

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle Pharmakologie und
Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

**Scale-up – Generierung künstlicher Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) im
Maßstab eines Transplantats für Menschen**

Dissertation

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

von

Mohammad Yusuf Nejahsie

Hamburg, Januar 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 21.08.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Heimo Ehmke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Der Myokardinfarkt	1
1.1.1 Pathogenese	2
1.1.2 Therapie	3
1.2 Regenerative Medizin	4
1.2.1 Engineered Heart Tissues	5
1.2.2 Methoden zur Herstellung künstlicher Herzgewebe	5
1.2.3 Kardiale Gewebeersatztherapie	7
1.2.3.1 Intramyokardiale/Intrakoronare Injektion von Zellen	7
1.2.3.2 Implantation oder Injektion von zellfreien Matrices	7
1.2.3.3 Transplantation von in vitro gezüchteten Herzmuskelgeweben	8
1.2.3.4 Limitationen in der Gewebeersatztherapie durch EHTs	9
1.3 Ziel dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Hilfsmittel und Geräte	11
2.2 Chemikalien und Lösungen	13
2.2.1 Antikörperübersicht für die Immunfluoreszenzfärbung	14
2.2.2 Primerliste	15
2.3 Zubehör für die EHT Generierung	16
2.3.1 Silikonhalterung	16
2.3.2 Teflonplatzhalter	16
2.4 Methoden der Zellkultur	17
2.4.1 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten	17
2.4.2 Generierung von soliden 6w6p-EHTs	18
2.4.3 Herstellung von porösen 6w6p-EHTs	19
2.4.4 Kultivierung der EHTs	19
2.5 Analyse der Kontraktilität von EHTs	20
2.5.1 Messapparatur zur video-optischen Analyse	20
2.5.2 Kontraktionsmessung mittels ImageJ	23
2.6 Histologie	23
2.6.1 Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden	23
2.6.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)	24
2.6.3 Dystrophin-Färbung	26
2.6.4 Die Immunfluoreszenzfärbung von 6w6p-EHTs	26
2.6.5 Zellzahl und Zellgrößenbestimmung	27
2.7 Molekularbiologie	28
2.7.1 RNA Isolation	28
2.7.1.1 Bestimmung der RNA-Konzentration	29
2.7.1.2 Reverse Transkription	29
2.7.1.3 Quantitative Echtzeit-PCR	30
2.7.2 Isolation von DNA	31
2.7.3 Gelelektrophorese	32
2.8 Statistische Auswertung	32

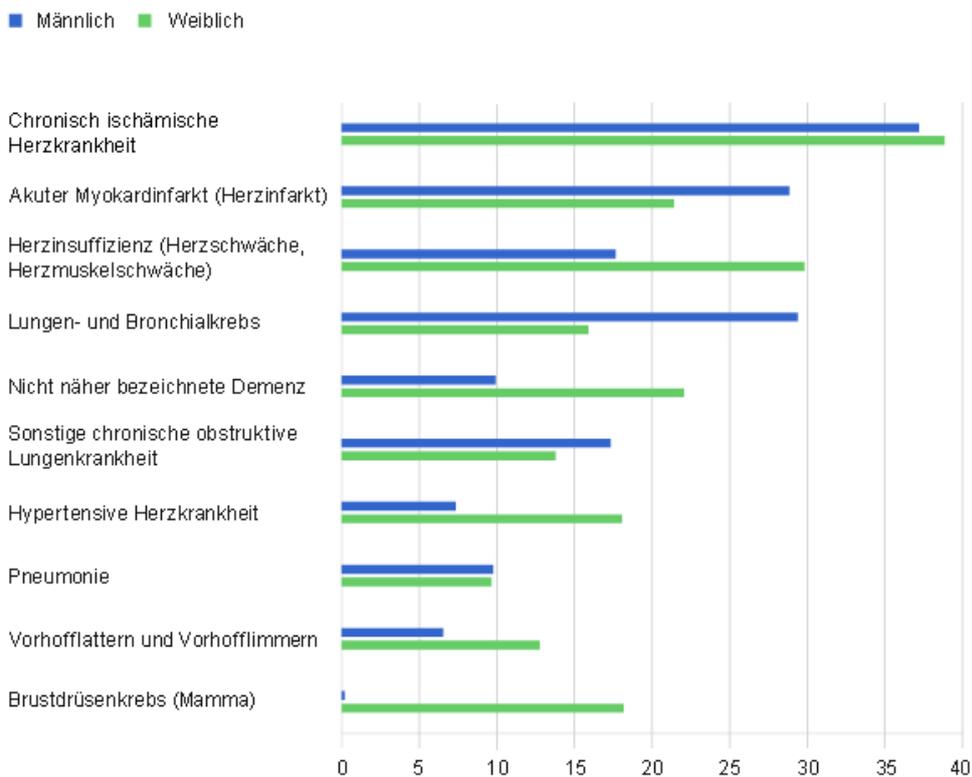
3. Ergebnisse	33
3.1 Generierung der Poren.....	33
3.1.1 Agarose-Schablone.....	33
3.1.2 Gelatine	35
3.1.3 PTFE-Schablone.....	36
3.1.4 PEEK-Schablone	38
3.1.4.1 Biokompatibilitätsprüfung.....	39
3.1.5 PDMS-Schablone	40
3.2 Poren-EHTs vs. Kontroll-EHTs.....	42
3.2.1 Ermittlung des Elastizitätsmoduls.....	42
3.2.2 Kontraktionskraftmessung der EHTs	43
3.2.3 Stoffwechselaktivität Poren-EHTs vs. Solid-EHTs.....	44
3.2.4 Histologische Untersuchung	45
3.2.4.1. Whole mount-Analyse	45
3.2.4.2 Färbung von Paraffinschnitten	47
3.2.5 DNA-Analyse	53
3.2.6 RNA-Analyse.....	54
3.3 Scale-up – Generierung eines EHTs im Maßstab eines Transplantats für Menschen	56
4. Diskussion	59
4.1 Entwicklung der Methodik	59
4.1.1 Das Grundprinzip.....	59
4.1.2 Künstliches Herzmuskelgewebe – EHT	59
4.1.3 Wahl des EHT-Formats	60
4.1.4 Vergleich der Schablonen	61
4.2 Entwicklung des Messverfahrens: Kontraktionskraft.....	63
4.2.1 Messverfahren – Automatische vs. manuelle Kontraktionsmessung.....	63
4.2.2 Kontraktilität Poren-EHTs vs. Kontroll-EHTs	65
4.3 Zellüberleben	67
4.3.1 Zellzahlbestimmung	67
4.3.2 DNA-Gehalt	69
4.3.3 RNA-Analyse	70
4.4 Stoffwechselaktivität	71
4.5 Vergleich mit anderen Methoden.....	71
4.6 Ausblick.....	74
5. Zusammenfassung	76
6. Literaturverzeichnis.....	78
7. Danksagung.....	82
8. Lebenslauf.....	83
9. Eidesstattliche Versicherung.....	84

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

In den westlichen Industrienationen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigsten Todesursachen im Erwachsenenalter. Darunter zählen Erkrankungen des Herzens und des Blutgefäßsystems. Neben der koronaren Herzkrankheit (KHK) macht der Myokardinfarkt einen großen Anteil aller Herz-Kreislauf-Erkrankungen aus. Laut statistischem Bundesamt gehen 8,2% (76.013 Verstorbene) aller Todesfälle in Deutschland auf die KHK und 5,3% (49.210 Verstorbene) aller Todesfälle in Deutschland auf den akuten Myokardinfarkt zurück (Statistisches Bundesamt, 2015; Abb. 1.1).

Häufigste Todesursachen 2015
in Tsd.



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017

Abb. 1.1 Häufigste Todesursachen 2015. (Statistisches Bundesamt, 2017)

1.1.1 Pathogenese

Der Myokardinfarkt ist eine akut lebensbedrohliche Situation, die zumeist auf dem Boden einer KHK entsteht und mit einer Minderperfusion des Myokards mit darauffolgender Myokardnekrose einhergeht. Die häufigste Ursache des akuten Myokardinfarkts ist die Ruptur von atherosklerotischen Plaques mit konsekutiver Thrombusbildung, die zum Verschluss eines oder mehrerer Koronararterien führen kann. Die unmittelbare Reperfusion der Koronargefäße und somit des Myokards ist unabdingbar und sollte sofort erfolgen, da eine vollständige Okklusion der versorgenden Koronararterie für 20 Minuten ausreicht, um eine irreversible Myokardnekrose im betroffenen Gebiet hervorzurufen (Ganote 1974). Des Weiteren nimmt mit zunehmender Dauer der Ischämie die Schädigung des Myokards vom Endokard zum Epikard zu. Die äußeren Wandschichten können aufgrund der niedrigeren Druckbelastungen im Vergleich zur Innenschicht ein geringeres Sauerstoffangebot länger tolerieren (Reimer et al. 1977).

Da der Myokardinfarkt als akute Komplikation der koronaren Herzkrankheit entstehen kann, sind die Risikofaktoren der KHK zugleich Risikofaktoren des Myokardinfarkts. In der PROCAM-Studie (Schulte et al. 1999) sind unterschiedliche Faktoren prospektiv berücksichtigt worden, die eine koronare Herzkrankheit und somit einen Myokardinfarkt begünstigen. Zu den Risikofaktoren zählen erhöhte Blutfettwerte (Cholesterin und Triglyceride), ein hoher systolischer Blutdruck, ein hohes Patientenalter, das männliche Geschlecht, Nikotinabusus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen in der Familienanamnese und der Diabetes mellitus (Schulte et al. 1999).

Klinisch wird der akute Myokardinfarkt wie die instabile *Angina pectoris* dem akuten Koronarsyndrom (ACS) zugeteilt. Die klinische Differenzierung zwischen dem Myokardinfarkt und der instabilen *Angina pectoris* erfolgt durch die laborchemische Bestimmung der Herzenzyme im peripheren Blut. Während es bei der instabilen *Angina pectoris* zum Ausbleiben eines Anstiegs der herzspezifischen Nekrosemarker - Troponin I und T - kommt, ist der Myokardinfarkt gekennzeichnet durch akuten Zelluntergang und somit einem Anstieg jener Nekrosemarker. Troponin I und T sind Proteine des kontraktilen Apparates der Kardiomyozyten, des Sarkomers. Während das Troponin T auch in Skelettmuskelzellen von Patienten mit chronischem Nierenversagen vorliegen kann, liegt das Troponin I nicht außerhalb des Myokards vor und ist somit herzspezifischer (Apple et al. 1998). Die Troponine werden beim Untergang der Kardiomyozyten frei, sind in der Regel innerhalb von 3-4 Stunden nach dem Infarkt messbar und bleiben bis zu 14 Tage nach dem Herzinfarkt erhöht (Morrow et al. 2007).

Anhand von elektrokardiographischen-Ableitungen (EKG) wird der Myokardinfarkt wiederum in einen STEMI (*ST-Hebungsinfarkt*) und einen NSTEMI (*Nicht-ST-Hebungsinfarkt*) unterteilt (Thygesen et al. 2012). Die Unterscheidung in STEMI und NSTEMI lässt Rückschlüsse auf die betroffenen Myokardschichten zu. Beim STEMI handelt es sich um einen transmuralen Myokardinfarkt, bei dem Endokard, Myokard und Perikard betroffen sind, während beim NSTEMI meist nur das subendokardiale Myokard betroffen ist. Die kurzfristige Letalität ist beim NSTEMI niedriger als beim STEMI, wohingegen die langfristige Letalität beim NSTEMI höher ist (Chan et al. 2009). Diese Unterschiede erfordern folglich eine ebenso unterschiedliche Akut-Therapie in der Klinik (vgl. 1.1.2).

Die hohe Letalität des Myokardinfarkts ist u.a. auf die schweren *Postinfarkt*-Komplikationen zurückzuführen. Die Komplikationen beinhalten mechanische (z.B. Herzinsuffizienz, Ventrikelseptumruptur), arrhythmische (z.B. Reentry-Tachykardie), ischämische und inflammatorische (z.B. Perikarditis) Folgeschäden am Herzen (Mullasari et al. 2011).

1.1.2 Therapie

Der Herzinfarkt stellt eine Notfallsituation dar und bedarf umgehender Handlung. Dabei gilt *'time is muscle'*, d.h., dass der Zelluntergang am Myokard durch eine schnelle Therapieeinleitung minimiert werden kann. Ziel der Therapie ist dabei, die Gefäßokklusion aufzulösen und dadurch die Perfusion der Koronargefäße wiederherzustellen. Die Akuttherapie erfolgt bereits beim Eintreffen des Notarztes durch Sauerstoffzufuhr (bei O₂-Sättigung $\leq 90\%$), einer dualen Thrombozytenaggregationshemmung (Acetylsalicylsäure und Clopidogrel), Antikoagulation (unfraktioniertes Heparin), Vasodilatation (Glyceroltrinitrat), Erhöhung der Diastolendauer (Beta-Blocker) und Analgesie (Morphin; ESC Guidelines 2017). In der Klinik erfolgt die Reperfusionstherapie. Dies gelingt am effektivsten durch die PTCA (*Perkutane transluminale Koronarangioplastie*) mit begleitender Thrombozytenaggregationshemmung. Bei der PTCA ist zu beachten, dass sich unterschiedliche Herangehensweisen in der Therapie des STEMI und NSTEMI durchgesetzt haben. Die Therapieempfehlung des NSTEMI beinhaltet die Durchführung einer PTCA innerhalb von 24–72 Stunden (Cannon et al. 2001; Riezebos et al. 2009). Beim STEMI gilt es eine umgehende Reperfusion anzustreben, um den Zelluntergang im ischämischen Myokardareal zu minimieren. Die Reperfusion mittels PTCA sollte hierbei innerhalb von 60–120 Minuten erfolgen (Gara et al. 2013). Wenn die PCTA zur Reperfusion der Koronargefäße nicht innerhalb von 120 Minuten durchführbar ist, sollte eine sofortige Thrombolyse-Therapie mit Fibrinolytika erfolgen. Dabei bewirken die Fibrinolytika (z.B. rt-PA = rekombinanter

gewebespezifischer Plasminogenaktivator; Streptokinase) die Konversion von endogenem Plasminogen zu Plasmin, welches wiederum das Fibrin spaltet und somit die Auflösung des Thrombus fördert und die Durchgängigkeit der Gefäße wiederherstellt (Kumar and Cannon 2009). Neben den Akutmaßnahmen erfolgt die Therapie des Myokardinfarkts durch die Tertiärprophylaxe zur Prävention möglicher Komplikationen. Dies beinhaltet zum einen, allgemeine Maßnahmen wie Nikotin- und Alkoholkarenz, die optimale Einstellung des Diabetes mellitus, des Blutdrucks und der Ernährung und zum anderen die Einnahme von prognoseverbessernden Medikamenten. Hierzu zählen Acetylsalicylsäure und Clopidogrel zur Thrombozytenaggregationshemmung, Statine zur Senkung der Blutfettwerte und Beta-Blocker und ACE-Hemmer. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die therapeutischen Ansätze des Myokardinfarkts und der daraus entstehenden Herzinsuffizienz auf die Prophylaxe dieser Erkrankungen konzentrieren. Bei starker Schädigung des Myokards sind jedoch Herztransplantationen häufig die einzige kurative Möglichkeit. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an Spenderorganen ist die regenerative Medizin folglich ein großer Hoffnungsträger.

1.2 Regenerative Medizin

Die hohe Prävalenz von Traumata, angeborenen Defekten und Erkrankungen, die u.a. mit der steigenden Lebenserwartung einhergehen, erfordern die Entwicklung von Möglichkeiten, die die Regeneration von verletzten oder erkrankten Geweben und Organen ermöglicht. *Tissue Engineering* (Geweberekonstruktion/Gewebezüchtung), ist ein interdisziplinäres Forschungsfeld, das die Biotechnologie, Materialwissenschaften, Chemie, Biologie und die Medizin miteinander verknüpft und auf die Entwicklung biologischer Gewebe *in vitro* abzielt, die geschädigtes Gewebe oder Organe in ihrer Funktion unterstützen oder sogar ersetzen sollen (Mooney and Vacanti 1993). Einen weiteren Nutzen zeigt *Tissue Engineering* in der Grundlagenforschung. Dort dient künstlich hergestelltes Gewebe der Aufklärung zellulärer Mechanismen (Friedrich et al. 2012), der Krankheitsmodellierung (Stöhr et al. 2013), der *in-vitro*-Testung von Pharmaka (Mannhardt et al. 2017) und reduziert auf diese Weise die Notwendigkeit von Versuchstieren. Weitere Fortschritte auf diesem Gebiet könnten zudem zukünftig Tierexperimente nach dem Bestreben des 3-R-Prinzips (Englisch: *replace, reduce, refine*), ersetzen oder zumindest reduzieren.

1.2.1 Engineered Heart Tissues

Engineered Heart Tissues (EHT; künstliche Herzgewebe) nehmen eine besondere Stellung in der regenerativen Medizin ein. Künstliches Herzgewebe könnte in naher Zukunft als Alternative zur Herztransplantation bei der Behandlung des Myokardinfarkts eine zentrale Rolle spielen.

1.2.2 Methoden zur Herstellung künstlicher Herzgewebe

Die Erforschung und Etablierung von Methoden zur Herstellung künstlicher Herzgewebe hat in den letzten Jahrzehnten einen enormen Fortschritt erfahren (Weinberger et al. 2017). Die stetige Weiterentwicklung von Ansätzen im Bereich des *Cardiac Tissue Engineering* lässt auf die Erweiterung des Therapiespektrums kardial erkrankter Personen hoffen. Dabei werden unterschiedliche Ansätze im Bereich der EHT Generierung verfolgt, die im Folgenden erläutert werden.

Scaffold-Ansatz

Dieser Ansatz beruht auf der Besiedlung vorgeformter Gerüste (*scaffolds*) mit Kardiomyozyten. Als Gerüst können einerseits vorgeformte Kollagenkonstrukte (Radisic et al. 2004) oder biodegradierbare Gerüstmaterialien, wie beispielsweise Gelatine (Golden and Tien 2007), Polyglycolsäure (Carrier PM et al. 1999) oder Alginat (Leor et al. 2000) dienen, die mit Zellen besiedelt werden. Andererseits können auch natürliche strukturgebende Gewebe wie z.B. Rattenherzen genutzt werden, die zunächst dezellularisiert (z.B. mit SDS und Triton X-100) und danach mit neuen Kardiomyozyten besiedelt werden (Ott et al. 2008). Durch die Dezellularisierung bleibt nur die extrazelluläre Matrix als Grundgerüst über. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist, dass die extrazelluläre Matrix genau wie *in vivo* strukturiert ist. Bisher zeigten sich allerdings bei dieser Methode noch Schwierigkeiten in der homogenen Wiederbesiedlung der Organe mit Zellen. Des Weiteren eignet sich diese Methode weniger zur Krankheitsmodellierung und der *in-vitro*-Testung von Pharmaka. Auch die Notwendigkeit eines Spenderorgans und der hohe Aufwand erschweren die gängige Nutzung dieser Methode zur Gewebeersatztherapie.

Cell-Sheet-Ansatz

Beim *Cell-Sheet-Ansatz* werden isolierte Kardiomyozyten auf einer thermosensitiven Zellkulturschale kultiviert, um *Zell-Monolayer* (einlagige Zellschichten) zu generieren. Bei dieser Methode wird komplett auf die Verwendung einer Matrix verzichtet. Die Thermosensitivität der Zellkulturschalen ermöglicht die intakte Entnahme der künstlich hergestellten Kardiomyozyten-*Monolayer* aus der Schale. Auf diese Weise gezüchtete *Monolayer* werden nach der Entnahme übereinander gelagert und zu sogenannten Multilayer-*Cell-Sheets* verknüpft. Durch dieses Prinzip können dreidimensionale Gewebe generiert werden, die auf geschädigtes Myokard transplantiert werden können (Shimizu 2002). Die *Cell-Sheet*-Methode findet auch in anderen Bereichen des *Tissue Engineering* Anwendung, so konnte in unterschiedlichen Arbeiten gezeigt werden, dass auch Epithelschichten (Ohki et al. 2006) und Keratinozytenschichten (Yamato et al. 2001) auf thermosensitive Zellkulturschalen gezüchtet und miteinander verknüpft werden können. Im Mai 2018 wurde in Japan bereits die erste klinische Studie zugelassen, mit dieser Methode die ersten hiPSC-Patches am Patienten zu testen (Cyranoski 2018). Die Ergebnisse dieser Studie sind aktuell (Stand: 12. September 2018) noch ausstehend und sollen folgen.

Hydrogel-Ansatz

Seit den 1980ern werden Hydrogele für Fibroblasten- und Muskelzellzucht verwendet (Civerchia-Perez et al. 1980; Vandenburgh et al. 1988). Im Jahr 1997 wurde erstmals dieser Ansatz auf die Herstellung von dreidimensionalen künstlichem Herzgewebe übertragen (Eschenhagen et al. 1997). Hydrogelbildner, die am häufigsten als Matrix zur Herstellung von künstlichen Herzgeweben genutzt werden, sind u.a. das natürliche Extrazellulärmatrix-Protein Kollagen I (Eschenhagen et al. 1997), eine Mischung aus Kollagen I und Matrigel Mischung (Fink et al. 2000; Zimmermann et al. 2002; de Lange et al. 2011) und Fibrin (Huang et al. 2007; Bian et al. 2009; Hansen et al. 2010). Im Einzelnen werden beim Hydrogel-Ansatz isolierte Kardiomyozyten mit einem flüssigen Hydrogel vermischt und anschließend in eine Gussform gegeben, die die Geometrie des späteren Gewebes vorgibt. Durch Polymerisation wird das flüssige Hydrogel fest und schließt dabei die Zellen in der Matrix ein. Aufgrund der gelartigen Konsistenz und Elastizität der Hydrogele ist zum einen die Nährstoffversorgung der Kardiomyozyten durch Diffusion gewährleistet und zum anderen die Ausbreitung der Zellen im Hydrogel und schließlich die Dehnung des Konstrukts bei Kontraktionen und Relaxationen möglich.

1.2.3 Kardiale Gewebeersatztherapie

Ziel der Gewebeersatztherapie ist die Wiederherstellung der Funktion von abgestorbenem bzw. geschädigtem Gewebe. Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt, die im Folgenden erläutert werden.

1.2.3.1 Intramyokardiale/Intrakoronare Injektion von Zellen

Dieser Ansatz beschäftigt sich mit der intrakardialen (Menasché et al. 2008; Rota et al. 2009) und intrakoronaren (Lee et al. 2011; Bolli et al. 2013) Injektion von kardialen Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs in die infarzierten Herzareale. Dabei kommen u.a. embryonale-, skeletale Myoblasten-, induzierte pluripotente- und aus dem Knochenmark abgeleitete Stammzellen zum Einsatz (Sanganalmath and Bolli, 2013). Ein großer Vorteil dieser Methode ist die einfache Applikation der notwendigen Zellen nach einem Herzinfarkt. Ein erfolgreiches Meerschweinchen-Modell zeigte bereits, dass Kardiomyozyten, die aus humanen embryonalen-Stammzellen generiert wurden, eine Remuskularisierung der infarzierten Regionen bewirken (Shiba et al. 2012). Dieses Ergebnis konnte an nicht-humanen Primaten bestätigt werden. Allerdings zeigten sich bei den Versuchstieren als Nebenwirkung der Therapie, ventrikuläre Arrhythmien (Chong et al. 2014). Ein weiterer Nachteil ergibt sich bei dieser Methode bei der Retention der injizierten Zellen. Nur ein geringer Anteil der Zellen überlebt im gewünschten Areal (<10%). Der weitaus größte Anteil der Zellen wird schon wenige Stunden nach der Injektion vom gewünschten Areal in die Lungen, Leber, Nieren und Milz gespült (Dow et al. 2005).

1.2.3.2 Implantation oder Injektion von zellfreien Matrices

Die Implantation oder Injektion von zellfreien Matrices stellt die einfachste Methode des *Tissue Engineering* dar. Dabei werden im infarzierten Herzareal biokompatible Matrices wie z.B. Kollagen (Wei et al. 2015) oder Hyaluronsäure (Ifkovits et al. 2010) injiziert/implantiert. Diese Methode zielt darauf ab, dass dabei kardiale Vorläuferzellen aktiviert werden und in das geschädigte Myokard einwandern (*homing*). Auf diese Weise soll dem pathologischen *Remodeling* (Gewebeumbau) des Herzen entgegengewirkt werden. Das prinzipielle Problem des Ansatzes ist, dass es keine überzeugenden Hinweise darauf gibt, dass einwandernde Zellen zur Neubildung von Herzmuskelzellen führen (Eschenhagen et al. 2017).

