrem entzündbares Gas.
- H221 Entzündbares Gas.
- H222 Extrem entzündbares Aerosol.
- H223 Entzündbares Aerosol.
- H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.
- H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
- H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
- H228 Entzündbarer Feststoff.
- H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.
- H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.
- H242 Erwärmung kann Brand verursachen.
- H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.
- H251 Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.
- H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.
- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.
- H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.
- H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder –Verletzungen verursachen.
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.
- H301 Giftig bei Verschlucken.
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.
- H311 Giftig bei Hautkontakt.
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
- H315 Verursacht Hautreizungen.
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.
- H331 Giftig bei Einatmen.
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- H335 Kann die Atemwege reizen.
- H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
- H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H350i Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.
- H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H360 F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H360 D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 Fd Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H360 Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H361 f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
- H361 d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H361 fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.
- H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
- H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).
- H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H400 Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410 Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.
H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.
EUH001 In trockenem Zustand explosiv.
EUH006 Mit und ohne Luft explosionsfähig.
EUH014 Reagiert heftig mit Wasser.
EUH018 Kann bei Verwendung explosionsfähige / entzündbare Dampf /Luft-Gemische bilden.
EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
EUH044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.
EUH029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
EUH031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
EUH059 Die Ozonschicht schädigend.
EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
EUH070 Giftig bei Berührung mit den Augen.
EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.

EUH201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.
EUH201 A Achtung! Enthält Blei.
EUH202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
EUH203 Enthält Chrom(VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH206 Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.
EUH207 Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.
EUH208 Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.
EUH209 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden.
EUH209 A Kann bei Verwendung entzündbar werden.
EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.
EUH401 Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

8.4.2 P-Sätze

P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.
P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
P103 Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.
P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202 Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210 Von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P211 Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.
P220 Von Kleidung /.../ brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.
P221 Mischen mit brennbaren Stoffen /... unbedingt verhindern.
P222 Kontakt mit Luft nicht zulassen.
P223 Kontakt mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt verhindern.
P230 Feucht halten mit
P231 Unter inertem Gas handhaben.
P232 Vor Feuchtigkeit schützen.
P233 Behälter dicht verschlossen halten.
P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
P235 Kühl halten.
P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P241 Explosionsgeschützte elektrische Betriebsmittel / Lüftungsanlagen / Beleuchtung /... verwenden.
P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.
P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P244 Druckminderer frei von Fett und Öl halten.

P250 Nicht schleifen / stoßen /.../ reiben.
P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.
P260 Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen.
P261 Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden.
P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.
P263 Kontakt während der Schwangerschaft / und der Stillzeit vermeiden.
P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.
P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.
P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280 Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.
P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.
P282 Schutzhandschuhe / Gesichtsschild / Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.
P283 Schwer entflammbar / flammhemmende Kleidung tragen.
P284 Atemschutz tragen.
P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.
P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.

P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P301 Bei Verschlucken:

P302 Bei Berührung mit der Haut:

P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):

P304 Bei Einatmen:

P305 Bei Kontakt mit den Augen:

P306 Bei kontaminierter Kleidung:

P307 Bei Exposition:

P308 Bei Exposition oder falls betroffen:

P309 Bei Exposition oder Unwohlsein:

P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P311 Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P312 Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P320 Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P330 Mund ausspülen.

P331 Kein Erbrechen herbeiführen.

P332 Bei Hautreizung:

P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:

P334 In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.

P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.

P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.

P337 Bei anhaltender Augenreizung:

P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P341 Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P342 Bei Symptomen der Atemwege:

P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.

P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.

P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.

P353 Haut mit Wasser abwaschen / duschen.

P360 Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.

P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.

P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

P370 Bei Brand:

P371 Bei Großbrand und großen Mengen:

P372 Explosionsgefahr bei Brand.

P373 Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe / Gemische / Erzeugnisse erreicht.

P374 Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.

P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P376 Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.

P377 Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.

P378 ... zum Löschen verwenden.

P380 Umgebung räumen.

P381 Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.

P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.

P391 Verschüttete Mengen aufnehmen.

P301 + P310 Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P301 + P312 Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P301 + P330 + P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.

P302 + P334 Bei Kontakt mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.

P302 + P350 Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.

P302 + P352 Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P303 + P361 + P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P304 + P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P304 + P341 Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P305 + P351 + P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.

P307 + P311 Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat Einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P309 + P311 Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen /nassen Verband anlegen.

P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.

P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.

P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.

P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen.
Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen:
Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P401 ... aufbewahren.

P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.

P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

P406 In korrosionsbeständigem /... Behälter mit
korrosionsbeständiger Auskleidung aufbewahren.

P407 Luftspalt zwischen Stapeln / Paletten lassen.

P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P411 Bei Temperaturen von nicht mehr als ... °C / ...
aufbewahren.

P412 Nicht Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.

P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg bei
Temperaturen von nicht mehr als ... °C aufbewahren.

P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.

P422 Inhalt in / unter ... aufbewahren

P402 + P404 In einem geschlossenen Behälter an einem
trockenen Ort aufbewahren.

P403 + P233 Behälter dicht verschlossen an einem gut
belüfteten Ort aufbewahren.

P403 + P235 Kühl an einem gut belüfteten Ort
aufbewahren.

P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung geschützt an einem
gut belüfteten Ort aufbewahren.

P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen und nicht
Temperaturen von mehr als 50 °C aussetzen.