1.2.3.3 Transplantation von *in vitro* gezüchteten Herzmuskelgeweben

Ein weiterer Ansatz zur Behandlung von *Postinfarkt*-Patienten ist der Einsatz von *in vitro* gezüchteten künstlichen Herzmuskelgeweben (*Engineered Heart Tissue*; EHT) aus neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) oder aus aus induziert-pluripotenten Stammzellen (iPSC) abgeleiteten menschlichen Kardiomyozyten auf Basis von Hydrogelen (vgl. 1.2.2). Das EHT wird dabei auf das infarzierte Myokardareal transplantiert. Die EHTs auf Basis von Hydrogelen sind ursprünglich für die *in-vitro*-Testung von Pharmaka und der Aufklärung zellulärer Mechanismen konzipiert worden (Eschenhagen et al. 1997). Die fortwährende Weiterentwicklung und Verbesserung des ursprünglichen Ansatzes ermöglicht mittlerweile den Einsatz von EHTs in der Gewebeersatz-Therapie bei Infarkt-geschädigten Herzen im Tiermodell. Tatsächlich konnten Studien hier zeigen, dass EHTs elektrisch mit dem Empfängerherz koppeln (Zimmermann et al. 2002; Furuta et al. 2006) und zur Verbesserung der systolischen und diastolischen Herzfunktion führen (Naito et al. 2006; Zimmermann et al. 2006). Außerdem entwickeln EHTs aus nativen Herzzellpopulationen interne Blutgefäßstrukturen, die sich an der Vaskularisierung beteiligen, indem sie sich mit vom Empfänger stammenden einsprossenden Blutgefäßen verbinden (Zimmermann et al. 2006, Shimizu-Arbeiten, bitte bei Hirt et al. Circ Res 2014 nachschauen). Bislang unklar ist, ob die Transplantationserfolge in Kleintiermodellen auf den Menschen übertragbar sind. Da sich die kardiale Physiologie der Menschen- und Rattenherzen sehr unterscheidet, wären menschliche Transplantate auf Rattenmodelle nicht sehr hilfreich. Zum einen ist die Herzfrequenz von Ratten 5- bis 10-fach höher als die Herzfrequenz von Menschen. Weiterhin werden unterschiedliche Aktionspotenziale in Ratten- und Menschenherzen generiert. Versuchstiere deren Herzphysiologie, dem der Menschenherzen ähnlicher sind, stellen z.B. Meerschweinchen dar. Weinberger et al. (2016) konnten in einer Transplantationsstudie an Meerschweinchen zeigen, dass die Transplantation von humanen-EHTs (*hEHT*), die Funktion infarzierter Meerschweinchen-Herzen wiederherstellen kann. Weinberger et al. (2016) haben Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnen und für die EHT-Generierung genutzt. Im Infarkt-Modell wurde daraufhin durch eine Kryoschädigung von 22% des linken Ventrikelwand ein Verlust der ventrikulären Funktion von 35% herbeigeführt. 7 Tage nach der Schädigung wurden jeweils zwei *6-well*-EHTs auf das Infarktareal transplantiert. Nach 28 Tagen konnte eine Remuskularisierung von 12% des infarzierten Bereichs beobachtet werden. Dabei wurde außerdem die ventrikuläre Funktion um 31% verbessert. Die Transplantationsstudie konnte neben der Funktionsverbesserung zeigen, dass die *hEHTs* mit dem gesunden *Host*-Myokard elektrisch koppeln und neue Blutgefäße ausbilden. Die Methode könnte eines Tages auch die kardiale Funktion des Menschen nach einem Herzinfarkt verbessern, jedoch müssen vorher einige Limitationen dieser Methode gelöst werden.

Ein Problem stellt dabei die Distribution einiger Zellen in das Lungen- und Milzgewebe der Versuchstiere dar. Dies wurde durch die Detektion humaner DNA in den jeweiligen Organen gezeigt. Des Weiteren stellt die Größe der EHTs nach wie vor eine Limitation dieser Methode dar. Denn bereits bei kleinen Meerschweinchen (Körpergewicht: 350-450 g) waren für die Transplantation zwei 6-well-EHTs (jeweils: 18 mm x 1,5 mm) notwendig, um die Herzfunktion nach dem Infarkt zu verbessern. Im Falle von Menschenherzen sind zwangsläufig sehr viel größere EHTs im cm²-Format notwendig.

1.2.3.4 Limitationen in der Gewebeersatztherapie durch EHTs

Das Ziel der Gewebeersatz-Therapie ist schlussendlich die Wiederherstellung der Herzfunktion beim Menschen nach einer Herzschädigung. Beim momentanen Stand der Forschung ergeben sich dabei Hürden, die weiterer Forschung bedürfen.

Die Transplantation von EHTs auf das native Herz von Menschen erfordert den Einsatz von humanen Herzgeweben. Die Erforschung alternativer Zellquellen zu den bisher verwendeten neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Herstellung von EHTs zeigte, dass menschliche Kardiomyozyten aus induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) in Frage kommen. Die iPSC haben theoretisch eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit und können sich zu Kardiomyozyten differenzieren (Kehat et al. 2001). Die Nutzung der iPSC-basierten Kardiomyozyten bedarf allerdings weiterer Forschung, da bisher ein tumorigenes Potential dieser Zellen nicht ausgeschlossen ist. Eine weitere Limitation ergibt sich aus der Größe der EHTs. Das Herz eines gesunden Menschen wiegt etwa 500 g und enthält $3.2 \times 10^9 \pm 0.75 \times 10^9$ Zellen (Bergmann et al. 2015). Ein großer Myokardinfarkt beim Menschen zerstört circa 30% des linken Ventrikels (LV). Ausgehend von einem LV-Gewicht von ca. 300 g mit $1,07 \times 10^9$ Kardiomyozyten, beträgt das zu ersetzende Areal mithilfe eines Patches circa 100 g Myokard mit $0,36 \times 10^9$ Zellen. Demzufolge müssen EHT-Formate auf mehrere cm² erweitert werden, um das Infarktareal am Menschenherzen abzudecken.

Bisherige Studien zeigten, dass die Vergrößerung von 3D-Konstrukten in ihrer Weite und Länge nicht limitierend ist, sondern die Herstellung von dickem Gewebe sich als kompliziert darstellt (Bian et al. 2009). Grund hierfür ist die mangelnde Vaskularisierung der EHTs. Während die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im nativen Herzen durch ein dichtes Gefäßnetz gewährleistet wird, beruht die Nähr- und Sauerstoffversorgung in den EHTs auf Diffusion. Hieraus resultiert, dass die innenliegenden Zellen größerer EHTs nicht ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden (Vollert et al. 2014). Dies führt zu vermehrtem Zellabsterben und resultiert in einer verminderten Kontraktionskraft. Weiterhin ist bekannt, dass nach der

Transplantation von EHTs native Blutgefäße in das Transplantat einwachsen und auf diese Weise die Nähr- und Sauerstoffzufuhr am EHT *in vivo* garantieren (Zimmermann et al. 2002; Shimizu et al. 2006). Jedoch ist dies ein langsamer Prozess, sodass die Periode vor der echten Vaskularisierung eine kritische Phase darstellt und zum vermehrten Zellabsterben im EHT führt.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die kardiale Gewebeersatztherapie am Menschen mithilfe von *in vitro* gezüchteten *Patches* erfordert u. a. die Herstellung großer EHTs, möglichst im cm²-Format. Bisherige Versuche, EHTs in größeren Formaten herzustellen, scheiterten an der Nähr- und Sauerstoffversorgung der EHTs, sodass bereits *in vitro* ein erhöhter Zelluntergang im EHT beobachtet wurde, welches in eine mangelnde Kontraktilität dieser resultierte.

Ziel dieser Arbeit war es, eine robuste Methode zur Herstellung von großen EHTs zu etablieren, deren Format (ideal: 70 x 70 x 7 mm³) für Transplantationsstudien am Mini-Schwein und später am Menschen geeignet wäre.

2. Material und Methoden

2.1 Hilfsmittel und Geräte

Bezeichnung	Firma
6-well Zellkulturschale	Nunc™
24-well Zellkulturschale	Greiner BioOne
Accu-jet® Elektrische Pipette	Brand
Analysenwaage	Sartorius
Any Video Converter Version 5.8.6	Anvsoft Inc.
`Aquariumbehälter` (1-well-Zellkulturschale)	Eigenproduktion
Avidemux 2.6.12	Avidemux
Axiovision Software Rel. 4,8	Zeiss
Basler Kamera acA 645-100gm	Basler
Biosphere® Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt AG
Glukose-Messgerät Contour XT	Bayer
CO ₂ /O ₂ -regulierbarer Inkubator	Sanyo
CTMV Physio Software	CTMV, Pforzheim
Deckgläser	Marienfeld
Digitalwaage Ohaus Precision Advanced	Ohaus
Einwegspritzen, Injekt 1/2/5/10/20 ml	Braun
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresesystem, Mini Protean 3	Bio-Rad
GraphPad Prism 5.02	GraphPad Prism Software Inc.
Kamera Zeiss AxioCam	Zeiss
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 800	Zeiss
Lichtmikroskop für Zellkultur Zeiss Stemi SV 6	Zeiss
Mikrowelle	Sharp
Mikrozentrifuge (5415 R)	Eppendorf AG
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht AG
Objektträger mit Vertiefungen	Thermo Scientific
Objektträger Superfrost, HistoBond®	Hecht Assistent
Pinzetten	Hammacher, Solingen

Material und Methoden

Pipetten (10 /100/1000 µl)	Eppendorf AG
Pipetten (serologisch; 1/2/5/10/25 ml)	Sarstedt AG
Polytron® Homogenisator	Kinematica
qPCR- System ABI Prism 7900 HT	Applied Biosystems
Reaktionsgefäße (0,2/1,5/2 ml)	Eppendorf AG
Reaktionsgefäße (15/50 ml)	Sarstedt AG
Rollschüttler Roller Mixer SRT1	Stuart
Sicherheitswerkbank Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik
Silikonschlauch	Fisher Scientific
Spritzenpumpe	B. Braun
Sterican Kanülen	B. Braun
Sterilfilter, Filtropur® S 0,2	Sarstedt AG
Varioklav® 75 S Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH
Videocamcorder DCR-PC330E PAL	SONY
Video-optisches-Messsystem	Eigenanfertigung
Vortex Reax 200	Heidolph

2.2 Chemikalien und Lösungen

Substanz	Firma	Katalognummer
10x DMEM	Gibco	52100
Agarose (Ultrapure™)	Invitrogen	16500500
Aprotinin	Sigma-Aldrich	A1153
Aqua ad injectabilia	Braun	202637
Bovines Fibrinogen	Sigma-Aldrich	F8630
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich	A9647
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, mit 1 g/l D-Glukose und 3,7 g/l NaHCO ₃ , ohne L-Glutamin mit Phenolrot)	Biochrom	F0415
Ethanol (≥96%)	Roth	T171.4
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	8043.2
Fluoromount-G	Southern Biotech	0100-01
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco	10437028
Gelatine	Difco™	214340
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368813
Insulin	Sigma-Aldrich	I9278
Natriumchlorid, NaCl	Braun	6063036
Penicillin/Streptomycin	Gibco	15140-122
Pferdeserum Hitze-inaktiviert	Gibco	26050
Phosphate-buffered saline (PBS)	Biochrom	14190
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
Roti-Histofix (Formaldehydlösung)	Roth	P087.5
Sylgard 184	Dow Corning	4019862
Thrombin, 100 U/ml (PBS, Aqua ad injectabilia)	Biopur	BP11101104

2.2.1 Antikörperübersicht für die Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper und Farbstoffe	Verdünnung	Firma, Katalog-Nr.
DRAQ5	1:1000	Biostatus Ltd., BOS-889-001-R050
Phalloidin	1:60	Invitrogen A-12379
Connexin 43 <i>monoclonal, mouse anti-rat</i>	1:200	BD Bioscience, 610061
Alexa Fluor® 546 <i>goat anti-mouse</i>	1:800	Invitrogen A-11003

2.2.2 Primerliste

Tabelle 2.2: Primer zur Analyse der 6w6p-Ratten-EHTs.

Gen*	Beschreibung	Primer Sequenz 5'->3' [Tm (°C)]	PPG (BP) **
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	For: CTCATGACCACAGTCCATGC [59,4] Rev: TTCAGCTCTGGGATGACCTT [57,3]	For: 273 Rev: 295
<i>Gusp</i>	β-Glucuronidase	For: CCCGCATGTCCCCAAGACGG [65,5] Rev: CGGCACGGAAGCTCCACAGG [65,5]	For: 223 Rev: 240
<i>18s</i>	18s rRNA	For: ATACATGCCGACGGGCGCTG [63,5] Rev: TTCGAATGGGTCGTGCGCCGC [63,5]	For: 236 Rev: 260
<i>Actc1</i>	Alpha-skeletales Actin	For: CTCCCAGCACCATGAAGATT [57,3] Rev: GTGTAAGGTAGCCGCCTCAG [61,4]	For: 281 Rev: 317
<i>Myh7</i>	Schwere Kette des beta-Myosin	For: CCTCGCAATATCAAGGGAAA [55,3] Rev: TAACAGGTGCATCAGCTCCAG [59,4]	For: 272 Rev: 262
<i>Myh 6</i>	Schwere Kette des alpha-Myosin	For: TATGAGACGGACGCCATACA [57,3] Rev: CACCATCAGGTCCTCGAZCT [59,4]	For: 285 Rev: 291
<i>Atp2a2</i>	SERCA2a	For: TGCTGGAAGTTGTGATCGAG [57,3] Rev: AGCGTTTCTCTCCTGCCATA [57,3]	For: 289 Rev: 328
<i>cTNNT2</i>	Cardiac muscle troponin T	For: AGAAGGCCAAGGAGCTATGG [59,4] Rev: TATTTCCAACGCCCGGTGAC [59,4]	For: 235 Rev: 256
<i>GJA1</i>	Gap junction alpha-1	For: CCTCCAAGGAGTTCCACCAA [59,4] Rev: ACCCCAAGCTGACTCAACAG [59,4]	For: 274 Rev: 271
<i>Ttn</i>	Titin	For: GGCCTCAAAGAAAATGTGGA [55,3] Rev: ACGGAAGTTTGGTCACGTC [57,3]	For: 226 Rev: 277
<i>Hif1a</i>	Hypoxie-induzierter Faktor	For: TGCTGAAGACACAGAAGCGAA [57,9] Rev: CATCAGTGGTGGCAGTTGCG [61,4]	For: 210 Rev: 255

*Alle untersuchten Gene beziehen sich auf RN (*Rattus Norvegicus*)

**PPG: PCR-Produkt-Größe

2.3 Zubehör für die EHT Generierung

Die Herstellung großer EHTs erforderte einige Veränderungen in der Größe und Geometrie der notwendigen Zubehöre. Diese Zubehöre u. a. *6-well-6-post-(6w6p)*-Silikonhalterungen und Teflonplatzhalter (*Spacer*) mussten in der institutseigenen Werkstatt hergestellt werden.

2.3.1 Silikonhalterung

Die Silikonhalterungen dienten zur Aufhängung der EHTs während der gesamten Kultur. Sie wurden von Hand hergestellt: Hierbei wurde ein Zweikomponenten-Elastomer der Firma *Dow Corning* (Sylgard 184, Dow Corning, USA), in einem Verhältnis 10:1 mit einem Polymerisationsstarter gemischt und mithilfe einer Teflongussform – ebenfalls in der institutseigenen Werkstatt hergestellt – in die gewünschte Form gebracht. Nach darauffolgender Entgasung zur Blasenentfernung und einer Polymerisationszeit von 72 Stunden bei 60 °C, konnte die Silikonhalterung aus der Teflongussform entnommen werden und mit insgesamt zwölf Silikonschläuchen (Silikonposts) mit gewünschter Silikonpostlänge (10 mm) und -dicke (Durchmesser 1,3 mm) versehen werden. Für eine bessere Haftung der EHTs an die Silikonposts wurden an der Unterseite der Silikonposts Silikontellerchen geklebt. Die Silikonhalterung war 79 mm lang und 39 mm breit. Jede Silikonhalterung umfasste Platz für zwei große EHTs mit einem Volumen zwischen 700 µl und 1600 µl. Die Abbildung 2.1 (links) zeigt die Abmessungen und Geometrien der Silikonhalterung (Dissertation Ingra Vollert 2013).

2.3.2 Teflonplatzhalter

Zur Herstellung der Agarosevertiefungen für die EHTs sind Teflonplatzhalter (*Spacer*) notwendig, die eine Agarosevertiefung in der flüssigen, warmen Agarose formen. Die *Spacer* wurden in der institutseigenen Werkstatt von Bülent Aksehrioglu gefräst. Die *Spacer* hatten zwei quaderförmige Ausstülpungen (Länge x Breite x Höhe: 25 mm x 15 mm x 13 mm; Abb. 2.1 rechts), die beim Auflegen der *Spacer* auf die Zellkulturschale 13 mm in die *wells* hineinreichten. Für den Wiedergebrauch wurden sowohl Silikonhalterungen, als auch Teflonplatzhalter zweifach mit demineralisiertem Wasser ausgekocht und bei gespanntem Dampf autoklaviert.

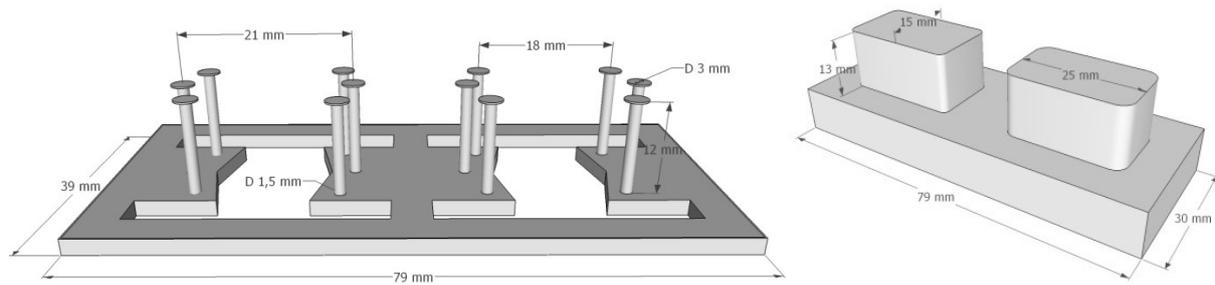


Abb. 2.1: Abmessungen und Geometrien der Silikonhalterung (links) und Spacer (rechts) für das 6w6p-Format (Ingra Vollert 2013). **Cave:** Die Maße der für diese Arbeit verwendeten Silikonposts und der Durchmesser der Silikontellerchen sind anders als in der Abbildung dargestellt (siehe oben).

2.4 Methoden der Zellkultur

2.4.1 Isolation von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Für die Organentnahme und anschließende Isolation von Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten (NRCM) wurde ein in unserem Institut standardisiertes Protokoll von unseren Technischen Assistenten June Übelers und Thomas Schulze angewendet. Hierbei wurden 0-3 Tage alte Wistar-Ratten zunächst dekapitiert und das Herz unter sterilen Bedingungen mit dem Gefäßstiel entnommen. Die Herzen wurden daraufhin auf eine sterile Petrischale mit sterilem, eisgekühltem CBFHH-Puffer (34,2 mM CaCl_2 , 5,4 mM KCl, 0,81 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,34 mM NaH_2PO_4 , 5,6 mM Glucose, 20 mM HEPES pH 7,4) überführt. Im weiteren Verfahren wurden die Kammern von dem Gefäßstiel und den Vorhöfen getrennt, wobei die Vorhöfe und der Gefäßstiel verworfen wurden. Nach anschließender Zerkleinerung der Kammern mithilfe steriler Pinzetten und Scheren und mehrmaligem Waschen, wurde das Gewebe schließlich mithilfe eines enzymatischen Trypsin/DNase-Auflösungsverfahrens, modifiziert nach Webster et al. (1993), verdaut. Abschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung der Suspension in Neubauer-Zählkammern. Die auf Eis gelagerten Kardiomyozyten, wurden unmittelbar nach der Isolation zur Generierung von EHTs verwendet.

2.4.2 Generierung von soliden 6w6p-EHTs

Für die Herstellung der 6w6p-EHTs wurde eine im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie etablierte Methode zur Herstellung von *Fibrin-based-24-well-EHTs* (Hansen et al. 2010a) genutzt und für die Generierung von 6w6p-EHTs abgewandelt.

Die 6w6p-EHTs umfassten ein Volumen von 1350 μl mit den Maßen 25 mm x 15 mm x 3,6 mm (Länge x Breite x Höhe). Es wurden zwei unterschiedliche 6w6p-EHT-Gruppen hergestellt, zum einen die solide Kontrollgruppe und zum anderen eine Porengruppe (Interventions-Gruppe), wobei die Poren der EHTs in der Interventionsgruppe auf unterschiedliche Weise generiert wurden, deren Technik im Ergebnisteil näher erläutert wird (vgl. 3.1). Für die Herstellung der Kontroll-EHTs wurden zunächst Agarosevertiefungen in eine 6-well-Kulturschale (Nunc™) generiert. Als formbarer Boden für die Agarosevertiefung diente dabei eine 2%ige Agaroselösung. Die Agaroselösung wurde hergestellt, indem ein Agarosepulver (Invitrogen) in PBS (Biochrom) gelöst und im Autoklaven sterilisiert und erhitzt wurde. Nach der Herstellung wurde die Agaroselösung für den gewünschten flüssigen Aggregatzustand bei 60 °C gelagert. Im weiteren Verlauf wurde eine 6-well-Kulturschale zunächst mit 5 ml der 60 °C heißen Agaroselösung befüllt. Daraufhin wurde ein Spacer in der noch flüssigen Agaroselösung positioniert. Nach einer zehnminütigen Abkühlphase der Agaroselösung bei Raumtemperatur wurde die Agarose fest, sodass nach Entfernen der Spacer, die gewünschte rechteckige Gussform in der festen Agarose verblieb. Die entstandene Agarosevertiefung umfasste ein Volumen von 25 mm x 15 mm x 4 mm. In diese Gussform wurde eine 6-well-Silikonhalterung mit je sechs Silikonposts *pro well* eingesetzt. Jede Silikonhalterung war 79 mm lang, 39 mm breit und umfasste Platz für zwei große EHTs mit einem Volumen von $\leq 1500 \mu\text{l}$. Die EHTs hingen dabei jeweils zwischen sechs 10 mm langen Silikonposts mit einem Durchmesser von jeweils 1,3 mm.

Nachdem die Silikonhalterung in der Agarosevertiefung positioniert war, wurde der sogenannte Mastermix bestehend aus Zellsuspension, 2xDMEM, Fibrinogen und Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) in die Agarosevertiefung zwischen den Silikonposts der Silikonhalterung pipettiert. Die Herstellung des Mastermix erfolgte unter sterilen Bedingungen (*Laminar Flow* Werkbank) auf Eis. Das Volumen des Mastermix wurde in Abhängigkeit von der Zellzahl und des gewünschten EHT-Volumens berechnet. Für die Herstellung der 6w6p-EHTs mit einem Volumen von 1350 μl und einer Zellzahl von 6×10^6 Zellen wurde folgender Mastermix angesetzt:

Mastermix für die Herstellung eines 6w6p-EHTs:

Zellsuspension	6 x 10 ⁶ Zellen
2x DMEM*	84 µl
Bovines Fibrinogen	37,5 µl
Nicht-Kardiomyozyten-Medium **	ad 1350 µl

*2xDMEM: 2% Penicillin/Streptomycin, 20% 10xDMEM, 20% inaktiviertes Pferdeserum, q.s. Aqua ad injectabilia

**Nicht-Kardiomyozyten-Medium: 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, q.s. DMEM

Der Mastermix wurde sorgfältig homogenisiert, mit 40,5 µl Thrombin einer 100 U/ml Thrombinlösung vermischt und in die Agarosevertiefung zwischen die Silikonposts pipettiert. Die Zellkulturschale wurde daraufhin für zwei Stunden bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ im Inkubator (Sanyo) für die Polymerisation des Fibrinhydrogels und somit Einbettung der Kardiomyozyten in die dreidimensionale Fibrinmatrix inkubiert. Um die Entnahme der EHTs aus der Agarosevertiefung zu erleichtern, wurde jedes EHT nach der zweistündigen Inkubationszeit mit vorgewärmtem-DMEM (37 °C) überschichtet und für weitere 30 min in den Inkubator gestellt. Schließlich konnten die EHTs aus der Agaroseform entnommen werden und in eine neue Zellkulturschale mit 8 ml EHT-Medien überführt werden.

2.4.3 Herstellung von porösen 6w6p-EHTs

Die Etablierung der Methodik zur Herstellung von porösen 6w6p-EHTs war ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit und wird daher unter 3.1 des Ergebnisteils detailliert beschrieben.

2.4.4 Kultivierung der EHTs

Die EHTs wurden nach der Herstellung für 21 Tage im Inkubator bei 37 °C, 7% CO₂ und 40% O₂ kultiviert. Dreimal in der Woche – montags, mittwochs und freitags – wurde frisches EHT-Kulturmedium (siehe unten) angesetzt und das Medium ausgewechselt. Zwischen dem vierten und fünften Inkubationstag konnten mikroskopische Kontraktionen der EHTs beobachtet werden, die zwischen dem siebten und neunten Tag kohärent kontrahierten und makroskopisch eine Deflektion der Silikonposts bewirkten. Die finale Kontraktionsmessung (3.2.2) erfolgte vier Stunden nach dem letzten Mediumwechsel am 21. Inkubationstag. Alle

Schritte von der Herstellung der Agarosevertiefungen bis zur letzten Kontraktionsmessung am 21. Tag erfolgten unter sterilen Bedingungen. Das EHT-Kulturmedium wurde folgendermaßen zusammengesetzt:

EHT-Kulturmedium

Aprotinin	0,1%
Humaninsulin	0,1%
Penicillin/Streptomycin	1%
Inaktiviertes Pferdeserum	10%
DMEM	(mit 1 g/l D-Glukose, 3,7 g/l NaHCO ₃) q.s.

2.5 Analyse der Kontraktilität von EHTs

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war der objektive Vergleich der Kontraktilität von soliden- und porösen EHTs. Hierfür wurden unterschiedliche Methoden verwendet, um die EHT-Kontraktionskraft zu quantifizieren. Im Folgenden wird zum einen die Kontraktionskraftmessung mittels einer video-optischen-Messapparatur und zum anderen die Kontraktionskraftmessung mittels manueller Ausmessung der *Post-Deflektion* mithilfe der Software *ImageJ* beschrieben. Beide Methoden beruhen auf der von Vandenburg et al. (2009) publizierten Formel zur Kontraktionskraftmessung (Abb. 2.2).

2.5.1 Messapparatur zur video-optischen Analyse

Die video-optische-Methode zur Kontraktionsmessung großer EHTs basierte auf einer im Institut für Pharmakologie und Toxikologie entwickelten Messapparatur zur Kontraktionsmessung von 24-*well*- EHTs (Hansen et al. 2010). Dabei wurden die Parameter Kontraktionskraft, Kontraktionszeit, Relaxationszeit und die Frequenz der schlagenden EHTs gemessen. „[...] Diese Messapparatur bestand aus einer Zellkulturschrank-ähnlichen Einheit, in der Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie die Gaszusammensetzung regulierbar waren. Der Deckel dieser Einheit bestand aus einer Glasplatte, über der sich eine Basler-Kamera befand, welche an einem x-y-z-System montiert und über einen PC ansteuerbar war. Als Lichtquelle für die einzelnen EHTs dienten Leuchtdioden LEDs, die unter jedem *well* angebracht waren. Die Beleuchtung wurde mit der Aufnahme synchronisiert, um ein Erwärmen des Mediums

durch dauerhafte Lichteinwirkung zu vermeiden [...]“ (Dissertation Nils Sörensen 2013). Die Kamera zeichnete nacheinander von jedem EHT ein Video in der gewünschten Dauer auf (30 Sekunden) und die Software errechnete anhand eines Figur-Erkennungsalgorithmus die Parameter Kontraktionskraft, Kontraktionsgeschwindigkeit, Relaxationsgeschwindigkeit und die Frequenz der schlagenden EHTs. Die Ergebnisse wurden daraufhin in einem Report im *PDF*-Format zusammengefasst wiedergegeben. Im Einzelnen erkennt die Software dabei die Silikontellerchen (Silikontellerchen-EHT-Übergang) an den Enden der EHTs und verfolgt die kontraktionsbedingte Positionsänderung dieser Silikontellerchen während der Kontraktionen. Aus der Positionsänderung der Silikontellerchen und somit der *Post*-Deflektion kann die Software vollautomatisch die Kontraktionskraft mithilfe der im System eingespielten Formel berechnen. Die der Berechnung zugrundeliegende Formel ist die von Vandenburg et al. (2009) publizierte Formel zur Berechnung der Kontraktionskraft (Abb.2.2).

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

F: Resultierende Kraft

E: Elastizitätsmodulus des Silikons

I: Trägheit des Silikons

δ : Ablenkung der Silikonposts

L: Länge der Silikonposts

R: Radius der Silikonposts

π : Kreiszahl

Abb. 2.2: Vandenburg'sche Formel zur Berechnung der Kontraktionskraft (Vandenburg et al. 2009).

Im *Offline*-Modus der Software war auch eine Nachbearbeitung einzelner Messungen durch die Software möglich. Dabei konnten die Messpunkte an den EHT-Enden manuell gesetzt werden, wenn diese vorher automatisch nicht richtig erfasst worden waren.

Die Messapparatur war ursprünglich konzipiert worden, um Messungen an kleinen EHTs im *24-well*-Format vorzunehmen. Die Messungen an größeren *6-well*-EHTs erwies sich als schwierig, denn trotz der Möglichkeit zur individuellen Positionierung der Erkennungspunkte, war es nicht möglich, die Position der Erkennungspunkte für große EHTs zu setzen, da die Inkubator-Einheit des Messsystems nicht mit *6-well*-Kulturschalen kompatibel und aufgrund der fixen Position der LEDs eine gute Ausleuchtung der großen EHTs nicht möglich war. Für die Messung der Kontraktionskraft großer EHTs war es folglich notwendig, die Messapparatur zu überlisten. Dazu generierten wir zunächst gut ausgeleuchtete Aufnahmen des kontrahierenden EHTs mit dem Lichtmikroskop (Zeiss, Stemi SV 6). Danach machten wir uns den *Offline*-Modus der Software zu Nutze und spielten unsere EHT-Videoaufnahmen in die

Datenbank der Messapparatur ein, sodass die Software das extern aufgenommene Video als eine Eigenaufnahme deutete. Damit das Video von der Software als Eigenaufnahme erkannt werden konnte, mussten die Videos mithilfe von Videokonvertierungsprogrammen zunächst in das von der CTMV-Software erkennbare und auswertbare Format konvertiert werden. Dabei nutzten wir die Software 'AnyVideoConverter Version 5.8.6' und konvertierten zunächst die Videos, die eine Dauer von 20-30 Sekunden hatten, in das folgende Format:

AnyVideoConverter Version 5.8.6 Konvertierung:

Videoformat:	AVI-Videodatei
Videogröße:	640/480
Datenrate:	64000 kBit/s
Einzelbitrate:	100 fps
Codec:	MPEG 4
Audio Codec:	Mp3
Abtastrate:	44100 Hz
Audio-Bitrate:	128 kBit/s
Audio-Kanäle:	2

Die Änderung der Einzelbitrate (Framerate; Bildfrequenz) musste aus unerklärlichen Gründen mit einer zusätzlichen Software erneut auf 100 *fps* (*Frames per Second*) eingestellt werden. Hierfür wurde die Software 'Avidemux 2.6' verwendet.

Nach dem Konvertieren des Videos in das erforderliche Format, wurde das Video in den *Offline*-Ordner der CTMV-Software (*Consulting Team Machine Vision*) in den gewünschten *Run* eingefügt. Damit das externe Video von der Software als Eigenproduktion erkannt wurde, musste es ein zuvor aufgenommenes Video in dem gewählten *Run* ersetzen. Hierfür war es notwendig, das Video in ein zuvor aufgenommenes Video in dem *Run* umzubenennen (Beispielsweise: 2016_01_21_1403_A1) und das alte Video durch das neu konvertierte Video zu ersetzen.

Die Aufnahme war daraufhin in der *Offline*-Analyse der Software in dem obigen Beispiel im *Run* vom 21.01.2016 auf der *well*-Position 'A1' abrufbar. Im *Offline*-Modus der Software wurden daraufhin die Erkennungspunkte manuell an den EHT-Enden – am Übergang zwischen Silikontellerchen und EHT – gesetzt und eine *Sample Review*-Analyse gestartet. Die Ergebnisse der Messung wurden nun im *PDF*-Format zusammengefasst und waren im *Offline*-Ordner des ausgewählten *Runs* abrufbar.

Da die Messapparatur die Vandenburg'sche Formel zur Kontraktionsberechnung nutzte, waren in der Software bereits die Daten für die *24-well-Silikonposts* eingespielt. Für die Berechnung der Kontraktionskraft der größeren EHTs mussten die Daten bezüglich des Elastizitätsmoduls, der *Post*-Länge und des *Post*-Radius auf die *Silikonposts* der *6-well*-EHTs umgestellt werden (siehe Bestimmung des Elastizitätsmoduls im Ergebnisteil 3.2.1). Des Weiteren konnte durch die Software lediglich die Kontraktionskraft zwischen zwei gegenüberliegenden *Posts* gemessen werden, sodass im Falle der *6-Post*-EHTs die Kontraktionskraft drei Mal zwischen jeweils zwei gegenüberliegenden *Posts* gemessen wurde. Dies setzte voraus, dass die Aufnahme der EHT-Kontraktion eine einwandfreie Sicht auf alle an der Kontraktion beteiligten *Posts* ermöglichte. Die Summe der drei Messungen ergab die Kontraktionskraft des gesamten EHTs. In Einzelfällen wurde aufgrund mangelnder Sicht auf alle *Posts*, die *Post*-Deflektion auch zwischen zwei *Posts* gemessen und mit drei multipliziert, da die Auslenkung aller *Posts* (innerhalb eines EHTs) stets vergleichbar war.

2.5.2 Kontraktionsmessung mittels ImageJ

Die Kontraktionsmessung mittels der Software *ImageJ* basiert ebenfalls auf der Vandenburg'schen Formel zur Kontraktionskraftberechnung. Bei dieser Methode erfolgt die Messung der *Post*-Deflektion manuell, d.h. das aufgenommene Video wurde zunächst mithilfe der Software *VirtualDub* in eine *segmentedAvi*-Datei umgewandelt. Hierbei wurde die Videodatei in viele Einzelbilder (100-200 Bilder) aufgetrennt. Diese Einzelbilder wurden daraufhin mit der Software *ImageJ* geöffnet und der Abstand zwischen den *Posts* während der Diastole und Systole gemessen. Die Differenz der beiden Werte ergab die *Post*-Deflektion der beiden *Posts*. Mithilfe der Vandenburg'schen Formel konnte dann aus der *Post*-Deflektion die Kontraktionskraft berechnet werden (Abb. 2.2). Zur Kalibrierung des Maßstabsbalkens diente dabei der Durchmesser der Silikontellerchen, die an den *Posts* angebracht waren und im Video gut darstellbar waren.

2.6 Histologie

2.6.1 Fixierung, Paraffineinbettung und Schneiden

Für die histologische Analyse wurden die EHTs in Kooperation mit dem Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (*HEXT Core Facility* für Mauspathologie) verarbeitet. Im Einzelnen wurden die EHTs am 21. Inkubationstag zunächst in PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C in Histofix® (Roth) fixiert. Am nächsten Tag wurden die EHTs von den Silikonhalterungen geschnitten. Dabei wurde standardmäßig stets

das Gewebe zwischen den *Posts* gewonnen und in *TBS* (*Tris-buffered saline*) mit Natriumazid gelagert. Im Institut für die Pathologie erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe:

Dehydrierungszyklus:

70% Ethanol	30 min
80% Ethanol	30 min
96% Ethanol	75 min
100% Ethanol	120 min
Xylol	240 min
Paraffin	330 min

„[...] Im letzten Schritt der Entwässerung wurden die Gewebe in 41 °C warmes Paraffin getaucht. Mithilfe einer Paraffinausgießstation (Leica© EG1150H) wurde der Boden vorgewärmter Metallformen mit flüssigem Paraffin bedeckt und die Gewebestückchen exakt darin platziert. Es wurden Gewebe senkrecht eingebettet, um Querschnitte sowie waagrecht, um Längsschnitte zu erzeugen. Nach Aufsetzen eines Einbettrings wurde die gesamte Form mit Paraffin aufgefüllt und zum Abkühlen auf eine Kühlplatte (Leica© EG1150C) gestellt. Als Paraffinblock konnten die Proben mehrere Wochen aufbewahrt werden. Um Schnitte anzufertigen, wurden die Paraffinblöcke aus ihren Formen herausgelöst, mit der Schneidefläche nach unten auf einer Kühlplatte bei -5 °C durchgekühlt und in ein Rotationsmikrotom (Leica© RM2125 RTS) eingespannt. Es wurden 4 µm dicke Schnitte erzeugt, die in ein 45 °C warmes Streckbad überführt wurden. Hier dehnte sich das Paraffin aus und es war möglich, einen faltenfreien Schnitt auf SuperFrost® Plus Objektträger aufschwimmen zu lassen.“ (Dissertation Nils Sörensen 2013)

2.6.2 Hämatoxylin-Eosin (HE)

„Übersichtsfärbungen der EHTs erfolgten mit der Standard Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin. Hämatoxylin, ein farbloser Inhaltsstoff des Blauholzes (*Hämatoxylon campechianum*), wird nach Oxidation (Hämätein) und Zusatz mehrwertiger Kationen zum charakteristisch dunkelblau-violett gefärbten Hämalaun. Die Chelatbindung der Kationen an die anionischen Zellkernstrukturen (z.B. Phosphatgruppen der Nukleinsäuren) führt in saurer Lösung zur blauen Kernfärbung histologischer Präparate. Eosin (Tetrabromfluoreszein-Natrium) ist ein synthetischer Farbstoff, der das Cytoplasma und extracytoplasmatische Strukturen (z.B. Kollagen) in leicht saurer Lösung rosa färbt.

Material und Methoden

Vor der eigentlichen Färbung der Paraffinschnitte wurden die Präparate zunächst mit Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanolreihe bei Raumtemperatur rehydriert. Die Färbung der Präparate erfolgte nach Standardprotokoll in einem Färbeautomat des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Tissue-Tek Prisma, Sakura Finetek USA Inc.). Um die Entparaffinierung zu optimieren und das Paraffin ablaufen zu lassen, wurden die Schnitte vor der Bestückung des Automaten für mindestens 20 min bei 60 °C im Wärmeschrank schräg lagernd inkubiert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbeprotokoll:

1.	Xylol	<u>1:30 min</u>
2.	Xylol	<u>1:30 min</u>
3.	Xylol	<u>2:20 min</u>
4.	100% Ethanol	<u>1 min</u>
5.	96% Ethanol	<u>1 min</u>
6.	80% Ethanol	<u>1 min</u>
7.	Hämatoxylin (Mayer)	<u>2 min</u>
8.	Hämatoxylin (Mayer)	<u>2 min</u>
9.	Fließendes Wasser („Bläuen“)	<u>5 min</u>
10.	Eosin 0,2%	<u>2 min</u>
11.	Fließendes Wasser („Bläuen“)	<u>1 min</u>
12.	80% Ethanol	<u>1 min</u>
13.	96% Ethanol	<u>1 min</u>
14.	100% Ethanol	<u>1 min</u>
15.	Xylol	<u>1:30 min</u>

Anschließend erfolgte die automatische Eindeckelung der Präparate (Tissue-Tek Film, Sakura Fintek USA Inc.). Die Betrachtung, Analyse und Dokumentation der histologischen Präparate erfolgte schließlich an einem Lichtmikroskop (Zeiss-Axioplan IM-35, Zeiss) mit Kamera (Zeiss-Axiocam) unter Verwendung der Axiovision-Software Rel. 4.8 (Zeiss).“ (Dissertation Ingra Vollert 2013).

2.6.3 Dystrophin-Färbung

„Der Nachweis des sarkolemmalen Proteins Dystrophin in den Kardiomyozyten der EHTs erfolgte mittels indirekter immunhistochemischer Färbung in einem Vollautomaten (Ventana BenchMark XT, Ventana Medical Systems Inc.) im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (HEXT *Core Facility* für Mauspathologie [...]). Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Paraffinschnitte in *Cell Conditioning 2 Solution* (Ventana Medical Systems Inc.) vorinkubiert (60 min). Dieses sogenannte *antigen retrieval* hatte den Zweck, eine eventuelle Maskierung der Antigene durch die Paraffineinbettung zu vermindern. Anschließend erfolgte die Inkubation in der Primärantikörperlösung mit dem monoklonalen murinen Anti-Dystrophin-Antikörper (MAB1645, *clone* 1808, Milipore) für 1 h in einer Verdünnung von 1:200. Die Markierung erfolgte mit einem Anti-Maus Immunoperoxidase Polymer Sekundärantikörper (Histofine® Simple Stain MAX PO, Nichirei Biosciences). Zur Detektion wurde 3,3'-Diaminobenzidin (Universal DAB Detection Kit, Ventana Medical Systems Inc.) genutzt. Eine Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Nach der Färbung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (96%, 100% je 2 × 2 min; Roti-Histol® 3-5 min) dehydriert und schließlich mit Eukitt® (O. Kindler) unter Deckgläsern eingeschlossen.“ (Dissertation Ingra Vollert 2013)

2.6.4 Die Immunfluoreszenzfärbung von 6w6p-EHTs

Zur weiteren histologischen Untersuchung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung der 6w6p-EHTs am 21. Inkubationstag. Dabei wurden die EHTs im Ganzen gefärbt und betrachtet (*whole-mount*). Sie wurden zunächst über Nacht mit Histofix® (Roth) fixiert und am darauffolgenden Tag mit *TBS* gewaschen. Passend zur Vertiefung der im weiteren Verlauf verwendeten Objektträger, wurden die EHTs mit einem Skalpell in kleinere Querstücke geschnitten. Anschließend folgte die Inkubation der EHT-Querschnitte in einer Blocklösung (aktives fötales Kälberserum 10%, bovines Serumalbumin 1%, *TBS* 0,05 M (pH 7,4) und Triton X-100 0,5%) auf einem Rollschüttler bei 4 °C für 24 Stunden, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach dem 'Blocken' wurden die EHT-Querschnitte in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Antikörperlösung gegeben und der Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung hinzugegeben (siehe Tabelle 2.1). Nach erneuter Inkubation unter den obigen Bedingungen erfolgte am nächsten Tag die wiederholte Waschung der EHTs mit PBS und schließlich wurde der Sekundärantikörper oder direkte Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in Antikörperlösung hinzugegeben (Abb. 2.2.1). Es erfolgte die erneute Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Rollschüttler. Am nächsten Tag wurden die EHTs lichtgeschützt mehrfach gewaschen und schließlich mit dem nicht-fluoreszierenden Eindeckmedium Fluoromount-G® (Southernbiotech) auf Objektträger mit einer kleinen

Vertiefung (Carl Roth) eingedeckt und am konfokalen Laser-Mikroskop (Zeiss, LSM 510 META) untersucht.

2.6.5 Zellzahl und Zellgrößenbestimmung

Für die Zellzahl- und Zellgrößenbestimmung der EHTs wurden Dystrophin-gefärbte 6w6p-EHTs im Querschnitt verwendet. Für die bessere Darstellung der Zellen erfolgte die Bildbearbeitung der Mikroskop-Aufnahmen mit der Software *ImageJ*. Dabei wurden Hintergrundgeräusche subtrahiert, das Bild in ein 8bit Format umgewandelt und die Bildschärfe und -helligkeit angepasst. Mithilfe von *ImageJ* (*Analyze* → *Tools* → *ROI Manager*) wurden per Hand alle sichtbaren Zellen (jeglicher Größe) der unterschiedlich hergestellten EHTs markiert (Abb. 2.3).

In Anlehnung an vorangegangene Techniken zur Zellquantifizierung (Hirt et al. 2012, Vollert et al. 2014) gingen in die Wertung jedoch ausschließlich Zellen mit einer Zellgröße von $>40 \mu\text{m}^2$ (Radius $>6,37 \mu\text{m}$) ein, um Artefakte und Zellfortsätze, am Rand getroffener Kardiomyozyten weitestgehend nicht in die Wertung aufzunehmen.

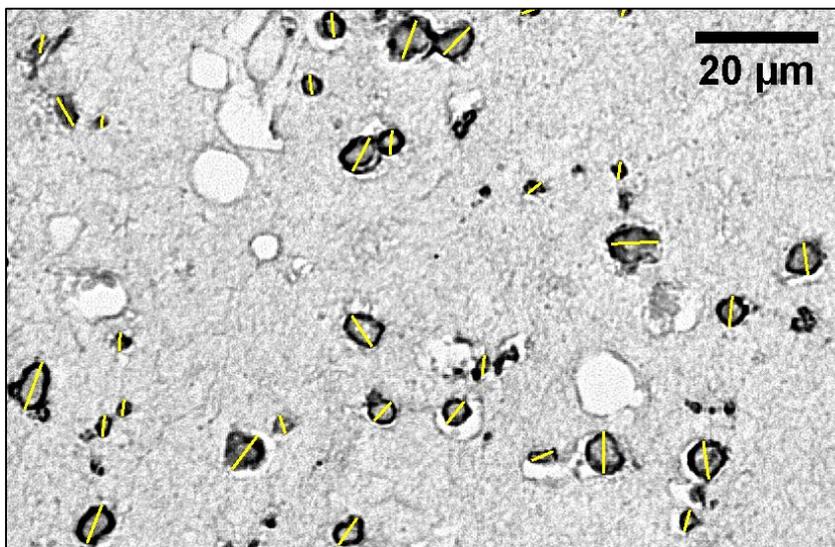


Abb. 2.3: Dystrophin-gefärbtes 6w6p-Teflon-EHT im Querschnitt. A: 40x Vergrößerung. Exemplarische Darstellung der markierten Zellen und die Ausmessung der Querschnitte zur Zellgrößenbestimmung in Gelb mit der Software *ImageJ*. Bei der Auswertung wurden Zellen mit einem Zelldurchmesser ab $6,37 \mu\text{m}$ berücksichtigt.

2.7 Molekularbiologie

2.7.1 RNA Isolation

Zur Gewinnung und Aufreinigung der RNA aus den *6w6p*-EHTs wurde das *RNeasy Kit* (Qiagen) nach Herstellerempfehlung verwendet. Dabei wurde das zu untersuchende Gewebe zunächst mit *PBS* gewaschen und von den Silikonhalterungen geschnitten, sodass ausschließlich das Gewebe zwischen den *Posts* verwendet wurde. Laut Herstellerempfehlung sollte die zu untersuchende Gewebeprobe 30 mg nicht überschreiten, sodass es notwendig war die großen *6w6p*-EHTs zunächst in <30 mg große Stückchen zu schneiden. Die Gewebe wurden jeweils in 2 ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt. „[...] Es wurde zunächst in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, aus RNeasy® Mini) und 20 µl Proteinase K (Qiagen) aufgenommen und bei 56 °C für 20 min bei Bewegung (350 rpm) inkubiert. Der Proteinase K-Verdau war für eine saubere Extraktion obligatorisch, da die erheblichen Proteinmengen Fibrinmatrix sonst die Säule verstopfen hätten. Anschließend wurde das Homogenat mit einer 100 µl Pipettenspitze trituriert und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden weitere 10 µl Proteinase K hinzugefügt und die Proben bei 56 °C und Bewegung (350 rpm) für 10 min verdaut. Im Anschluss wurde jede Probe durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml Spritze durch eine sterile 23 G (0,6 mm) Kanüle homogenisiert. Die nun folgenden Arbeitsschritte wurden an einer Arbeitsbank durchgeführt, die ausschließlich für RNA-Arbeiten genutzt wird und es wurden ausschließlich originalverpackte Verbrauchsmaterialien verwendet. Dadurch sollten Verunreinigungen durch ubiquitär vorkommende RNAsen verhindert werden. Zu jeder Probe wurden nun 350 µl Ethanol hinzugegeben und solange durchmischt, bis die Schlieren verschwunden waren. Danach wurde der gesamte Inhalt auf die Zentrifugationssäulen (RNeasy® Mini Spin Column, Qiagen, aus RNeasy® Mini) gegeben und bei 16200 g für 30 s zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer (Qiagen, aus RNeasy® Mini) auf die Säule pipettiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 16200 g für 30 s zentrifugiert, das Eluat wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt. Nun wurden zweimal nacheinander je 500 µl RPE-Puffer (Qiagen, aus RNeasy® Mini) auf die Säulen gegeben und für 30 s zentrifugiert und das Eluat verworfen. Anschließend wurden die Säulen in neue 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt bei 16200 g für 1 min zentrifugiert. Zuletzt wurden die Säulen in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 2 mal mit 20 µl RNase-freiem H₂O für 10 min inkubiert, danach 1 min mit 16200 g zentrifugiert. Das Eluat enthielt die Gesamt-RNA des eingesetzten Gewebes und konnte bei -80 °C gelagert werden. [...]“ (Dissertation Nils Sörensen 2013).