P411 + P235 Kühl und bei Temperaturen von nicht mehr
als ... °C aufbewahren.

P501 Inhalt / Behälter ... zuführen.

9 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Hansen A, Eder A, Bönstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwörer A, Uebeler J, Eschenhagen T. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 2010; 107:35-44.

Schaaf, S., Shibamiya, A., Mewe, M., Eder, A., Stöhr, A., Hirt, M.N., Rau, T., Zimmermann, W.-H., Conradi, L., Eschenhagen, T. & Hansen, A., 2011. Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PloS one*, 6(10), p.e26397

Kongressbeiträge

Eder A, Hansen A, Bönstrup M, Flato M, Uebeler J, Schaaf S, Eschenhagen T. A New Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue. Winter Meeting on Translational Basic Science of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Les Diablerets, Januar 2009

Eder A, Hansen A, Bönstrup M, Flato M, Uebeler J, Schaaf S, Eschenhagen T. Eine neue Methode zur Herstellung miniaturisierter künstlicher Herzmuskelgewebe auf der Mannheim, April 2009

Conradi L, Hansen A, Eder A, Hirt M, Schaaf S, Reinsch A, Reichenspurner H, Eschenhagen T. Evaluation of fibrin-based Engineered Heart Tissue (FBEHT) as potential future strategy towards cardiac regeneration. 39. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax, Herz und Gefäßchirurgie, Stuttgart, Februar 2010

Eder A, Hansen A, Bönstrup M, Flato M, Uebeler J, Schaaf S, Eschenhagen T. Fibrin-based mini-EHT – towards a robust, miniaturised and automatised screening assay. 51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2010

Stöhr A, Eder A, Hansen A, Hirt M, Schaaf S, Schlossarek S, Carrier L, Eschenhagen T. Modeling cardiac diseases with engineered heart tissue. Annual Meeting on Translational Basic Science of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Berlin, April 2010

Conradi L, Hansen A, Eder A, Hirt M, Schaaf S, Reinsch A, Reichenspurner H, Eschenhagen T. Fibrin-based Engineered Heart Tissue (FBEHT): a potential future strategy towards cardiac regeneration? *Transpl Int* 2010 23;3:3. 19. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, Hamburg, Oktober 2010

Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, Eder A, Stoehr A, Eschenhagen T, Hansen A. Human embryonic stem cell derived cardiomyocytes for engineered heart tissue. Winter Meeting on Translational Basic Science of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Les Diablerets, Januar 2011

Conradi L, Vogelsang A, Hansen A, Eder A, Hirt M, Schaaf S, Reichenspurner H, Eschenhagen T. Fibrin-based engineered heart tissue for cardiac repair: initial results after transplantation. *Thorac Cardiovasc Surg* 2011;59:Suppl.1:S93. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax, Herz und Gefäßchirurgie, Stuttgart, Februar 2011

Schulte C, Hansen A, Conradi L, Eder A, Schaaf S, Hirt M, Rau T, Reichenspurner H, Eschenhagen T. Impact of oxygen concentration on engineered heart tissue development. *Thorac Cardiovasc Surg* 2011;59:Suppl.1:S31. 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax, Herz und Gefäßchirurgie, Stuttgart, Februar 2011

Eder A, Hansen A, Bönstrup M, Flato M, Uebeler J, Schaaf S, Eschenhagen T. Multi-well testing with engineered heart tissue – a novel assay for drug screening and predictive toxicology. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Frankfurt, März 2011

Sebastian Schaaf, Aya Shibamiya, Marco Mewe, Alexandra Eder, Andrea Stöhr, Marc N. Hirt, Thomas Rau, Wolfram-Hubertus Zimmermann, Lenard Conradi, Thomas Eschenhagen and

Arne Hansen. Detection of proarrhythmic effects with human engineered heart tissue. 9th annual meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Toronto, 2011

Sebastian Schaaf, Aya Shibamiya, Marco Mewe, Alexandra Eder, Andrea Stöhr, Marc N. Hirt, Thomas Rau, Wolfram-Hubertus Zimmermann, Lenard Conradi, Thomas Eschenhagen and Arne Hansen. Cardiac Stem Cell and Tissue Engineering Conference 2011, San Servolo, 2011

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit, für die Anleitung, die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion und für die wissenschaftlichen Beiträge. Des Weiteren danke ich besonders für die Bereitstellung ausgezeichneter Arbeitsbedingungen.

Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich ausdrücklich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für den Fachbereich Pharmazie.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt Arne Hansen, der diese Arbeit mit Geduld und Verstand angeleitet hat.

Alexandra Eder möchte ich danken, sie hat die humanen EHTs hergestellt und ihr ist kein einziges misslungen. Hut ab!

Marco Mewe vom Institut für Pharmakologie für Pharmazeuten hat die elektrophysiologischen Untersuchungen durchgeführt, dafür vielen Dank.

Melanie Neumann vom Institut für Neuropathologie hat die histologischen Färbungen durchgeführt, auch dafür vielen Dank.

Der DGF möchte ich für die Finanzierung danken.

Abschließend möchte ich meiner Arbeitsgruppe und auch dem Rest vom Institut danken, für die Unterstützung, die Diskussionen, die Erklärungen, die Gespräche und die insgesamt sehr angenehme Atmosphäre.