2.7.1.1 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren wurde photometrisch mit dem Nanodrop™-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific® Inc.) ermittelt. Dabei entsprach eine optische Dichte (OD) von 1, einer Nukleinsäure-Konzentration von 40 µg/ml. Als Reinheitskontrolle für die Nukleinsäuren wurden gleichzeitig die OD bei 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) sowie 230 nm (Absorptionsmaximum von organischen Salzen und Phenolaten) bestimmt und die Quotienten OD 260/OD 280 bzw. OD 260/OD230 gebildet. Ein Wert zwischen 1,8 - 2 legte eine geringe Kontamination der Nukleinsäure nahe.

2.7.1.2 Reverse Transkription

Die *Reverse Transkription* ist die Umkehrung der Transkription. Dabei erfolgt die Umwandlung einer Sequenzabfolge einer RNA in eine komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA). Der Reaktionsablauf wird vom Enzym `reverse Transkriptase` katalysiert.

Die zuvor gewonnene RNA (siehe oben) wurde mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) in die gewünschte cDNA umgewandelt. Dabei erfolgten alle Schritte gemäß Herstellerangaben. Es wurde jeweils 100 ng der RNA und Oligonucleotide für die Umwandlung eingesetzt. Als Primer wurden die mitgelieferten *random* RT-Primer des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* eingesetzt. Der Ablauf der *reversen* Transkription im PCR-Cycler startete mit einer Initiationsphase bei 25 °C für 10 Minuten, darauf folgte die *Reverse Transkription* bei 37 °C für 120 Minuten und abschließend die Denaturierung bei 85 °C für weitere 5 Minuten. Am Ende der Reaktion wurde 25 µl cDNA gewonnen. Der genaue Reaktionsansatz der Reverse Transkription wird im Folgenden angegeben.

Reaktionsansatz Reverse Transkription:

2,5 µl 10x RT Puffer

1,0 µl 25x dNTP Mix

2,5 µl 10x *random* RT-Primer

1,0 µl OneStep RT-PCR Enzyme Mix

0,25 µg Gesamt-RNA

ad 25 µl Nuklease-freies Wasser

2.7.1.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR erfolgte nach demselben Protokoll wie in der Dissertation von Nils Sörensen (2013) beschrieben. „[...] Die anschließende quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qPCR) wurde mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems®) laut Herstellerhandbuch durchgeführt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruhte auf der Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes (*SYBR Green®*, Applied Biosystems; verwendet nach Herstellerempfehlung), welcher in doppelsträngige DNA interkaliert [...]“ (Dissertation Nils Sörensen 2013). Die cDNA wurde mittels spezifischer Primer bei jedem PCR-Zyklus amplifiziert und das Fluoreszenzsignal stieg dadurch stetig an. Bei der Austestung von Genen, zeigte sich aus vorangegangenen Messungen, dass die ribosomale Untereinheit 18s den geringsten Expressionsschwankungen ausgesetzt war, sodass es für unsere Versuche als interner Standard verwendet wurde. „[...] Die für alle Proben gleiche eingesetzte Menge cDNA und 18s-rRNA als interner Standard ermöglichten eine sichere Quantifizierung der Expressionssignale. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software* (Applied Biosystems®) analysiert. Die Transkript-Menge wurde über den Vergleich der Ct-Werte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Die Ct-Werte des internen Standards (18s-rRNA) wurden von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert (ΔCt). Der Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen ΔCt -Wert der Interventionsgruppe abgezogen, wodurch die $\Delta\Delta Ct$ -Werte berechnet werden konnten. Die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel zeigte nun den relativen Transkript-Gehalt bezogen auf die Kontrolle an. Die beiden Normalisierungsschritte, gleiche Menge cDNA für alle Proben und 18s-rRNA als interner Standard, ermöglichten dabei eine zuverlässige Quantifizierung der Transkriptkonzentrationen. [...]“ (Dissertation Nils Sörensen 2013). Der Reaktionsansatz für die qPCR betrug 10 μ l. Darin enthalten waren 5,0 μ l *SYBR Green®* Mastermix, 0,5 μ l *forward/reverse* Primer-Pool, 2,5 μ l cDNA und der Rest wurde mit *Nuklease-freies Wasser* aufgefüllt.

Zyklen	Zeit	Temperatur	Beschreibung
1	2 Minuten	50 °C	Initialisierung der Polymerase
	10 Minuten	95 °C	
40	15 Sekunden	95 °C	Denaturierung
	1 Minute	60 °C	Primeranlagerung, Elongation
1	5 Minuten	85 °C	Dissoziationsphase

Abb. 2.4: Ablauf der qPCR (Dissertation Nils Sörensen 2013)

2.7.2 Isolation von DNA

Die DNA-Isolation erfolgte mittels Trizol®-Auftrennung. Hierfür wurde das empfohlene Protokoll des Herstellers wie folgt angepasst: Zunächst wurden die EHTs zu kleineren Proben von 50-100 mg geschnitten – dabei wurde stets aus zentralen EHT-Bereichen die Probe entnommen – und 1 ml Trizol® hinzugegeben. Mit Kanülen unterschiedlicher Durchmesser und Größe (20G und 10G) wurde das Gewebe zerkleinert und bis zur Homogenität trituriert. Die homogenisierten Proben wurden bei Raumtemperatur für zwei bis drei Minuten inkubiert, um die Dissoziation der Nukleinproteinkomplexe zu erlauben. Pro 1 ml Trizol wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden verschlossen und für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt bevor sie daraufhin bei Raumtemperatur für zwei bis drei Minuten ruhten. Der wässrige Überstand, in dem sich die RNA befindet, wurde danach entfernt. 0,3 ml einer 100%igen Ethanol Lösung wurde pro 1 ml vom anfänglichen Trizol-Reagenz hinzugegeben und die Probe durch Umschwenken gemischt. Es folgte eine erneute Inkubation für zwei bis drei Minuten, bevor die Proben bei 2000 x g bei 2–8 °C für fünf Minuten zentrifugiert wurden. Der Protein-haltige Überstand wurde erneut entfernt und es erfolgte eine zweimalige Waschung der präzipitierten DNA mit jeweils 1 ml 0,1 M Natriumcitrat, welches in 10%igem Ethanol vorlag. Nach beiden Waschungen ruhten die Proben für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur, bevor ein Zentrifugationszyklus bei 2–8 °C bei 2000 x g für fünf Minuten folgte. Nach Entfernung des Überstandes, erfolgte die Zugabe von 2 ml von 75%igem Ethanol. Die Reaktionsgefäße wurden erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei periodische Schwenkungen während der Inkubation erfolgten. Eine Zentrifugation bei 2000 x g bei 2–8 °C für fünf Minuten folgte. Anschließend konnte die DNA resuspendiert werden. Dazu wurden die Reaktionsgefäße für 10 Minuten mit offenem Deckel luftgetrocknet und die

DNA wurde daraufhin in 8 mM NaOH aufgelöst, bis die DNA-Konzentration Werte zwischen 0,2–0,3 µg/µl erreichte. Meistens war die notwendige 8 mM NaOH-Menge zwischen 300–600 µl pro 50–70 mg Gewebeprobe. Die nichtlöslichen Stoffe in der DNA wurden durch ein letztmaliges Zentrifugieren für zehn Minuten bei 12000 x g entfernt. Der flüssige Überstand, welcher die DNA enthielt, wurde in ein neues 1 ml Reaktionsgefäß überführt. Für eine längere Lagerung musste die DNA mit HEPES-Lösung bis zu einem pH-Wert von 7–8 adjustiert und mit 1 mM EDTA ergänzt werden. Hiernach konnte die DNA bei Temperaturen zwischen -20 °C und 4 °C gelagert werden.

2.7.3 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 200 ml einer 4%igen Agaroselösung hergestellt und diese mit 9 µl Ethidiumbromid gemischt. Ein Kamm mit 20 Zähnen wurde in der noch flüssigen Mischung positioniert. Nach einer zehnmütigen Abkühlphase der Agarose-Ethidiumbromid-Mischung wurde der Kamm entfernt und die gewünschten 20 Kammern (Vertiefungen in der nun festen Agarose) hinterblieben in dem Agarosegel. Das Agarosegel wurde nun in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Lösung überführt. Es wurde 7 µl eines *base pair ladder* (100 bp) für Produktlängen zwischen 100-200 bp in die erste Kammer gegeben. Anschließend wurde Ladepuffer (Glycerol und 2 x Farbstoff) mit der jeweiligen DNA-Probe in einer Verdünnung von 1:5 gemischt und in die entsprechenden Kammern pipettiert. Am Gleichstrom-Transformator wurden daraufhin eine Spannung von 100 V und eine Stromstärke von 500 mA angelegt. Nach zwei Stunden waren die Banden in der Agarose sichtbar. Es folgte das Erstellen eines UV-Fotos mithilfe der Software *EOS Utility*, in dem die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Bruchstücke sichtbar waren.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software *GraphPad Prism* (Version 5.02). Die Daten werden präsentiert als arithmetischer Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM). Die Anzahl der Proben wurde mit n bezeichnet und die statistische Signifikanz wurde abhängig von der Anzahl der Variablen mittels Student's t-Test, One-Way-ANOVA oder Two-Way-ANOVA ermittelt. Dabei wurden p-Werte <0,05 als signifikant bewertet. Die Kennzeichnung des Signifikanzniveaus erfolgte in Form von Sternchen (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

3. Ergebnisse

3.1 Generierung der Poren

Bei der Herstellung der porösen EHTs nutzten wir das in Absatz 2.4.2 beschriebene Protokoll zur Herstellung von EHTs und erweiterten das Protokoll durch das Einbringen von Schablonen in die Agarosevertiefungen. Demzufolge mussten zunächst Schablonen hergestellt werden, mit deren Hilfe wir dauerhaft Poren in die EHTs einbringen konnten. In den vorangegangenen Versuchen wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie die Agarose als Gussform für 24-*well*-EHTs verwendet (Hansen et al. 2010). Weiterhin wurden Alginat-Fäden als Platzhalter zur Ausbildung künstlicher Lumina in 6-*well*-EHTs verwendet (Vollert et al. 2014), um EHTs zu perfundieren. In Anlehnung an vorherige Erfahrungen mit löslichen *Templates* erfolgte die Generierung der Poren zunächst mithilfe von Schablonen, die aus Agarose und Gelatine gegossen wurden. Dabei galt es Konzentrationsreihen der gewählten *Templates* zu erstellen und diese auf ihre Stabilität und Biokompatibilität zu untersuchen.

3.1.1 Agarose-Schablone

Agarose ist ein Polysaccharid aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose, die glycosidisch miteinander verknüpft sind. Agarose findet in vielen Bereichen der Medizin und Molekularbiologie Verwendung, u. a. dient die Agarose als Gelmatrix bei der Gelelektrophorese. Aufgrund ihrer Biokompatibilität und der Temperatursensibilität wird die Agarose in unserem Institut im Bereich des *Tissue Engineering* als Gussform für die Generierung von 24-*well*-EHTs genutzt.

Bei der Generierung der porösen EHTs machten wir uns die Temperatursensibilität der Agaroselösung zu Nutze und erstellten mithilfe von *Spacern* Agarosevertiefungen, die diesmal Säulen aufwiesen. Hierfür manipulierten wir die *Spacer*, die zuvor für die Generierung einfacher Agarosevertiefungen benutzt wurden. Für die erwünschte Anzahl der Agarosesäulen bzw. Poren im EHT, bohrten wir durchgängige Löcher in die 25 mm x 15 mm x 13 mm großen *Spacer*. Die Löcher wiesen einen Abstand von 5 mm auf, hatten einen Durchmesser von 1 mm und waren nach oben hin durchgängig (Abb. 3.1).

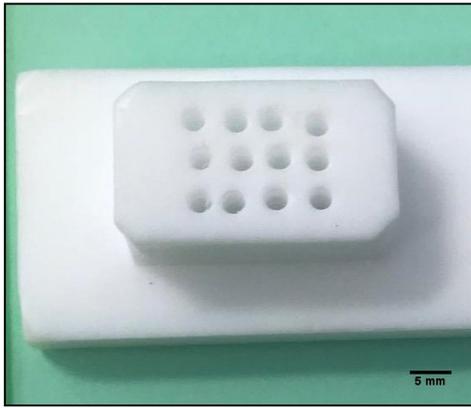


Abb. 3.1 *Spacer im 6w6p-Format mit 12 runden Löchern für die Generierung einer Agarose-/Gerlatinevertiefung mit 12 Säulen. Maßstabsbalken: 5 mm.*

Diese manipulierten *Spacer* wurden in *wells* einer 6-*well*-Kulturschale mit je 5 ml einer 2%igen, 60 °C heißen Agaroselösung gepresst. Das Aushärten der Agaroselösung wurde bei Raumtemperatur abgewartet. Nach 10 Minuten wurden die *Spacer* vorsichtig aus der erstarrten Agarose entnommen. Die ersten Versuche scheiterten bei der Entnahme der *Spacer* aus der Agarose, da die Säulen aufgrund ihrer Instabilität und der enormen Haftung zwischen den dünnen Löchern und der Agarose abrissen. Im weiteren Verlauf versuchten wir die Reibung zwischen dem *Spacer* und der Agarose bei der *Spacer*-Entnahme zu minimieren und weitere Agarosekonzentrationen für mehr Säulenstabilität auszutesten. Für die bessere Gleitfähigkeit der Agarose aus den *Spacer*-Löchern behandelten wir die *Spacer* zuvor mit einer 1%igen Pluronic®-Lösung. Dabei wurde der *Spacer* für 2 Stunden in Pluronic® eingetaucht und bei 37 °C im Inkubator gelagert. Anschließend wurden die Überreste der Pluronic®-Lösung mit PBS ausgewaschen. Daraufhin konnten die *Spacer* wieder in unterschiedlich konzentrierte Agaroselösungen für die Säulengenerierung gepresst werden.

In die Testung gingen Agaroselösungen mit den Konzentrationen 1%, 2%, 5%, 10% und 20% ein. Jede Agarosekonzentration wurde mehrfach getestet ($n \geq 3$). Während die Agarosesäulen bei der Verwendung einer 1, 2- und 5%igen Agaroselösung bei der *Spacer*-Entnahme komplett abrissen und bei der 20%igen Agaroselösung nur kleine Säulen in der Agarosevertiefung verblieben, stellte die 10%ige Agarose die erfolgreichste Agarosekonzentration dar (Abb. 3.2). Die 10%ige Agarose ermöglichte die Fertigung stabiler, glatter Säulen, ohne dass die Säulen beim Entfernen des *Spacers* abrissen (Abb. 3.2). Nach Fertigstellung der Agarosesäulen erfolgten alle weiteren Schritte zur EHT-Generierung nach dem im Absatz 2.4.2 beschriebenen Protokoll und der Mastermix wurde um die zuvor generierten Agarosesäulen herumpipettiert.

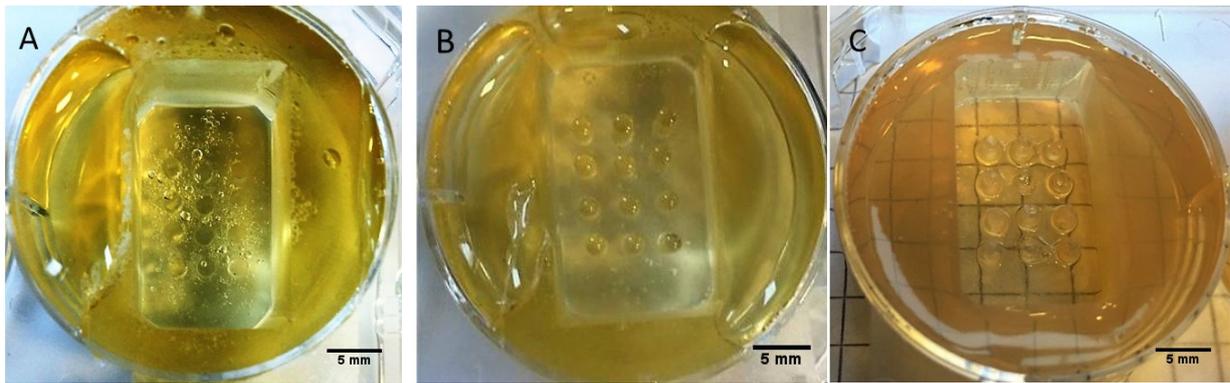


Abb. 3.2 Konzentrationsreihe Agarose. **A:** Generierung der Säulen mithilfe einer 2%igen Agarose-Lösung. **B:** Verwendung einer 10%igen Agarose-Konzentration zur Säulengenerierung. **C:** Säulenherstellung mithilfe einer 20%igen Agarose-Lösung. Maßstabsbalken: 5 mm.

3.1.2 Gelatine

Bei der Recherche nach formbaren und zugleich biokompatiblen Materialien stießen wir auf die Publikation von Golden und Tien (2007). Golden und Tien erstellten Gelatine-Fasern, die in dreidimensionale Hydrogele (z.B. Kollagenmatrix) eingeschlossen wurden. In die Gelatine-Fasern wurden zuvor Endothelzellen eingeschlossen. Die besonderen Temperatureigenschaften der Gelatine erlaubten, dass während der Inkubation der Hydrogele bei 37 °C, die Gelatine schmolz, aus der Kollagenmatrix floss und die darin enthaltenen Endothelzellen in der Matrix hinterließ. Aus der Arbeit ging hervor, dass eine 10%ige Gelatine-Lösung bei Temperaturen >37 °C flüssig war und ab ≤4 °C erstarrte und fest wurde. Bei Raumtemperatur erfolgte keine Änderung des Aggregatzustandes, d.h. sowohl im flüssigen Zustand nach der Herstellung als auch im festen Zustand nach der Aushärtung bei ≤4 °C verblieb die Gelatine bei Raumtemperatur im jeweiligen Aggregatzustand. Weiterhin wurde durch das Überleben der Endothelzellen in der Kollagenmatrix gezeigt, dass die Gelatine biokompatibel ist.

Wir erstellten eine Konzentrationsreihe der Gelatine (hergestellt in PBS) für die Ermittlung einer optimalen Gelatine-Konzentration zur Herstellung von Säulen. Dabei untersuchten wir 0,5%-, 2,5%, 5%-, 10%-, 25%- und 50%ige Gelatine-Lösungen. Wie auch bei der Agarose, pressten wir die Pluronic®-beschichteten und durch Löcher manipulierten Spacer auf die flüssige Gelatine. Die Gelatine musste daraufhin bei 4 °C im Kühlschrank unter sterilen Bedingungen aushärten, bevor wir die Spacer wieder aus dem well entnehmen konnten. Dieser Schritt dauerte 20 Minuten. Die 25%ige Gelatine-Lösung stellte sich als die

erfolgreichste Gelatine-Konzentration zur Generierung stabiler Säulen heraus (Abb. 3.3). Das Besondere und damit der größte Unterschied der Gelatine-Schablone zur zuvor beschriebenen Agarose-Schablone (vgl. 3.1.1) war die Schmelztemperatur der Gelatine bei 37 °C. Nach dem Pipettieren der Mastermix-Thrombin-Mischung (vgl. 2.4.2) auf die Gelatine-Schablone musste die Kulturschale für die weitere Polymerisation des Fibrinhydrogels in den Inkubator bei 37 °C gestellt werden. Nach 15–20 Minuten schmolz die Gelatine, und die Gelatinesäulen flossen aus dem polymerisierenden Fibrinhydrogel, wobei die Poren im EHT verblieben. Hierdurch wurde das EHT bei der Entnahme aus der Schablone keiner weiteren Reibung entlang der Säulen ausgesetzt (vgl. 3.1.7).



Abb. 3.3 12 runde Säulen aus 25%iger Gelatine mithilfe von gelöcherten Spacern im 6-well-Format. Maßstabsbalken: 5 mm.

3.1.3 PTFE-Schablone

Die Herstellung von Säulen mithilfe von Agarose und Gelatine zeigte sich im weiteren Verlauf als ein sehr aufwendiges Verfahren zur Generierung von Poren. Die generierten Säulen waren nicht wiederverwendbar, sodass sie jedes Mal frisch präpariert werden mussten. Das Protokoll konnte nicht mit hinreichender Robustheit überzeugen und es gelang nicht jedes Mal, glatte, stabile Säulen zu erstellen, zumal der Schaden an einer Säule ein ganzes EHT einreißen ließ. Auf der Suche nach weiteren Materialien zur Porengenerierung stießen wir auf Polytetrafluorethylen.

Polytetrafluorethylen (PTFE; im Folgenden als Teflon® bezeichnet) bewährte sich in unserem Institut bereits als Material der *Spacer* für die Formgebung der Agarose. Zu den besonderen Eigenschaften des Teflons® zählt (i) die Biokompatibilität, (ii) der niedrige Reibungskoeffizient, welches das Herausgleiten anderer Materialien entlang der Teflon®-Konstruktion erleichtert, (iii) seine Eigenschaft als einfach zu bearbeitender Feststoff, der die Stabilität der Schablone garantierte, (iv) seine Wiederwendbarkeit durch wiederholte Autoklavierbarkeit, die die Fertigungskosten niedrig hielt. Die beschriebenen Eigenschaften legten die Nutzung von

Teflon® als Material für die Herstellung einer Schablone nahe. Bei der Generierung der Teflon®-Schablone nutzten wir eine 1 mm dicke Teflon®-Matte, die mithilfe einer handelsüblichen Schere kreisrund geschnitten wurde, sodass sie problemlos in ein *well* einer 6-*well*-Kulturschale (Durchmesser 35 mm) gelegt werden konnte. In die Teflon®-Matte wurden mithilfe einer Lochstanze (Gürtelzange) kleine Löcher gestanzt, sodass Teflon®-Schläuche mit einem Durchmesser von 1 mm und einer Länge von 10 mm mithilfe eines Silikonklebers (Dow Corning 174) durch die Löcher an der Teflon®-Matte fixiert werden konnten. Die fertige Teflon®-Schablone (Abb. 3.4) musste nun in ein *well* eingebettet werden, sodass die Mastermix-Thrombin-Mischung zur EHT-Herstellung in das *well* auf die Schablone pipettiert werden konnte. Als Einbett-Substanz nutzten wir unsere altbewährte 2%ige Agarose.

Im Einzelnen wurde im Falle der PTFE-Methode die 6-*well*-Kulturschale zunächst mit 2 ml Agaroselösung befüllt. Nach einer 5-minütigen Abkühlphase der Agaroselösung bei Raumtemperatur konnte die PTFE-Schablone auf die nun feste Agarose positioniert werden. Zur Einbettung der Schablone in die Agarosevertiefung mussten weitere 3 ml Agaroselösung auf die Schablone gegeben werden, wobei die Säulen der Schablone durch eine Teflon®-Konstruktion vor der Agaroselösung geschützt werden musste. Die verwendete Teflon®-Konstruktion war der in Abb. 3.1 dargestellte *Spacer*, der umgebaut wurde. Dabei wurde eine quaderförmige Vertiefung in den *Spacer* gefräst, sodass die Säulen der Schablone in die Vertiefung Platz finden (Abb. 3.4 B).

Nach erfolgreicher Einbettung der Teflon®-Schablone in die Agarose wurde die generierte Vertiefung (Mulde) mit einer 1%igen Pluronic®-Lösung befüllt, und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Entfernen der Pluronic®-Lösung und Auswaschung der Pluronic®-Überreste aus der Mulde mit einer PBS-Lösung, konnte das Mastermix-Thrombin-Gemisch auf die Schablone in die Mulde pipettiert werden. Nach einer zweistündigen Polymerisationszeit der EHTs im Inkubator und der folgenden Benetzung der EHTs mit DMEM zur Erleichterung der EHT-Ablösung aus der Mulde wurden die EHTs aus der Teflon®-Schablone entnommen und in eine neue Zellkulturschale mit jeweils 8 ml EHT-Kulturmedium überführt. Die Säulen der PTFE-Schablonen hinterließen so die Poren im EHT.

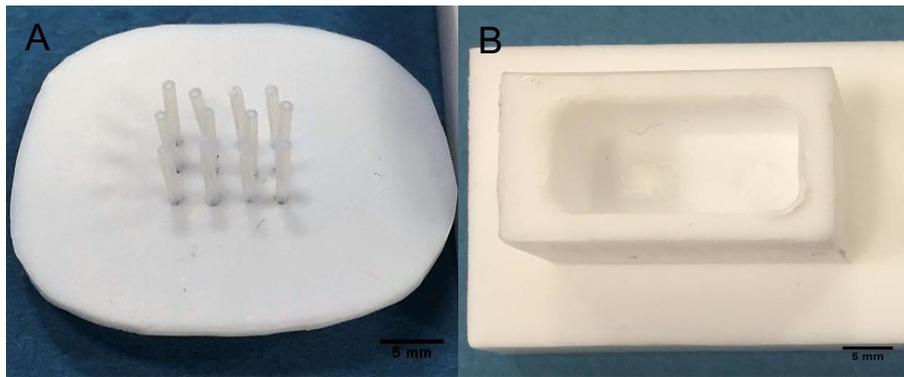


Abb. 3.4 A: 12 runde Säulen aus PTFE-Schläuchen sind an eine Teflon®-Matte angebracht. Die Schablone liegt im 6-well-Format vor. **B:** 6w6p-Spacer mit Vertiefung. Maßstabsbalken: 5 mm.

3.1.4 PEEK-Schablone

Die bisher vorgestellten Schablonen aus Agarose, Gelatine und PTFE ermöglichten die Generierung von runden Poren in den EHTs. In der Publikation von Bien et al. (2009) über „*Mesoscopic hydrogel molding to control the 3D geometry of bioartificial muscle tissues*“ wurden ellipsenförmige PDMS-Säulen zur Generierung länglicher Poren vorgestellt, die möglicherweise die Generierung besserer Kraftlinien ermöglichte. Für die Austestung einer weiteren Porenform in unseren EHTs wurde im Folgenden die Herstellung ellipsenförmiger Poren anvisiert.

Wir versuchten in der institutseigenen Werkstatt manuell ellipsenförmige Löcher in die Teflon®-Spacer zu bohren und zu fräsen, damit die ellipsenförmigen Säulen in der Agarose- und Gelatine-Schablone entstanden. Sowohl das Fräsen als auch das Bohren ellipsenförmiger Löcher in den Spacern scheiterten, denn die Löcher wurden kantig und rau, sodass die Entnahme der Spacer aus der Gelatine und Agarose die Säulen beschädigte. Um dennoch die Auswirkungen ellipsenförmiger Poren auf die EHT-Kontraktion zu untersuchen, beauftragten wir die Firma Jäger mit dem Fräsen einer Schablone mit ellipsenförmigen Säulen. Da das bei uns bereits das erprobte Teflon® aufgrund seiner geringen Härte und Sprödigkeit für das Fräsen kleiner Strukturen ausfiel, wurde uns als Material das *Polyetheretherketon* (PEEK) empfohlen. Das härtere PEEK erlaubte eine gute Verarbeitung des Materials. Für die unbedenkliche Verwendung des Materials PEEK musste allerdings zunächst eine Biokompatibilitätsprüfung durchgeführt werden, da das Material im direkten Kontakt mit den Rattenkardiomyozyten stand und die EHT-Reifung nicht hindern sollte.

3.1.4.1 Biokompatibilitätsprüfung

Die Biokompatibilitätsprüfung erfolgte mit EHTs im 24-well-Format, da bereits in unserem Institut ein video-optisches-Analyseverfahren zu Kontraktionsmessung von 24-well-EHTs etabliert war (Hansen et al. 2010). Dabei wurden EHTs über einen Zeitraum von 13 Tagen in Anwesenheit und in Abwesenheit von PEEK-Stückchen im Kulturmedium kultiviert. An unterschiedlichen Tagen wurde mithilfe des video-optischen-Analyseverfahrens (Whitebox) die Kontraktilität der EHTs untersucht. In der Abb. 3.5 sind die Frequenz, die Kraft, die T1 80% und die T2 80% der untersuchten EHTs dargestellt. Mithilfe einer Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test wurden die Unterschiede in den beiden Gruppen untersucht. Die Kontraktionsmessungen in der Whitebox erfolgten ab dem 7. Inkubationstag, da die EHTs ab diesem Zeitpunkt kohärent und messbar ($>0,5$ mN Schwellwert) geschlagen haben. Die EHTs zeigten bezüglich aller untersuchten Kontraktionsqualitäten, nämlich der Frequenz, der Kraft, der T1-Zeit bei 80% und T2-Zeit bei 80% zwar leichte Schwankungen, allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen zu sehen.

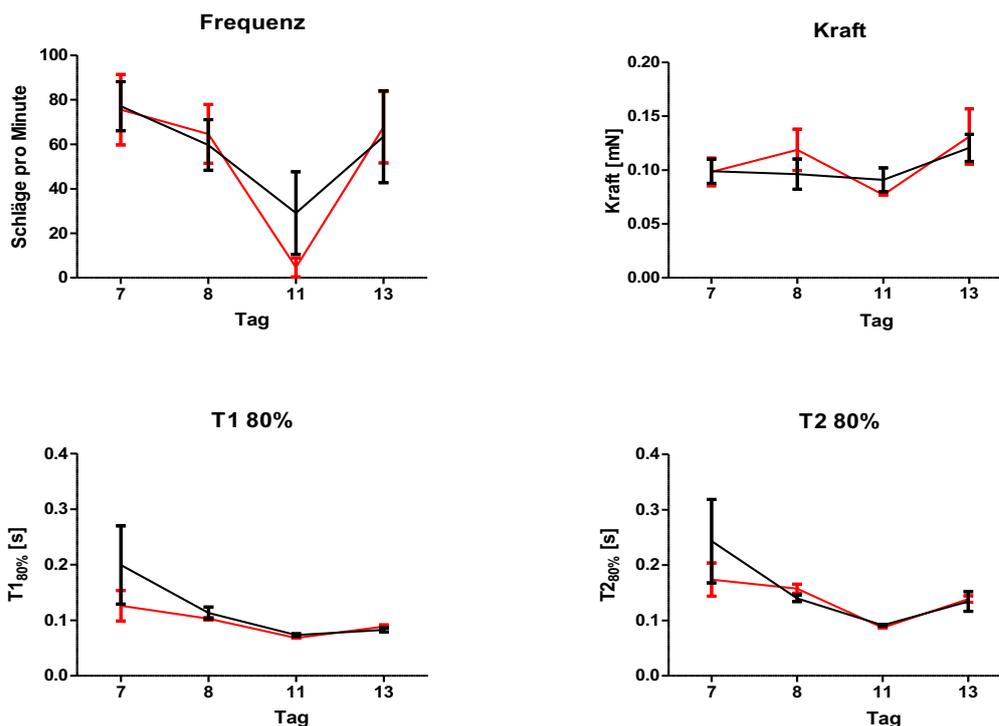


Abb.

3.5: Biokompatibilitätsprüfung von PEEK. Kontraktionsanalyse von 24-well-EHTs über einen Zeitraum von 13 Tagen. Die EHTs wurden entweder in Anwesenheit (rot; $n=7$) oder Abwesenheit (schwarz; $n=7$) von PEEK-Stückchen im Kulturmedium kultiviert. Bei der Kontraktionsanalyse sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen vorhanden. Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test.

Aus den Messungen konnte abgeleitet werden, dass die Anwesenheit von PEEK im Kulturmedium die EHTs nicht negativ beeinflusste und die PEEK-Gussform als Schablone zur Generierung von Poren eingesetzt werden konnte. Wir beauftragten folglich die Firma Jäger mit der Herstellung einer PEEK-Schablone. Die Fertigung der PEEK-Schablone erfolgte mit einer CNC-Fräse, sodass eine exakte Schablone mit den gewünschten Säulengrößen und Abständen hergestellt wurde. Die ellipsenförmigen Säulen zeigten die Maße 1 mm x 2 mm x 10 mm (Breite x Länge x Höhe) auf. Dabei war jede Säule jeweils 1 mm von der nächsten Säule entfernt (Abb. 3.6). Die PEEK Schablone wurde wie die PTFE-Schablone in Agarose eingebettet und das Mastermix-Thrombin-Gemisch wurde auf die mit Säulen gefüllte Mulde zwischen den Silikonposts pipettiert und die 2 stündige Inkubationszeit wurde abgewartet. Ohne Pluronic®-Beschichtung, konnte der Mastermix nicht zwischen die ellipsenförmigen Säulen der Schablone fließen. Auch mit Pluronic®-Beschichtung, die im Falle der Teflon®-Schablone hilfreich war (vgl. 3.1.3), scheiterten alle Versuche, EHTs aus der PEEK-Schablone zu lösen. Die EHTs rissen wiederholt zwischen den PEEK-Säulen ein.

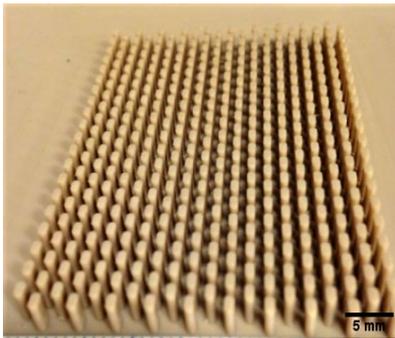


Abb. 3.6 PEEK-Schablone mit ellipsenförmigen Säulen im $6 \times 4 \text{ cm}^2$ -Format. Maßstabsbalken: 5 mm.

3.1.5 PDMS-Schablone

Nachdem die Versuche, ellipsenförmige Poren mithilfe der PEEK-Schablone herzustellen scheiterten, entschieden wir, in Anlehnung an die Arbeit von Bien et al. (2009), Polydimethylsiloxan (PDMS) zur Generierung der Poren zu verwenden. Dabei erstellten wir unsere PDMS Schablonen nicht wie Bien et al. (2009) durch Photolithographie, sondern nutzten unsere maschinell hergestellte PEEK-Schablone (vgl. 3.1.4), um eine PDMS-Schablone mit ellipsenförmigen Säulen herzustellen. Dabei fertigten wir zunächst ein Negativ- und darauf folgend ein Positivabdruck der PEEK-Schablone. Wir erhielten hierdurch eine Schablone mit den Maßen der PEEK-Schablone aus PDMS (Abb. 3.7). Im Einzelnen wurde hierbei die PEEK-Schablone zur Reduzierung des Reibungskoeffizienten mit Pluronic® beschichtet, indem es in 1%iges Pluronic® eingetaucht und für zwei Stunden bei 37 °C

gelagert wurde. Nach zwei Stunden wurde die Pluronic®-Lösung verworfen, und wir erhielten die mit Pluronic® beschichtete PEEK-Schablone. Daraufhin wurde das Zweikomponenten-Elastomer Sylgard 184 der Firma Dow Corning in einem Verhältnis 10:1 mit einem Polymerisationsstarter gemischt und auf die zuvor mit Pluronic®-beschichtete PEEK-Schablone gegossen. Nach darauf folgender Entgasung zur Blasenentfernung und einer Polymerisationszeit von 72 Stunden bei 60 °C, konnte die festgewordene PDMS-Schablone von der PEEK-Schablone durch leichtes Schütteln getrennt werden. Wir erhielten auf diese Weise einen Negativabdruck der PEEK-Schablone (Abb. 3.6). Dabei stellte sich die Verwendung des Blockpolymers Pluronic® F172 als essentiell heraus. Ohne Vorbehandlung der PEEK-Schablone ließ sich das Silikon-Negativ nicht von der Form trennen. Die neu gewonnene PDMS-Schablone (Negativabdruck der PEEK-Schablone) wurde im nächsten Schritt wie zuvor beschrieben zur Reduktion des Reibungskoeffizienten mit Pluronic® beschichtet. Erneut wurde das Zweikomponenten-Elastomer nach dem obigen Protokoll erstellt und diesmal auf den Negativabdruck der PEEK-Schablone gegossen. Alle weiteren Schritte, erfolgten wie bei der Herstellung des Negativabdrucks. Nach 72 Stunden im 60 °C Ofen konnte ein Positiv-Abdruck vom Negativ-Abdruck getrennt werden. Dieser Positivabdruck (Abb. 3.7 C) hatte die Maße der PEEK-Schablone und konnte im weiteren Verlauf auf das kleinere 6-well-Format zugeschnitten werden und wie die PTFE-Schablone in Agarose eingebettet werden und zur Porengenerierung der EHTs verwendet werden.

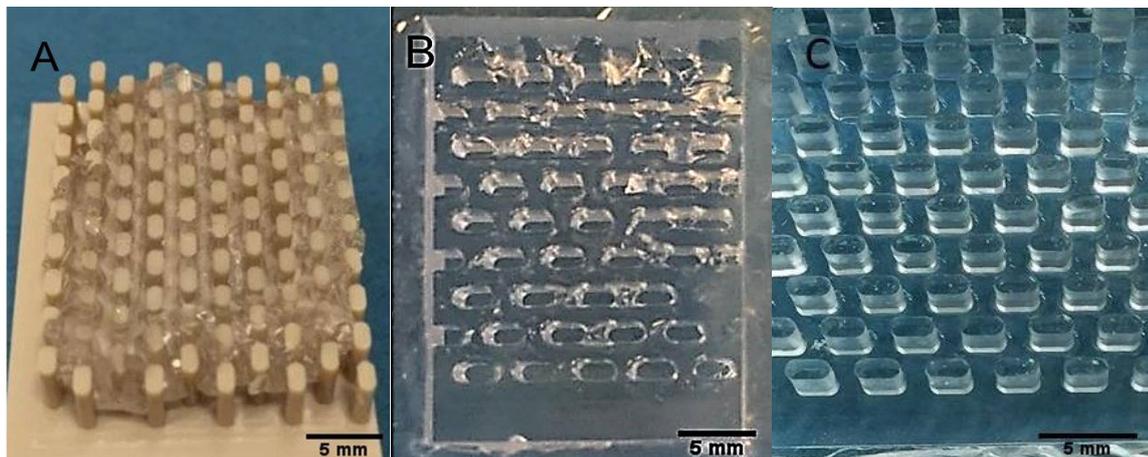


Abb. 3.7 Herstellung der PDMS-Schablone. *A: PDMS-Negativabdruck aus der PEEK Schablone ohne Pluronic®-Beschichtung. B: PDMS-Negativabdruck aus der PEEK-Schablone mit Pluronic®-Beschichtung. C: Erfolgreiche Herstellung eines Positivabdrucks aus der PEEK-Schablone.* Maßstabsbalken: 5 mm.

3.2 Poren-EHTs vs. Kontroll-EHTs

Wir erstellten im weiteren Verlauf $\delta w6p$ -EHTs mit und ohne Poren. Schon nach kurzer Zeit zeigte sich, dass die Poren-EHTs im Vergleich zu den Kontroll-EHTs makroskopisch deutlich stärker kontrahierten. Um nun den Einfluss der Poren auf die Funktion der EHTs nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ beurteilen zu können, wurde die Kontraktionskraft mithilfe der Vandenburg'schen Formel berechnet (vgl. 2.5.1; Abb.2.2). Dabei wurde die Kontraktionskraft in Abhängigkeit der Silikonpost-Auslenkung, Silikonpostlänge, Silikonpost-Radius und des Elastizitätsmoduls ermittelt.

3.2.1 Ermittlung des Elastizitätsmoduls

Bei der Fertigung der EHTs im 6-*well*-Format wurden große Silikonhalterungen mit dicken Silikonposts verwendet. Zur quantitativen Ermittlung der Kontraktionskraft der beiden EHT-Gruppen (Kontroll- und Porengruppe) musste zunächst der Elastizitätsmodulus dieser noch nicht charakterisierten Silikonposts ermittelt werden. Der Elastizitätsmodulus konnte ermittelt werden, indem durch Anlegen unterschiedlicher Zugkräfte an den Silikonposts die Silikonpost-Deflektion gemessen wurde. Dafür wurde die Silikonhalterung senkrecht an einem Stab fixiert, und alle Silikonposts wurden bis auf einen Post abgeklebt. Ein Metallzeiger wurde am Stab so positioniert, dass der Zeiger zum Zentrum des Silikonposts zeigte. Der Silikonpost wurde in neutraler Stellung und daraufhin nach Anlegen unterschiedlicher Gewichte fotografiert. Nach Anlegen jedes Gewichts, wurde die Zurückverlagerung des Silikonposts zur neutralen Nullstellung abgewartet, bevor ein anderes Gewicht angelegt wurde (Abb. 3.8).

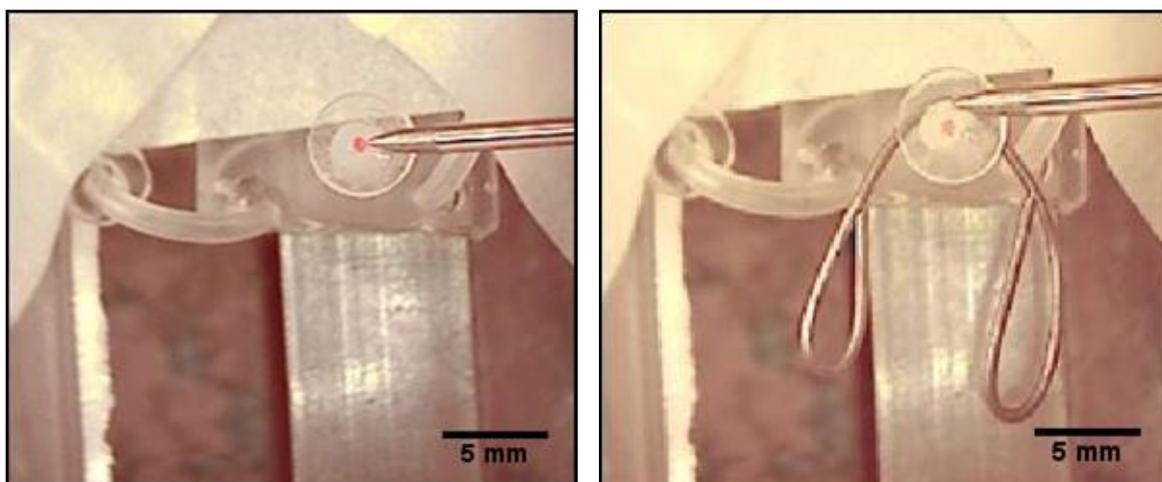


Abb. 3.8 Ermittlung des Elastizitätsmodulus. Links: Silikonpost in neutraler Stellung. Rechts: Silikonpost nach Anlegen der Gewichtskraft von 1,06 mN. Zu sehen ist eine *Post*-Deflektion nach Anlegen der Kraft. Maßstabsbalken: 5 mm.

Mithilfe der Software *ImageJ* konnte die Differenz zwischen Start- und Endposition des Silikonposts bei definierter Gewichtskraft gemessen werden. Dieser Versuch wurde drei Mal wiederholt, und die Mittelwerte + SEM wurden in der Abbildung 3.9 dargestellt. Durch das Einsetzen der Daten in die Vandenburg'sche Formel konnte nun das Elastizitätsmodul (2,51 MPa) bestimmt werden und den Auslenkungen der Silikonschläuche konnte folglich eine Kraft zugeordnet werden.

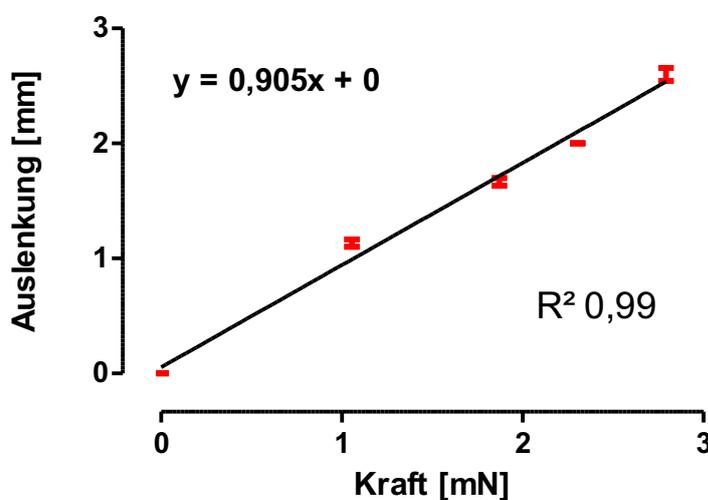


Abb. 3.9 Korrelation von Auslenkung und Kraft der Silikonposts. *Auslenkung des Silikonposts in Abhängigkeit von angelegten Kräften (n=3). Die Steigung (m) der Gerade gibt den Widerstand der Silikonschläuche wieder. Gezeigt ist Mittelwert + SEM.*

3.2.2 Kontraktionskraftmessung der EHTs

Die Kontraktionskraft unterschiedlich hergestellter $\delta w6p$ -EHTs wurde am 21. Inkubationstag mithilfe der Silikonpost-Auslenkungen und der Vandenburg'schen Formel errechnet (vgl. 2.5). Dabei wurden Kontroll-EHTs (n=9) und Poren-EHTs (n=19) miteinander verglichen. Zu sehen ist in der Abb. 3.10 (links) die gemessene Kraft der unterschiedlich hergestellten EHTs am 21. Inkubationstag. Die Poren-EHTs zeigten mit einer durchschnittlichen Kraftentwicklung von $3,40 \pm 2,27$ mN eine signifikant höhere Kraftentwicklung als die Kontroll-EHTs ($1,39 \pm 1,32$ mN). Für die relative Kraftentwicklung der EHTs wurde im Nachhinein mithilfe der durchschnittlichen Querschnittsfläche neuer EHTs (Kontroll-EHT $2,81 \pm 0,16$ mm²; n=3 vs. Poren-EHT $1,81 \pm 0,39$

Ergebnisse

mm²; n=6; Abb. 3.9 Mitte) die Kraftentwicklung pro Fläche in mN/mm² ermittelt (Abb. 3.9 rechts).

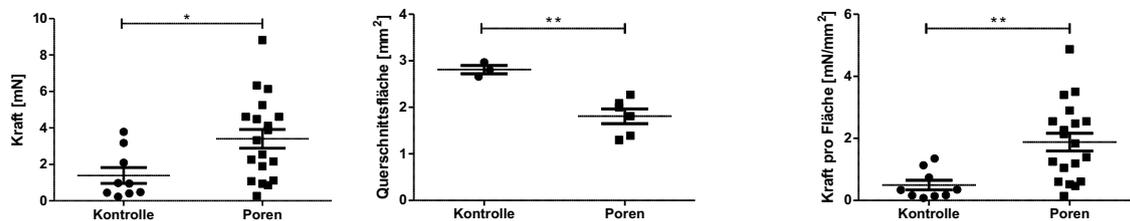


Abb. 3.10 Kontraktionskraft unterschiedlich hergestellter EHTs. Links: Kontraktionskraft von Kontroll-EHTs (n=9) vs. Poren-EHTs (n=19) am Tag 21. **Mitte:** Querschnittsfläche von Kontroll-EHTs (n=3) vs. Poren-EHTs (n=6) am Tag 21. **Rechts:** Relative Kraftentwicklung von Kontroll-EHTs (n=9) vs. Poren-EHTs (n=19) pro Querschnittsfläche in mN/mm² am Tag 21. Gezeigt ist Mittelwert + SEM, One-Way-ANOVA mit Bonferroni Post-Test: *p<0,05; **p<0,01.

3.2.3 Stoffwechselaktivität Poren-EHTs vs. Solid-EHTs

Da die Poren-EHTs stärker kontrahierten als die Kontroll-EHTs, nahmen wir an, dass die Poren-EHTs auch eine stärkere Stoffwechselaktivität hätten. Demzufolge wurde der Glucose-Verbrauch der Kontroll- und Interventionsgruppe untersucht und in der Abb. 3.11 dargestellt. Der Glucose-Verbrauch von 6-well-EHTs wurde über 8 Tage im Kulturmedium gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils kurz vor dem Mediumwechsel in 24-Stunden Abständen. Die erste Messung erfolgte am sechsten Tag, da die EHTs in beiden Gruppen vor dem sechsten Tag keine vollständige Kontraktionen, sondern leichte schlängelnde Bewegungen zeigten. Am 12. Tag, direkt nach dem Wochenende, wurde das Medium gewechselt, ohne dass der Glucose-Verbrauch in die Messungen aufgenommen wurde, da das Kulturmedium über das Wochenende nicht gewechselt wurde. Folglich erfolgte die Messung des Glucose-Verbrauchs am 13. Tag wieder aus einem 24-Stunden alten Medium. In die Auswertung gingen drei Kontroll-EHTs und vier Poren-EHTs ein. Der Glucose-Verbrauch wurde mithilfe von einem Blutzuckermessgerät (Bayer, Contur XT) gemessen. Der Glucose-Verbrauch der EHTs nahm zwischen dem sechsten und siebten Tag von $4,20 \pm 0,62$ g pro EHT auf $7,15 \pm 0,08$ g pro EHT und 24-Stunden zu. Ab Tag 13 stagnierte der Glucose-Verbrauch in beiden Gruppen auf durchschnittlich $7,2 \pm 0$ g/EHT in der Kontroll-Gruppe und $6,96 \pm 0,38$ g/EHT in der Poren-Gruppe. Anzunehmen ist eine alternative Energiequelle der EHTs wie z.B. Fettsäuren oder Laktat im Kulturmedium oder ein erhöhtes Absterben der Kardiomyozyten über das

Wochenende. Über den Zeitraum von 14 Tagen wurde trotz leichter Schwankungen kein signifikanter Unterschied im Glucose-Verbrauch zwischen den Gruppen gemessen (Abb. 3.11).

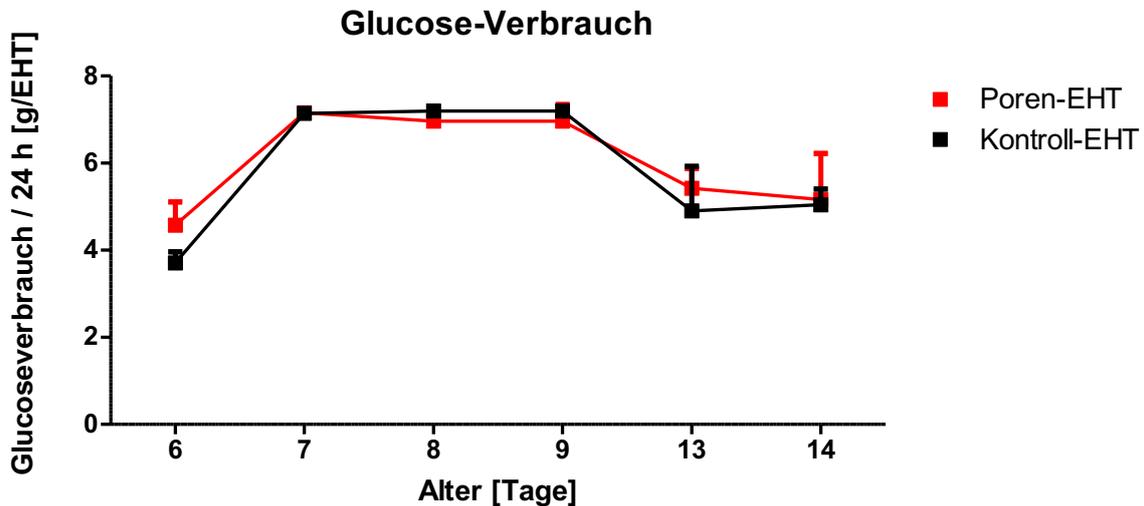


Abb. 3.11 Glucose-Verbrauch von Kontroll- und Poren-EHTs im 6-well-Format. *Glucose-Verbrauch von Kontroll-EHTs vs. Poren-EHTs über acht Tage. Gezeigt ist Mittelwert + SEM, Kontroll-EHTs (n=3) und Poren-EHTs (n=4). Two-way ANOVA mit Bonferroni Post-Test: Nicht signifikant.*

3.2.4 Histologische Untersuchung

3.2.4.1. *Whole mount*-Analyse

Um die Poren im EHT histologisch darzustellen, wurden mittig-durchgeschnittene EHTs als *whole mount* mithilfe der Immunfluoreszenz-Färbung untersucht. Die andere Hälfte der jeweiligen EHTs wurde dabei für DNA- und RNA-Analysen genutzt (vgl. 3.2.5 und 3.2.6). In der *whole mount*-Analyse zeigte sich eine deutliche Ausrichtung der mit α -Aktinin-gefärbten Kardiomyozyten entlang der Kraftlinien des EHTs (Abb. 3.12). Man beachte insbesondere die verbesserte Orientierung der Kardiomyozyten um die Poren herum im Vergleich zu Bereichen entfernt von den Poren. Die Zellausrichtung ist entlang der Poren ausgerichtet und gleichmäßig verteilt.

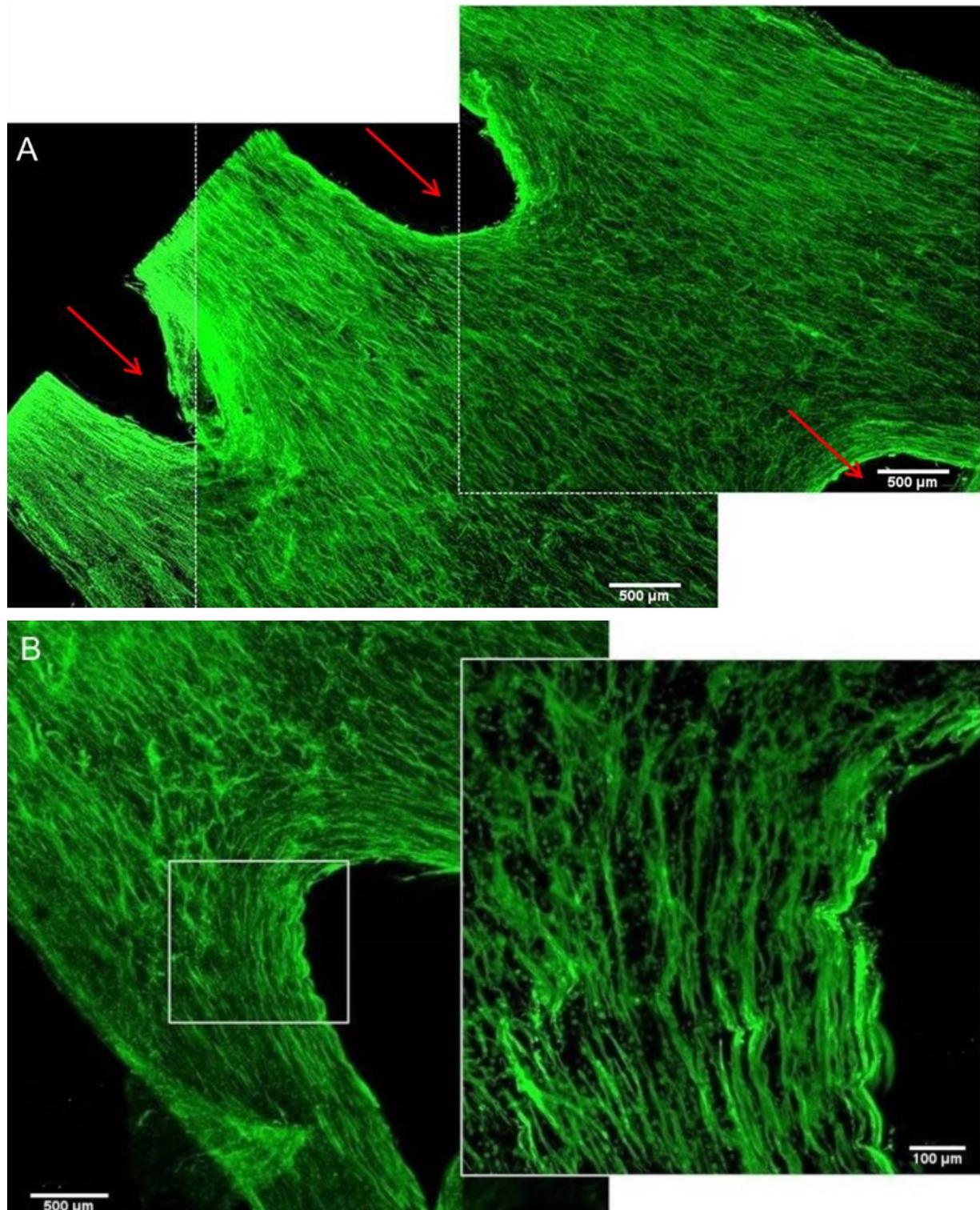


Abb. 3.12 Konfokale Lasermikroskopaufnahme eines Poren-EHTs. Das EHT wurde vor der Fixierung in zwei Hälften geschnitten, bevor es mit einem α -Aktinin-Antikörper gefärbt wurde. **A:** Zusammengesetztes Bild aus zwei Einzelbildern mithilfe der Software ICE (Image Composite Editor) für eine übersichtlichere Darstellung. Rote Pfeile zeigen die Poren. **B:** Zellorientierungen des EHTs insbesondere entlang der Poren. Im danebenliegenden Bild wird der Bereich um die Pore vergrößert dargestellt.

Zur Beurteilung der Zellausrichtung, -verteilung und -morphologie, erfolgte der Vergleich der Kontroll-EHTs mit Poren-EHTs mit weiteren Farbstoffen (Kernfarbstoff: *DRAQ5*; Zytoskelettfarbstoff: *Phalloidin*), die im Folgenden dargestellt sind (Abb. 3.13). Im Kontroll-EHT ist die Querstreifung der Kardiomyozyten (grün) nur angedeutet sichtbar. Die Zellen bilden ein diffuses Zellnetzwerk mit vielen kleinen rundlichen Zellkernen (blau) (3.13 A). Beim Poren-EHT sieht man eine gut ausgebildete Querstreifung der ausgestreckten Kardiomyozyten (grün), die länglich und geordnet verlaufen. Einzelne Zellkerne (rot) sind zu erkennen, die länglich ausgerichtet sind (3.13 B).

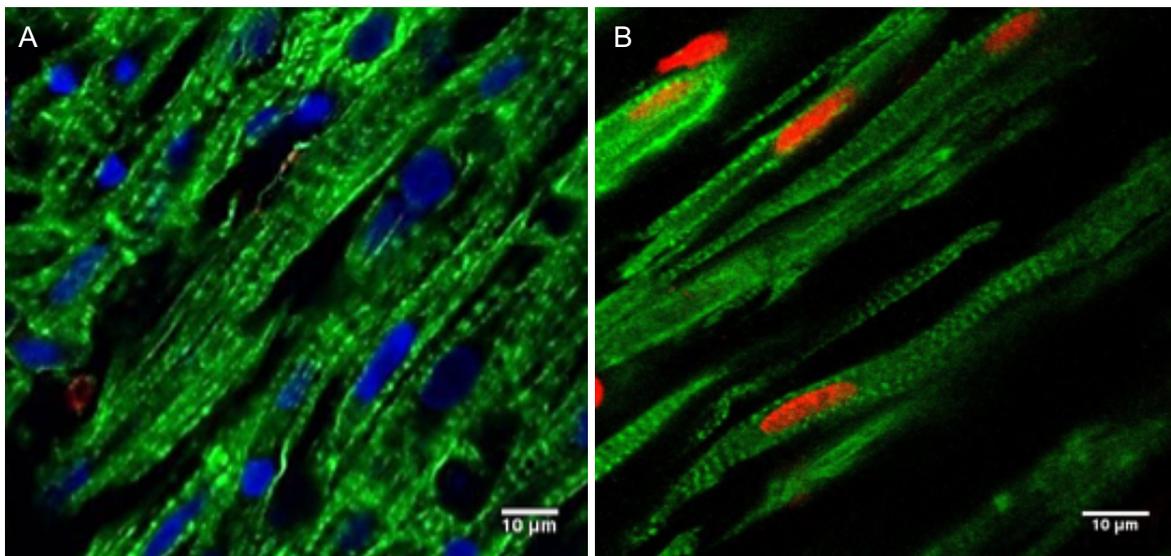


Abb. 3.13 Konfokale Laser-Mikroskopieaufnahme von 6p6w-EHTs. **A:** Konfokale Aufnahme eines 21 Tage alten Kontroll-EHT. Grün: Phalloidin; Blau: DRAQ5. **B:** Konfokale Aufnahme eines 21 Tage alten Poren-EHT. Grün: Phalloidin; Rot: DRAQ5. Maßstabsbalken: 10 µm.

3.2.4.2 Färbung von Paraffinschnitten

Um den Effekt der Poren auf die Zellverteilung, das Zellüberleben und EHT-Geometrie näher zu beurteilen, wurden Paraffinschnitte (quer und längs) von Poren-EHTs (n=9) und Kontroll-EHTs (n=4) angefertigt und einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung der unterschiedlich hergestellten EHTs (Abb. 3.14; Bild A1 und B1) zeigte deutliche Unterschiede. In den Längsschnitten der Kontroll-EHTs sind Kardiomyozyten erkennbar, die allerdings nicht durchgehend längsausgerichtet entlang von

Ergebnisse

Kraftlinien verlaufen. Die Kardiomyozyten-Dichte zeigte eine deutliche Randbetonung (Abb. 3.14; Bild A2 und A3). Die Längsschnitte der Poren-EHTs zeigen eine durchweg homogenere Zellverteilung, die zwar ebenfalls randbetont war, aber auch innere Bereiche umfasste. Es sind typische, längsausgerichtete Kardiomyozyten entlang der Kraftlinien zu erkennen (Abb. 3.14; Bild B2 und B3).

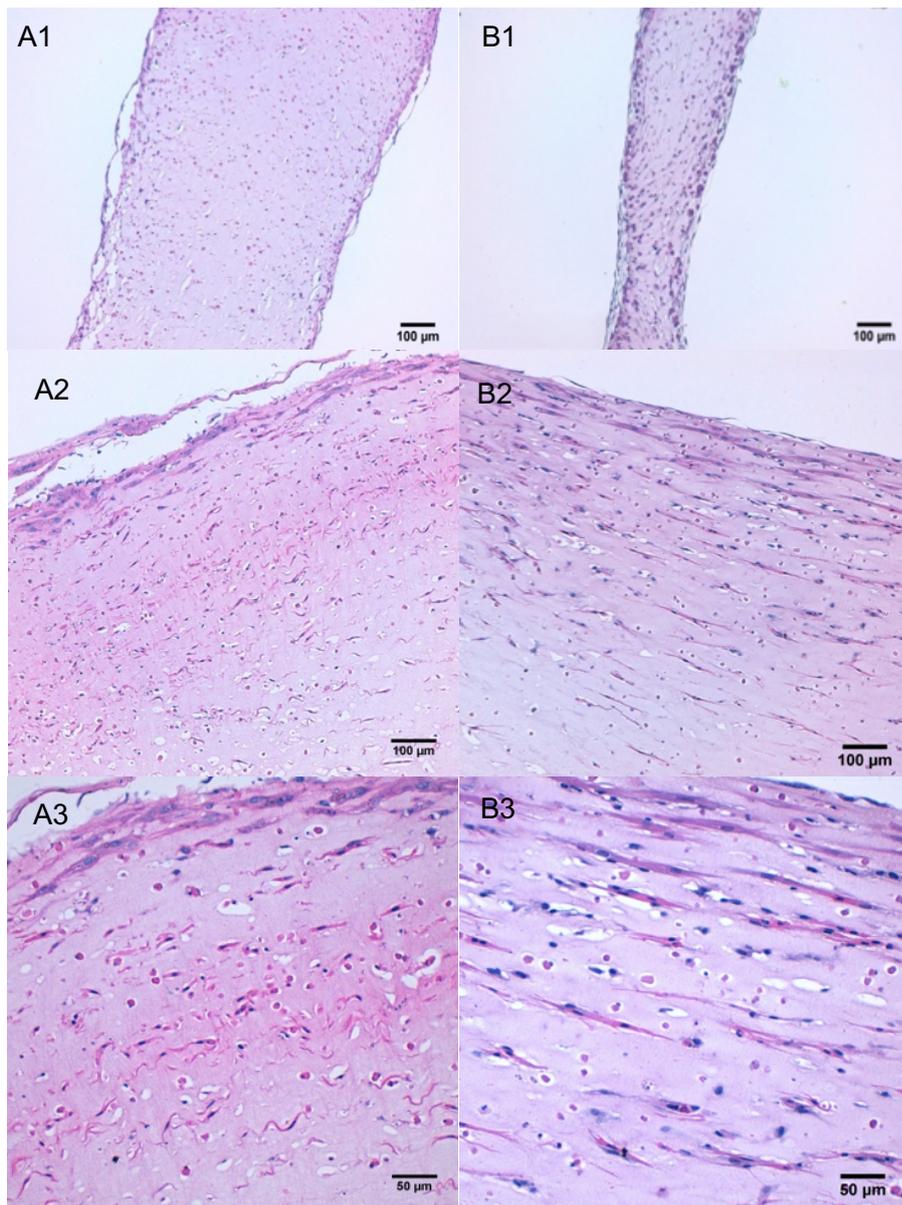


Abb. 3.14 Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Paraffinschnitte von 6w6p-EHTs. **A1-A3:** Kontroll-EHT. **B1-B3:** Poren-EHT. (1) EHT-Querschnitte; 10x Vergrößerung. (2) EHT-Längsschnitte; 10x Vergrößerung. (3) EHT-Längsschnitte 20x Vergrößerung.

3.2.4.3 Quantifizierung der Zellgröße und Zellverteilung

Da die Kontraktionskräfte (vgl. 3.2.2) und die histologischen Untersuchungen (vgl. 3.2.4.2) Unterschiede zwischen den untersuchten EHT-Gruppen gezeigt hatten, erfolgte im Folgenden eine Quantifizierung der Zelldichte und -größe. Dabei wurden Dystrophin-gefärbte Querschnitte von 6w6p-EHTs verwendet. Die Dystrophin-gefärbten EHT-Querschnitte zeigen in Abb. 3.15 die histologisch sichtbaren Zellen entlang der EHTs im Querschnitt. Schon in der Übersichtsaufnahme (3.15; Bild A und B; 10x Vergrößerung) waren in beiden EHT-Gruppen Zellen im Randbereich zu erkennen. Die Vergrößerungen der dargestellten EHTs in Bild C und D zeigten, dass die Zelldichte in den Poren-EHTs höher war (vgl. Abb. 3.17), außerdem waren die Zellen über den ganzen Querschnitt weitestgehend ausgewogen verteilt. Im Kontroll-EHT ist eine große Anhäufung von Zellen im Randbereich sichtbar, und im EHT-Zentrum sind nur noch einzelne Zellen zu erkennen.

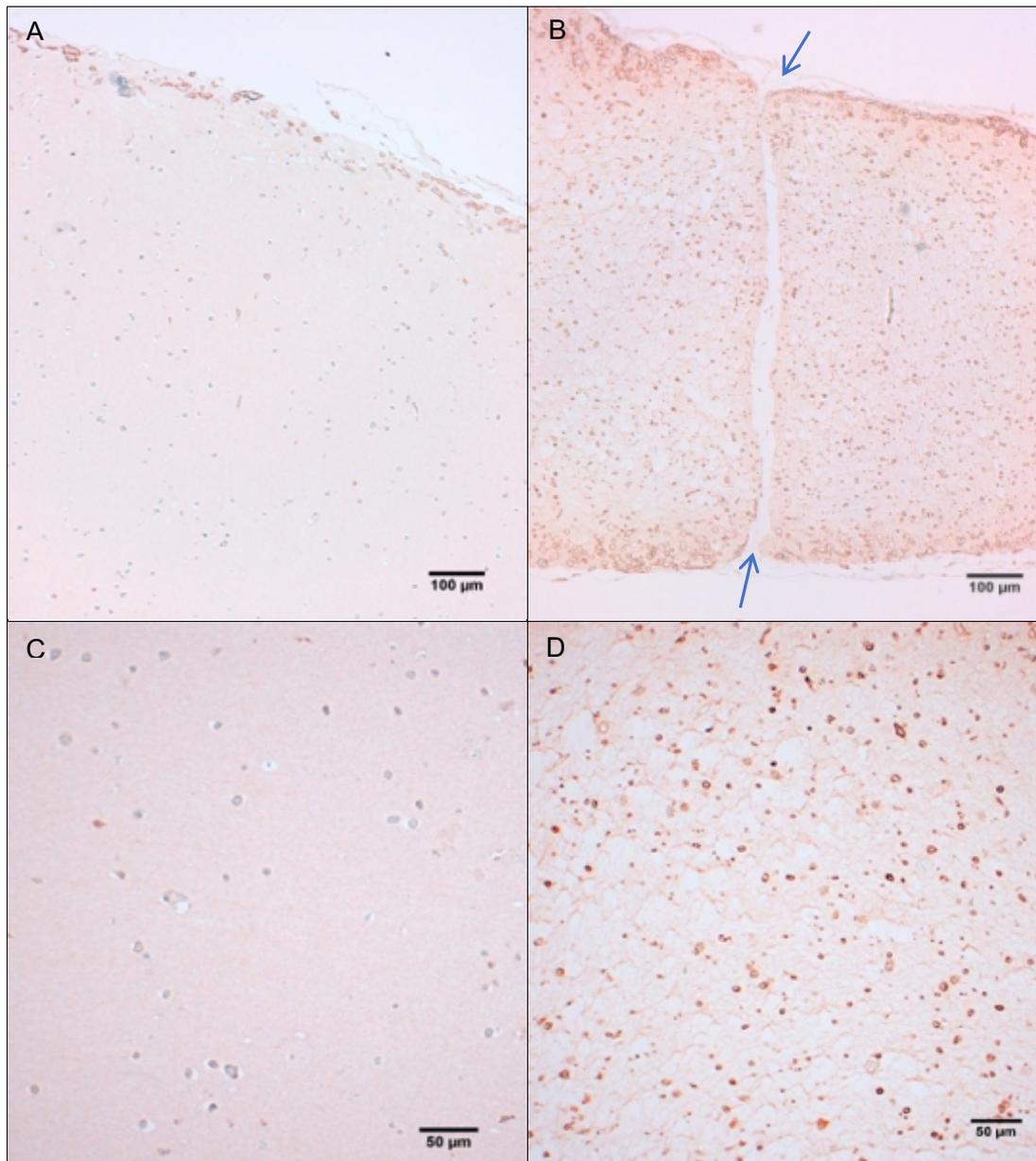


Abb. 3.15 Dystrophin-gefärbte Paraffinschnitte von 6w6p-EHTs im Querschnitt. **A:** Kontroll-EHT. 10x Vergrößerung **B:** Poren-EHT. Blaue Pfeile zeigen auf die abgebildete Pore. 10x Vergrößerung. **C:** Kontroll-EHT, 20x Vergrößerung der EHT-Mitte. **D:** Poren-EHT, 20x Vegrößerung der EHT-Mitte.

Zur Quantifizierung der Zelldichte und –größe wurden die Zellen der unterschiedlich hergestellten EHTs (Kontroll-Gruppe n=3 vs. Poren-Gruppe n=7) manuell mithilfe der Software *ImageJ* ausgemessen. Eine exemplarische Darstellung der Zellzahl und Zellgröße der analysierten Zellen ist in Abb. 2.3 (vgl. 2.6.5) dargestellt. In Anlehnung an vorangegangene Techniken zur Zellquantifizierung (Hirt et al. 2012, Vollert et al. 2014) gingen in die Wertung

Ergebnisse

ausschließlich Zellen mit einer Zellgröße von $>40 \mu\text{m}^2$ (Radius $>6,37 \mu\text{m}$) ein, um Artefakte und Zellfortsätze, am Rand getroffener Kardiomyozyten weitestgehend nicht in die Wertung aufzunehmen.

In Abbildung 3.16 A wurde die relative Zellzahlverteilung unterschiedlicher Zellgrößen in den jeweiligen EHT-Gruppen untersucht. Dabei wurde die prozentuale Zellzahl bestimmter Größen ($35\text{-}175 \mu\text{m}^2$) ermittelt. Zu beobachten ist eine Tendenz der Poren-EHTs zu größeren Zellen. In die Auswertung gingen Zellen ab einer Zellgröße von $35 \mu\text{m}^2$ ein. Beispielsweise wurden bereits 52,1 % der Zellen aus dem Kontroll-EHT mit einer Größe $\leq 45 \mu\text{m}^2$ gemessen, während lediglich 43,5% der Zellen in der Interventionsgruppe mit einer Größe $\leq 45 \mu\text{m}^2$ erfasst wurden. Die Unterschiede in der Zellgröße waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Weiterhin wurde die Zellgröße der Dystrophin-gefärbten *6w6p*-EHTs quantifiziert (3.16 B). In die Wertung gingen pro EHT die 30 größten Zellen ein, da das EHT mit der niedrigsten Zellzahl 30 Zellen $>40 \mu\text{m}^2$ aufwies. In die Zellzählung wurden drei Kontroll-EHTs mit insgesamt 90 gemessenen (30 Zellen/EHT) Zellen und acht Poren-EHTs mit insgesamt 240 gemessenen Zellen eingeschlossen. Die Zellgrößenbestimmung (Zellgröße = $2 \times \pi \times r$) zeigte eine große Varianz innerhalb der Kontroll-EHTs, v. a. das EHT mit den wenigsten Zellen (30 Zellen) zeigte besonders große Zellen. Auch die Kontraktionskraft dieses Kontroll-EHTs war stärker als die übrigen Kontroll-EHTs (Super Kontroll-EHT: 3,79 mN vs. durchschnittliche Kraft von Kontroll-EHTs: 1,49 mN). Die durchschnittliche Zellgröße wurde durch die Poren nicht beeinflusst.

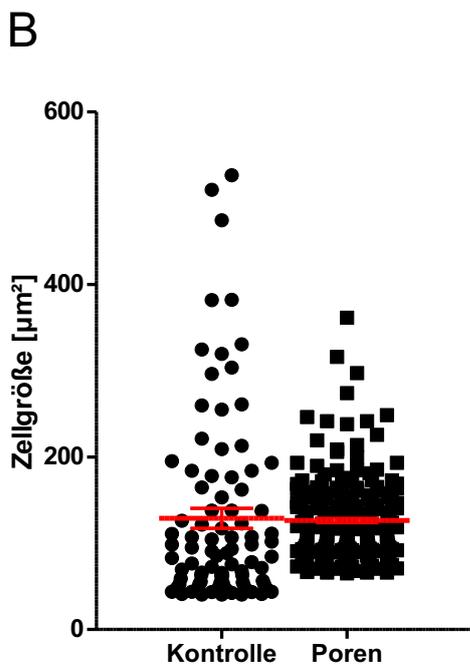
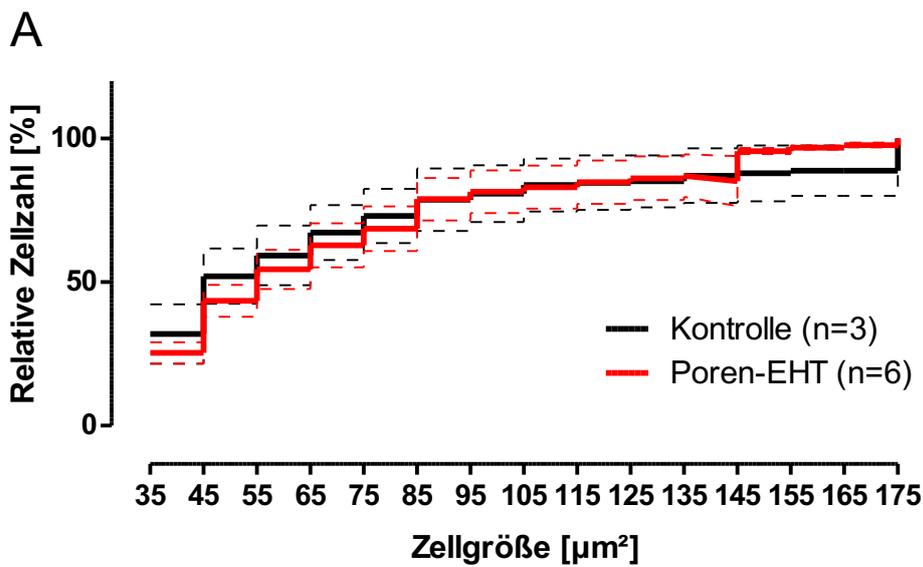


Abb. 3.16 Zellgrößenbestimmung der Dystrophin-gefärbten 6w6p-EHTs. **A:** Relative Häufigkeit unterschiedlicher Zellgrößen in Kontroll- und Poren-EHTs. Statistik: Mittelwert + SEM; Two-Way ANOVA mit Bonferroni Post-Test: n.s.. **B:** Querschnittsflächen der 30 größten Zellen im EHT-Querschnitt (Kontrolle n=3 EHTs; 90 Zellen; Poren n=8 EHTs; 240 Zellen). Statistik: Mittelwert + SEM, Student's t-Test $p < 0,05$ Kontrolle vs. Poren.

Bezüglich der Zellzahl zeigte sich jedoch eine signifikant höhere Zelldichte in den Poren-EHTs (Kontrolle: $21 \pm 9,5$ Zellen/mm² vs. Poren: 443 ± 225 Zellen/mm²; Abb. 3.17).

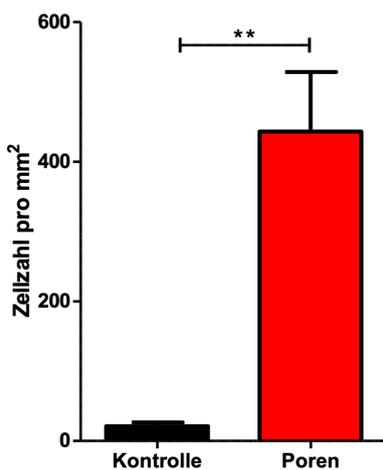


Abb. 3.17 Zellzahl aller Zellen >40 μm^2 in der Kontroll- und Porengruppe. Die Zellzahl ist in der Porengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Statistik: Mittelwert + SEM, Kontrolle: $n=3$; Poren: $n=7$, Student's t -Test $**p<0,005$ Kontrolle vs. Poren.

3.2.5 DNA-Analyse

Die großen Zellzahlunterschiede leiteten zur Annahme, dass folglich auch mehr DNA in den Poren-EHTs vorlag. Wir ermittelten den DNA-Gehalt durch eine Trizol-Auftrennung in den unterschiedlich hergestellten EHTs. Dabei wurde zwischen dem DNA-Gehalt in Kontroll-EHTs ($n=3$) und Poren-EHTs ($n=6$) unterschieden. Da zur Herstellung der EHTs stets 6 Millionen *NRCM* verwendet wurden, bestimmten wir auch den DNA-Gehalt in 6 Millionen reinen *NRCM* als Ausgangslage. Da die EHTs am 21. Inkubationstag unterschiedliche Dimensionen und damit auch Gewichte aufwiesen (Abb. 3.18 links) und nur ein Teil des EHTs zur Isolation von DNA herangezogen wurde, bezogen wir den DNA-Gehalt auf die EHT-Masse. Wie erwartet zeigte sich in der Interventionsgruppe ein signifikant höherer DNA-Gehalt. Des Weiteren zeigte sich wider Erwarten, dass der DNA-Gehalt in der Interventionsgruppe (Poren-EHTs) nach 21 Tagen Kulturdauer tendenziell höher war als in der Ausgangszellmenge (Abb. 3.18 rechts).

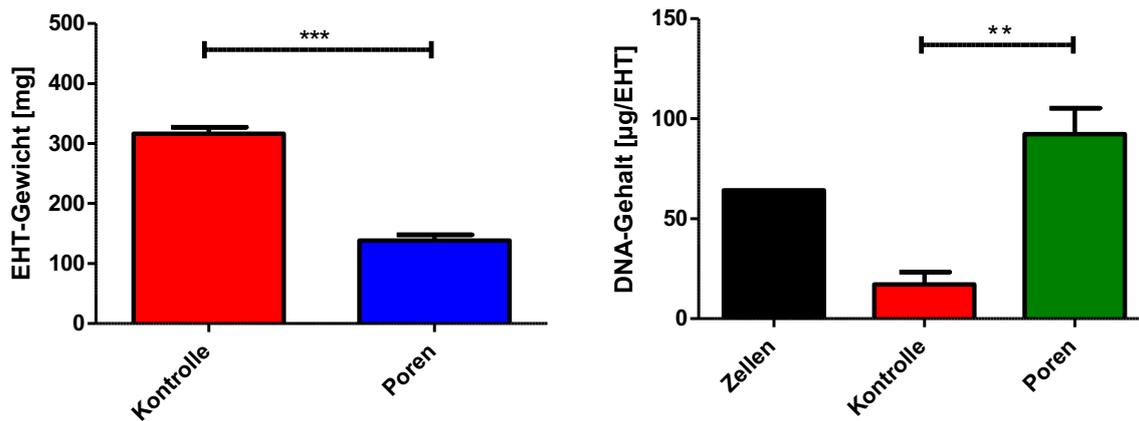


Abb. 3.18 Gewicht und DNA-Gehalt Poren-EHT vs. Kontroll-EHT. Links: Gewicht unterschiedlich hergestellter EHTs an Tag 21. Kontroll-Gruppe ($n=3$), Poren-Gruppe ($n=6$). Statistik: Mittelwert + SEM, Student's *t*-Test $***p<0.0001$ Kontrolle vs. Poren. Rechts: DNA-Gehalt von Kontroll-EHTs ($n=3$) und Poren-EHTs ($n=6$) am 21. Inkubationstag. Zum Vergleich wurde auch die DNA in 6 Millionen NRCM pur („Zellen“; $n=1$) gemessen. Student's *t*-Test $**p<0.0001$ Kontrolle vs. Poren.

3.2.6 RNA-Analyse

Schließlich wollten wir untersuchen, ob zusätzlich zur erhöhten Zellzahl eine mögliche Veränderung der Genexpression die Kraftsteigerung in den Poren-EHTs erklären könnte. Daher wurde mittels *RNeasy Kit* (Qiagen) die RNA aus den beiden EHT-Gruppen (Kontroll-EHTs $n=3$; Poren-EHTs $n=3$) isoliert und mittels quantitativer Echtzeit PCR (RT-qPCR) die Expression einiger Gene untersucht, die eine Kraftänderung der EHTs auf Transkriptionsebene erklären könnten (vgl. Tabelle 2.2).

In Abb. 3.19 wurden die Ergebnisse der RT-qPCR dargestellt. Eine One-way ANOVA mit *Dunnet's multiple Comparison Test* zeigte, dass keine signifikanten Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene vorhanden ist ($p<0,05$). Dabei wurde die Expression von Genen untersucht, die die EHT-Qualitätsverbesserungen erklären könnten: Glucuronidase (Gusb; Enzym zur Spaltung der Glucuronsäure), 18s rRNA (18s; kleine ribosomale Untereinheit), α -skeletales Aktin (Actc1; Strukturprotein des kontraktilen Apparates), Schwere Kette des β -Myosin (Myh7; Protein des kontraktilen Apparates; primär in fetalem Rattenherzgewebe exprimiert), Schwere Kette des alpha-Myosin (Myh6; Protein des kontraktilen Apparates; primär in adultem Rattenherzgewebe exprimiert), SERCA2a (Atp2a2, sarcoplasmatische Ca^{2+} -ATPase 2), *Cardiac muscle troponin T* (cTNNT2, Tropomyosin-bindende Untereinheit des Troponin), Gap junction alpha-1 (GJA1 = Connexin 43;

Ergebnisse

Interzelluläre Kommunikation der Gap Junction), Titin (Ttn = Connectin; Strukturprotein des Sarkomers), Hypoxie-induzierter Faktor (Hif1a; Transkriptionsfaktor zur Versorgung der Zelle mit Sauerstoff).

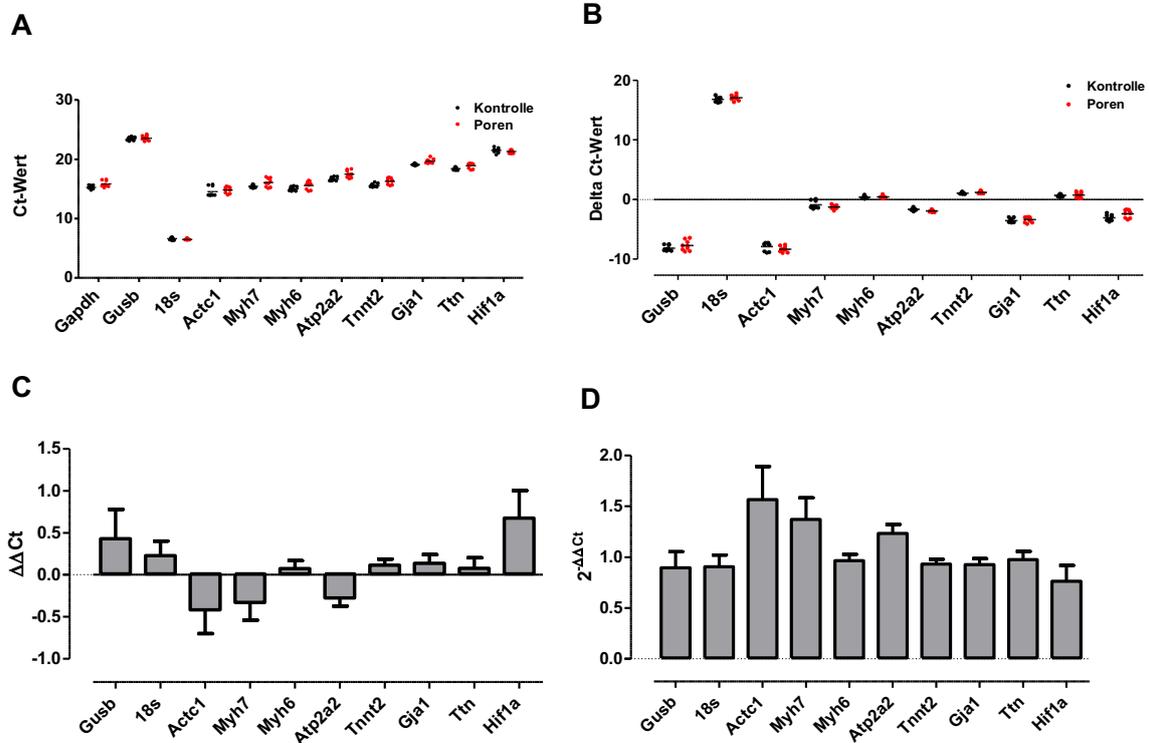


Abb. 3.19 Transkriptionsanalyse. Mithilfe der RT-qPCR wurde die Transkription unterschiedlicher Gene in der Kontroll- vs. Porengruppe untersucht. **A:** Ct-Werte der untersuchten Gene. **B:** Delta Ct-Wert der untersuchten Gene. **A+B:** Scatter plot und Mittelwert + SEM. **C:** Delta Delta Ct-Wert der untersuchten Gene. **D:** 2- $\Delta\Delta$ Ct-Wert der untersuchten Gene. **C+D:** Mittelwert + SEM.

Für die Bestätigung der RT-qPCR Ergebnisse und zum Ausschluss von möglichen Verunreinigungen durch genomischer DNA erfolgte die Untersuchung ausgewählter Gene mittels einer Gelelektrophorese. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese sind in der Abb. 3.20 abgebildet und zeigen keinen Hinweis auf eine solche Verunreinigung.

Ergebnisse

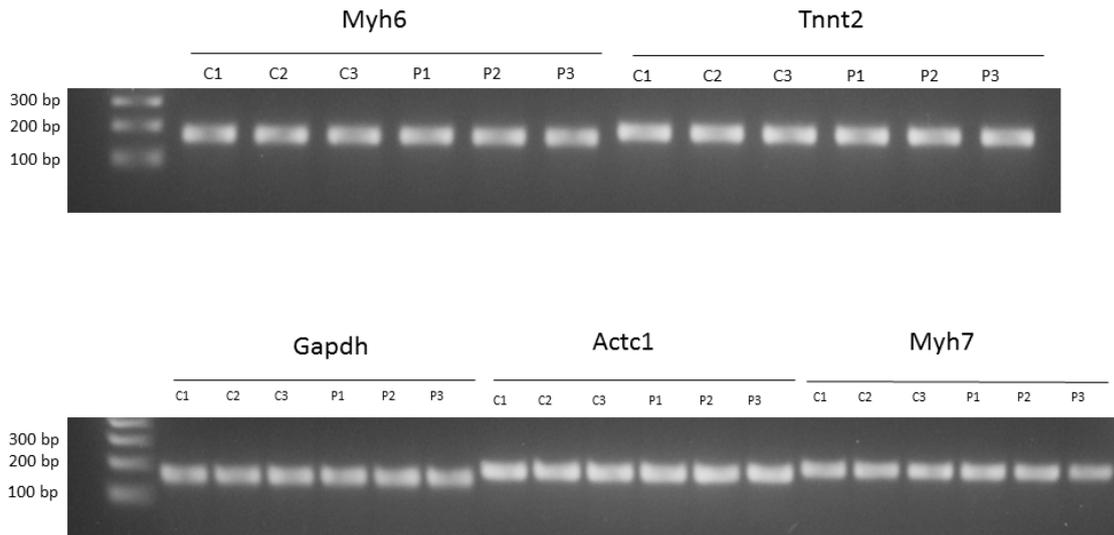


Abb. 3.20 Gelelektrophorese der PCR-Produkte. Die Untersuchung von jeweils drei Kontroll-EHTs (C1-C3) und drei Poren-EHTs (P1-P3) ergab Amplifikationsprodukte in der erwarteten Laufhöhe. Untersucht wurde die Genexpression der Gene Myh6, Tnnt2, Gapdh, Actc1 und Myh7 in Kontroll- und (C1-C3; n=3) Poren-EHTs (P1-P3; n=3). Die Intensität der Signale zeigt in keinem untersuchten Gen Unterschiede zwischen der Kontroll- und Poren-Gruppe.

3.3 Scale-up – Generierung eines EHTs im Maßstab eines Transplantats für Menschen

Schließlich wollten wir die Größe der EHTs maximieren, um Transplantate zu generieren die für die Gewebeersatztherapie am Menschen geeignet wären. Dafür haben wir unser Protokoll zur Herstellung von Poren-EHTs auf ein 1-well-EHT übertragen. Aufgrund der gleichmäßigen Säulenverteilung nutzten wir dafür eine PDMS-Schablone (Abb. 3.21 A) und erhielten ein makroskopisch kontrahierendes EHT mit den Maßen 6 cm x 4 cm (Abb. 3.21 B).

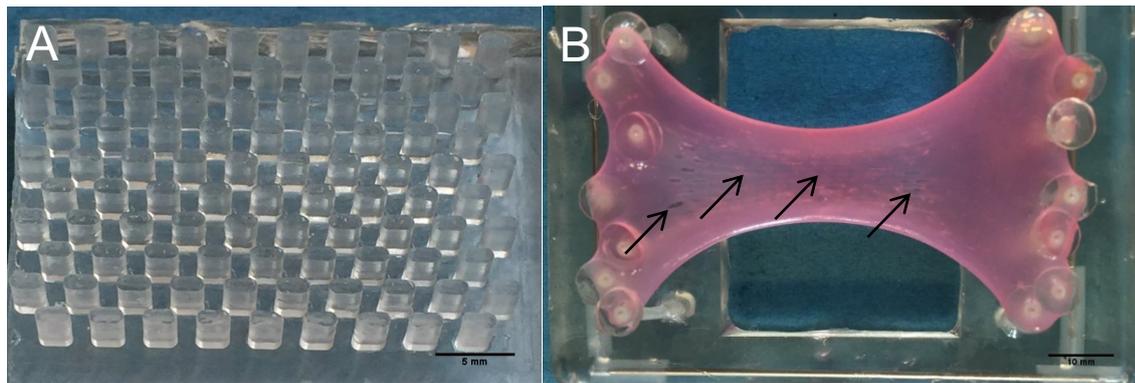


Abb. 3.21 1-well-EHT. **A:** Silikonhalterung für die Generierung ellipsenförmiger Poren an 1-well-EHTs. Maßstabsbalken 5 mm. **B:** Ein 6 cm x 4 cm großes 1-well-EHT am 21. Inkubationstag an ihrer Silikonhalterung. Die schwarzen Pfeile zeigen einige der zusammengefallenen Poren am EHT. Maßstabsbalken 10 mm.

Die histologische Untersuchung des 1-well-EHTs bestätigte die Übertragbarkeit und Reproduzierbarkeit der erarbeiteten Protokolle zur Herstellung von Poren-EHTs auf größere EHT-Formate. Im Einzelnen fertigten wir dazu Dystrophin-gefärbte Querschnitte vom 1-well-EHT. Für die bessere Darstellung der EHT-Größe im Querschnitt und der darin enthaltenen Poren haben wir mehrere Einzelbilder mithilfe der Software ICE (*Image composite editor*) zusammengesetzt. Die Software erstellte dabei aus mehreren überlappenden Bildern ein Panoramabild (Abb. 3.22 A). Die Detailansicht zeigte, dass das Zellüberleben und die Zellverteilung auch in größeren EHT-Dimensionen verbessert war (Abb. 3.22 B).

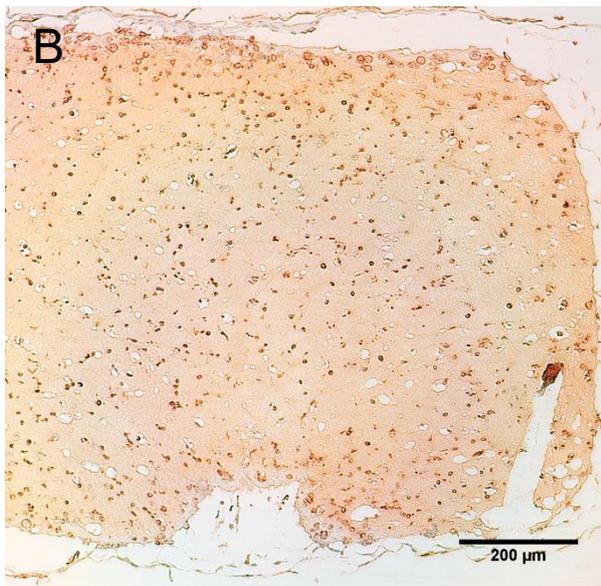
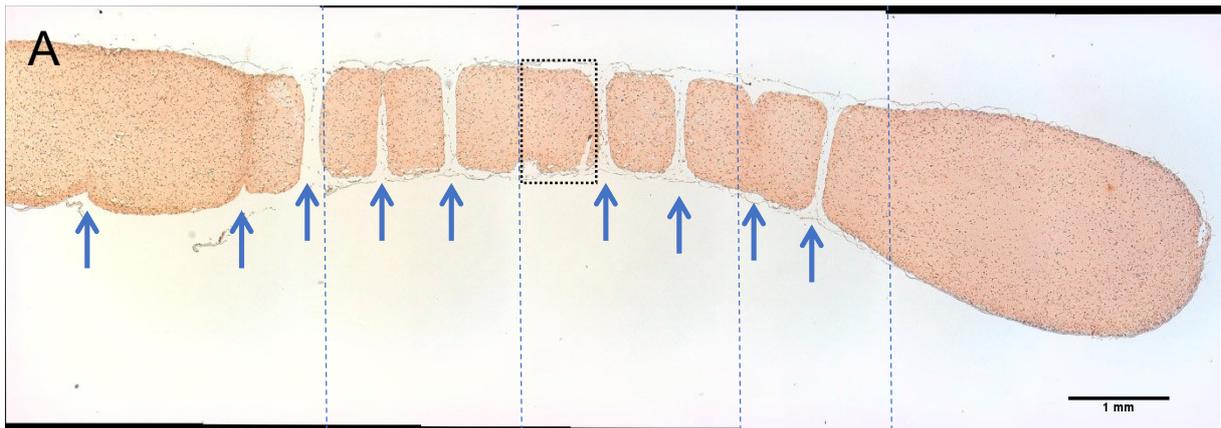


Abb. 3.22 Dystrophin-gefärbtes 1-well-EHT im Querschnitt. A: Aus mehreren Einzelbildern zusammengesetztes Panoramabild eines im Querschnitt abgebildeten 1-well-Poren-EHT. Die gestrichelten Linien in blau zeigen die Grenzen einzelner Bilder an. Die Poren im EHT sind mit blauen Pfeilen markiert. Maßstabsbalken 1 mm. B: 10x Vergrößerung des in A gezeigten EHTs. Maßstabsbalken 200 µm.

4. Diskussion

4.1 Entwicklung der Methodik

4.1.1 Das Grundprinzip

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Herstellung von großen 1-well-EHTs erarbeitet, die ein größeres Zellüberleben über das gesamte EHT und eine größere Kraftentwicklung ermöglichen. Die Methode beinhaltet die künstliche Einarbeitung von Poren in die bis zu $60 \times 40 \times 3,6 \text{ mm}^3$ großen 1-well-EHTs. Inwieweit dieser Ansatz zur Gewebeersatztherapie im Kleintiermodell und später auf den Menschen übertragbar ist, wurde in dieser Arbeit nicht geprüft und bleibt Ziel zukünftiger Studien.

4.1.2 Künstliches Herzmuskelgewebe – EHT

Im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie wurde die Herstellung von 24-well-EHTs auf Basis von Fibrin als Matrix etabliert (Hansen et al. 2010). Die selbstständig kontrahierenden EHTs sind in der Lage nach einer Kulturzeit von sieben bis neun Tagen selbstständig kohärent zu kontrahieren (Hansen et al. 2010). Das Protokoll zur Herstellung dieser EHTs ist gut reproduzierbar und ermöglicht ihre Herstellung mit einer Größe von $12 \times 2,5 \times 3,3 \text{ mm}^3$ unter sterilen Bedingungen. Des Weiteren existieren etablierte Methoden zur Kontraktionsmessung dieser EHTs (videooptische Messapparatur vgl. 2.5.1; Hansen et al. 2010).

In vorangegangenen Arbeiten im Institut konnte gezeigt werden, dass es technisch möglich ist, durch leichte Abwandlungen des Protokolls von Hansen et al. auch größere, flächenförmige 6-well-EHTs mit einer Größe von $\leq 25 \times 15 \times 3,6 \text{ mm}^3$ zu generieren (Sörensen, 2013; Vollert, 2013), die spontan kontrahieren. Die Vergrößerung des EHT-Formates bedingt allerdings ein erhöhtes Zellabsterben in den innersten EHT-Schichten, wahrscheinlich weil die Nährstoffversorgung in diesen – auf Hydrogel basierten – EHTs auf Diffusion besteht. Die Gruppe um Radisic et al. konnte zeigen, dass das Diffusionslimit bei etwa $100 \mu\text{m}$ liegt (Radisic et al. 2006), sodass die Zellen im Innersten des EHTs nicht genug Nährstoffe erhalten und folglich absterben. Daraus ist zu schließen, dass, solange EHTs nur im Medium hängend inkubiert werden, lediglich die äußeren $100 \mu\text{m}$ des Gewebes optimal mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Da jedoch für die therapeutische Nutzung als Transplantat in Form von *Patches* – am ausgewachsenen Menschenherzen – EHTs mit mehreren Millimetern Dicke

notwendig sind, gilt es die Nährstoffversorgung der inneren Zellschichten zu verbessern, bis nach der Implantation die Vaskularisierung und damit die Nährstoffversorgung der *Patches* durch die Koronargefäße des nativen Herzens eingreift. Da die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der EHTs den limitierenden Faktor zur Vergrößerung der EHTs darstellte, wurde das Ziel verfolgt diese zu verbessern. Dabei fiel die Entscheidung auf einen theoretisch einfachen Ansatz, nämlich der Verkürzung der Diffusionsstrecke durch den Einbau von Poren in den EHTs. Die Austestung des Poreneffekts erforderte zunächst die Vergrößerung der EHT-Flächen, damit Poren in diese eingebaut werden konnten. Daher wurden unterschiedliche EHT-Größen getestet, die im Folgenden diskutiert werden.

4.1.3 Wahl des EHT-Formats

Für die Grundsatz-Versuche zur Austestung des Poren-Effekts auf die EHT-Qualität musste zunächst das ideale Format festgelegt werden. Hierfür wurden unterschiedliche EHT-Formate untersucht, um die bestmögliche EHT-Größe für die anstehenden Versuche zu ermitteln (Tabelle 4.1).

Die kleinen und größeren, streifenförmigen *24-well-* und *6-well-2-post-*EHTs waren einfach herzustellen, da im Institut bereits zahlreiche EHTs dieser Größe hergestellt wurden und daher das Zubehör für ihre Herstellung, wie z. B. Silikonhalterungen und *Spacer*, bereits existierten. Des Weiteren erforderten diese EHT-Größen nur geringe Mengen an *NRCM* (vgl. Tabelle 4.1). Jedoch erwies sich die Handhabung dieser EHT-Größen als schwierig. Sie hatten nicht genug Fläche für die Manipulation mithilfe von Schablonen. Das sogenannte *6-well-6-post-*Format (*6w6p-*Format) war ein breites Format, bei dem die EHTs zwischen *6-Posts* hingen. Das *6w6p-*Format bot aufgrund der Größe von $25 \times 15 \times 3,6 \text{ mm}^3$ genug Fläche für die Generierung von Poren und brauchte zugleich nur einen Bruchteil der Ressourcen eines größeren *1-well-*EHTs, welches für die Anwendung am Menschen passend wäre (6×10^6 Zellen vs. 38×10^6 Zellen). Weiterhin konnten für die *6w6p-*EHTs industriell-erhältliche *6-well-*Zellkulturschalen (Nunc®) verwendet werden, was das steril Halten der *6w6p-*EHTs im Vergleich zu den *1-well-*EHTs erleichterte. Es wurde folglich entschieden, die grundlegenden Versuche an EHTs dieser Größe vorzunehmen, bevor am Ende die gewonnenen Erkenntnisse auf ein *1-well-*EHT übertragen wurden (vgl. 3.3).

Tabelle 4.1: Tabellarische Darstellung unterschiedlicher EHT-Formate mit entsprechender EHT-Volumina und -Zellzahl.

EHT-Format	Format [mm ³]	Volumen [μ l]	Zellzahl [10^6]
24-well	12 x 3 x 3	100	0,4
6-well-2post	25 x 5 x 5,6	700	3,1
6-well-6post	25 x 15 x 3,6	1350	6,0
1-well	60 x 40 x 3,6	8550	38

Mit der Wahl des 6w6p-Formats gingen auch einige Probleme einher. Während für die bereits im Institut etablierte Herstellung des 24-well-Formats die Silikonhalterungen industriell angefertigt wurden (Siltec GmbH & Co. KG), mussten die breiteren Silikonhalterungen für das 6w6p-Format in der institutseigenen Werkstatt manuell angefertigt werden. Daraus folgte ein erhöhtes Maß an Heterogenität zwischen den einzelnen Fertigungsprodukten, wobei der Einfluss auf die Variabilität der entsprechenden EHT-Qualität nicht bekannt ist. Die gegossenen Silikonposts der Silikonhalterungen aus Eigenproduktion zeigten zudem ein anderes Widerstandsverhalten als die kleineren, industriell angefertigten Silikonposts, sodass die auf der Silikonpostdeflektion beruhende Kontraktionsmessung mithilfe der Vandenburgh'schen Formel eine weitere Herausforderung darstellte. Für die Nutzung der Formel musste daher den Elastizitätsmodulus neu berechnet werden (vgl. 3.2.1).

4.1.4 Vergleich der Schablonen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche Schablonen zur Herstellung von Poren im EHT untersucht. Die Gelatine- und Agarose-Methoden beinhalteten viele Schwierigkeiten. Ihre Nachteile waren, dass die Agarose und die Gelatine aufwendig hergestellt werden mussten und die Herstellung der hohen Konzentrationen mit höheren Kosten (Gelatine: 0,38 €/g; Agarose: 1,45 €/g) verbunden war, zumal diese auch nicht wiederverwendet werden konnten. Die Schablonen wurden jedes Mal frisch angesetzt, und die Generierung der Säulen erforderte eine ruhige Hand bei der Entnahme der *Spacer* aus der Gelatine bzw. Agarose. Dies führte dazu, dass oft Säulen beschädigt wurden oder sogar abrissen. Es gelang durchschnittlich bei drei von fünf Versuchen (n=3) die gewünschte Anzahl unbeschädigter Säulen zu generieren – schlussendlich wies diese Methode also ein nicht ausreichendes Maß

an Robustheit auf. Ein weiteres Defizit war, dass die höher konzentrierten Agarose- und Gelatine-Lösungen andere Temperatureigenschaften aufwiesen als die niedriger konzentrierten. Die höher konzentrierten Flüssigkeiten wurden nämlich bereits innerhalb von ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur fest. Dies limitierte zeitlich stark die Formung der Schablonen, sodass der Transport der Agarose- und Gelatine-Lösung aus dem 60 °C-Ofen zur Werkbank, die Umfüllung der Agarose- und Gelatine-Lösung in die *6-well*-Kulturschale und die Positionierung der *Spacer* in die Flüssigkeiten sehr schnell erfolgen musste. Im speziellen Fall der Gelatine wurde die Arbeit zusätzlich durch die weiteren Temperatureigenschaften der Gelatine erschwert. Diese hat nämlich die Eigenschaft bei >37 °C flüssig zu werden (Golden and Tien 2007). Die Hoffnung, sich diese Eigenschaft durch das Formen von Poren beim Abfließen der Gelatine aus den EHTs im Inkubator bei 37 °C zunutze zu machen, erfüllte sich nicht. Stattdessen ummantelte die Gelatine die EHTs, da keine geeignete Methode zum sterilen Ablassen der verflüssigten Gelatine gefunden werden konnte. Trotz der Ummantelung der Gelatine konnte in einigen Fällen ein unbeschädigtes EHT mit Poren aus der Schablone entnommen werden. Insgesamt erforderte die korrekte Herstellung der Säulen mithilfe der Agarose- und Gelatine-Lösung eine hohe technische Sorgfalt. Des Weiteren war das Design der Schablonen limitiert. Die Säulendurchmesser konnten Werte <1,5 mm nicht unterschreiten, da die Säulen sonst aufgrund ihrer Konsistenz bei der *Spacer*-Entnahme abrissen. Weiterhin mussten die Säulen rund sein, damit bei der *Spacer*-Entnahme stets dieselbe Kraft von allen Seiten auf die Säulen einwirkte.

Auch die Verwendung der PEEK-Schablonen stellte sich als ungeeignet dar, denn auch mit Pluronic®-Vorbehandlung scheiterte die EHT-Entnahme aus der Schablone. Am ehesten lag dies an der Materialhärte des PEEK, denn bei der Entnahme der EHTs aus der Schablone bogen die steifen Säulen nicht mit, sodass das EHT stets einriss.

Die PDMS- und PTFE-Schablonen stellten die einfachste und geeignetste Methode dar, Poren in den EHTs zu generieren. Die Säulen waren fest und zugleich biegsam und ermöglichten die Generierung sauberer Poren. Der Durchmesser der PTFE-Säulen betrug nur noch 0,5 mm, sodass theoretisch mehr Poren in die EHTs eingebaut werden und auf diese Weise durch Diffusion die EHT-Bereiche besser erreicht werden konnten. Die Nachteile der PTFE-Methode waren, dass einerseits die Form der rundlichen Schläuche nicht variabel war und diese andererseits per Hand an eine PTFE-Matte geklebt werden mussten, sodass die Abstände der Säulen im Endprodukt variierten. Im Falle der PDMS-Schablone konnten die Säulen jeden beliebigen Abstand und jede Form (rund oder ellipsenförmig) annehmen, zumal sie aus einem PEEK-Vordruck gegossen werden können (vgl. 3.1.5). Schlussendlich konnten sowohl die PTFE- als auch die PDMS-Schablonen autoklaviert und wiederverwendet werden, was Kosten

einspart und diese Methoden reproduzierbar macht. Folglich fiel die Entscheidung für die Generierung der *6w6p*-EHTs auf die PTFE- und PDMS-Schablonen.

Da die Herstellung der Poren mithilfe von Agarose und Gelatine nicht unmöglich war, wurden auch einige EHTs mit jenen Schablonen generiert. Für die Herstellung der *1-well*-EHTs wurden die detailliert hergestellten PDMS-Schablonen genutzt, da auf diese Weise die Dichte der Poren erhöht werden konnte.

4.2 Entwicklung des Messverfahrens: Kontraktionskraft

Im Rahmen vorangegangener Arbeiten (Hansen et al. 2010a; Schaaf et al. 2011) wurde im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eine Methode zur Messung der Kontraktionsqualität von *24-well*-EHTs etabliert. Die Methode beruht auf einem video-optischen Analyseverfahren. Dabei werden im Einzelnen die *Posts* an den EHT-Enden halbautomatisch vom Gerät erkannt und ihre Auslenkung während einer Kontraktion im mm-Bereich gemessen. Die Daten werden daraufhin von der Software mithilfe der eingespielten Vandenberg'schen Formel (Abb. 2.2) in absolute Kontraktionskraft, Kontraktionsfrequenz, T1-Zeit und T2-Zeit umgewandelt und in Form einer PDF-Datei wiedergegeben.

4.2.1 Messverfahren – Automatische vs. manuelle Kontraktionsmessung

Die automatische Kontraktionskraftmessung mithilfe der video-optischen Messapparatur erforderte die Überlistung des Geräts (vgl. 2.5.1) und erlaubte die Kontraktionskraftmessung einer großen Anzahl von EHTs innerhalb kürzester Zeit in wenigen Schritten. Bei näherer Betrachtung der zugrundeliegenden Überlistung der Messapparatur durch das Konvertieren der Videos fällt jedoch auf, dass hierbei einzelne Bilder, die eventuell die maximale *Post*-Auslenkung wiedergeben, durch die Bildfrequenzanpassung (vgl. 2.5.1) übersprungen werden können und auf die Weise nicht die tatsächliche *Post*-Auslenkung erfassen. Um diesen Fehler in Zukunft zu umgehen, ist es essentiell, auch das Originalvideo mit einer Abtastrate von 100 *frames per second* aufzunehmen, was in unserem Fall leider nicht zu Beginn der Studie bekannt und möglich war.

Da nur eine überschaubare Anzahl an EHTs untersucht wurde (Poren-EHTs, n=19; Kontroll-EHTs, n=9; vgl. 3.2.2) und die Kontraktionskraft genauer ermittelt werden sollte, erfolgte die Messung der *Post*-Auslenkung zusätzlich manuell mithilfe der Software *ImageJ*. Dabei wurde die aufgenommene Videosequenz der EHTs in viele Einzelbilder umgewandelt. Der Vorteil ist, dass jede Kontraktion durch die vielen Einzelbilder in ihrem weitesten und kürzesten *Post*-Abstand in Diastole und Systole erfasst werden konnte und dadurch eine genauere

Bestimmung der maximalen Kontraktionskraft der EHTs möglich war. Die Bestimmung der durchschnittlichen Kraftentwicklung der EHTs innerhalb einer 30-Sekunden-Videosequenz würde die manuelle Messung der *Post*-Auslenkung einer jeden Kontraktion beinhalten. Aus zeitlichen Gründen wurden daher lediglich die drei größten Kontraktionen in jedem EHT gemessen. Hieraus ergibt sich auch ein Nachteil dieser Methode, denn sie ist aufgrund des Aufwandes sehr zeitintensiv und trotz der Genauigkeit nicht für standardisierte Qualitätskontrollen geeignet, zumal auch untersucherabhängig die *Post*-Markierungen und damit die Kontraktionskraft variieren können. Dem könnte zusätzlich entgegengewirkt werden, indem die Untersuchungen zukünftig verblindet verlaufen.

Die beiden vorgestellten Messmethoden sind optische Analysemethoden, die die Muskelbewegung messen. Die Methoden haben den Vorteil, dass sie stets steril durchführbar sind, da die Kontraktionen mithilfe einer Kamera in der durchsichtigen Zellkulturschale zu jeder Zeit aufgezeichnet werden können. Hinzu kommt im Falle der manuellen Messung, dass der apparative Aufwand sehr niedrig und kostengünstig ist, da lediglich eine Videokamera, die Freeware-Softwares *VirtualDub* zur Videosequenz-Bildersequenz-Umwandlung und *ImageJ* zur Analyse benötigt werden.

Eine weitere Methode, die die Messung der Kontraktionskraft von größeren EHTs standardisiert und steril ermöglicht, stellt die im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie in Zusammenarbeit mit der Technischen Universität Hamburg-Harburg (Dissertationsprojekt von Christoph Warncke) entwickelte Methode der Kontraktionskraftmessung auf Basis von piezoelektronischen Biegewandlern dar. Das Gerät besteht aus einem Biegewandler, dem von zwei Seiten spezielle Keramiken aufliegen, deren Polarisierung parallel ausgerichtet ist. Durch die Einwirkung einer mechanischen Kraft auf den Biegewandler entsteht eine elektrische Ladungsbewegung, wodurch die einwirkende Kraft ermittelt werden kann (Dissertation von Ingra Vollert, 2013). Diese Methode ermöglicht die parallele Analyse mehrerer EHTs unter sterilen Bedingungen, da bis zu sechs EHTs gleichzeitig an ein PC angeschlossen werden und ein Excel-basiertes Analyse-System die EHT-Kontraktionen in Form von Strominduktionen wiedergibt. Im Labor lagen vier Piezosysteme vor, die in vorangegangenen Arbeiten verwendet wurden. Allerdings waren diese für $6w2p$ -EHTs konzipiert, sodass sie für den Einsatz an $6w6p$ -EHTs umgebaut werden mussten. Die Versuche, diese Piezosysteme stabil umzubauen, scheiterte jedoch. Aufgrund der zeitintensiven Fertigung neuer $6w6p$ -Piezosysteme (mehrere Wochen) wurde davon abgesehen diese Methode zu nutzen, zumal einfachere Messmethoden zur Verfügung standen. Denn bei unseren Versuchen handelte es sich eher um den relativen Vergleich der Kontraktionskräfte von Kontroll- und Poren-EHTs und weniger um die absoluten Kontraktionskräfte, sodass das ausgewählte Verfahren der manuellen

Kontraktionskraftmessung mithilfe der Software *ImageJ* mit der Vandeburgh'schen Formel eine ausreichende Methode der Kontraktionskraftbeurteilung darstellte.

Mit der Veröffentlichung des MUSCLEMOTION Algorithmus (Sala et al. 2018) steht eine weitere Methode zur Verfügung, die, basierend auf der Veränderung von Pixelintensitäten, die automatische Kontraktionsanalyse von EHTs ermöglichen könnte. Leider stand diese Software erst nach dem Ende dieses Dissertationsprojektes zur Verfügung und konnte daher nur exemplarisch an Videos von 6w6p-EHTs im Institut für Experimentelle Pharmakologie auf die prinzipielle Eignung getestet werden. Für die Zukunft stellt diese Methode aber sicher eine wertvolle Alternative dar und sollte näher untersucht werden.

4.2.2 Kontraktilität der Poren-EHTs vs. Kontroll-EHTs

Die im Ergebnisteil (Kapitel 3.2.2) gezeigten Kontraktionskraftmessungen zeigen, dass das Generieren von Poren in den EHTs zu einer Steigerung der Kontraktionskraft führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Kontroll-EHTs eine durchschnittliche Kraftentwicklung von $1,39 \pm 1,32$ mN aufweisen, wobei das stärkste EHT eine Kontraktionskraft von 3,79 mN aufweist ($n=9$). Dem gegenübergestellt sind die gemessenen Kontraktionskräfte der Poren-EHTs mit einer durchschnittlichen Kraftentwicklung von $3,40 \pm 2,27$ mN, wobei das stärkste EHT eine Kontraktionskraft von 8,82 mN zeigte ($n=19$). Damit zeigte die Porengruppe rechnerisch eine durchschnittliche Kontraktionskraftsteigerung von 244% ($1,39$ mN vs. $3,40$ mN), wobei das am stärksten kontrahierende EHT der Porengruppe 6,3-fach stärker kontrahierte als ein durchschnittliches Kontroll-EHT ($8,82$ mN vs. $1,39$ mN).

Neben der Kontraktionskraftsteigerung ist aus dem Graphen eine starke Varianz in der Kontraktionskraftentwicklung innerhalb der Gruppen zu erkennen. Die Ursache wurde in dem unterschiedlichen *Remodeling* der EHTs vermutet. Im Laufe der Kultur veränderte sich die Form der Poren-EHTs in unterschiedlichen Ausmaß, sodass eine Querschnittsflächenmessung der EHTs erfolgte, um die Unterschiede in der EHT-Geometrie zu quantifizieren. Schließlich wurde diese in Beziehung zur entwickelten Kontraktionskraft gesetzt. Dabei zeigte sich, dass die EHTs aus der Porengruppe signifikant kleinere Querschnittsflächen als die aus der Kontrollgruppe aufwiesen ($1,81 \pm 0,39$ mm² vs. $2,81 \pm 0,16$ mm²). Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass das anfängliche EHT-Volumen nach dem Beginn der Kontraktionen und der Verknüpfung der Kardiomyozyten zum Zellnetzwerk abnimmt (Hansen et al. 2010; Shaikh et al. 2008). Diese Volumenabnahme ist am ehesten auf den Verlust der Fibrinmatrix zurückzuführen und geht nicht mit einer Verminderung der Zellzahl einher (vgl. 3.2.4.3). Die Ursache für die signifikante Verringerung der EHT-Querschnittsflächen in der Porengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nicht geklärt werden. Beobachtungen vom leichter quantifizierbaren 24-well-Maßstab lassen jedoch

auf einen mechanischen Einfluss durch Muskelkontraktion schließen, da ein ausgeprägtes Maß an *Remodeling* in der Regel mit hinreichend guter Kontraktilität einhergeht. Die verringerte Querschnittsfläche der Poren-EHTs könnte wiederum deren Nähr- und Sauerstoffversorgung durch kürzere Diffusionsstrecken verbessert haben und infolgedessen für das größere Zellüberleben, die Zellgrößenzunahme und die stärkere Kontraktionskraft verantwortlich sein. Des Weiteren ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass sich die Ausgangsdicke der unterschiedlichen EHT-Gruppen unterscheidet, da beim Gießen der Poren-EHTs die Säulen in der Schablone den Mastermix verdrängen, sodass insgesamt dickere Poren-EHTs mit demselben Volumen entstehen. Rechnerisch ändert sich die EHT-Ausgangsdicke – in Gegenwart einer Agarose-Schablone mit 12 Säulen à 1 mm Dicke – von 3,6 mm auf 3,9 mm. Inwiefern die Ausgangsdicke der EHTs eine Rolle bei der Qualität spielt, bleibt Fragestellung zukünftiger Versuche.

Die Ermittlung der Kontraktionskraft pro Fläche zeigte zwar deutlichere Unterschiede zwischen den getesteten Gruppen als die absoluten Kontraktionskräfte ($p=0,021$ vs. $p=0,008$), dennoch konnte die größere Streuung der Kontraktionskraft v. a. innerhalb der Porengruppe nicht abschließend geklärt werden ($1,86 \pm 1,28$ mN/mm²). Mögliche allgemeine Ursachen für die schwankenden Kontraktionskräfte innerhalb einer Gruppe können trotz hoch standardisierter Arbeitsschritte und Kulturbedingungen technische Fehler sein, die nicht auszuschließen sind. Beispielsweise kann ein Pipettierverlust von nur 5 µl – ausgehend von 20 Millionen NRCM pro Milliliter Zellsuspension – die Zellzahl im EHT um 100.000 Zellen beeinflussen. Auch die Verteilung des Mastermixes um die Säulenspacer geht mit einem gewissen Maß an Ungenauigkeit einher, sodass nicht 100%ig gewährleistet sein kann, dass am einen Ende des EHTs nicht etwas mehr Zellen lokalisiert sind, als am anderen Ende. Des Weiteren entstanden die verglichenen EHTs aus unterschiedlichen *Chargen*. Grundsätzlich sind chargenabhängige Schwankungen in den EHTs bekannt (Hansen et al. 2010). Die Tatsache, dass die NRCMs aus unterschiedlich alten neonatalen Ratten bestehen, die zwischen null und drei Tagen alt sind (vgl. 2.4.1), verstärkt die chargenabhängige Varianz. Es wäre denkbar, dass die NRCMs je nach Rattenalter unterschiedliche Differenzierungsgrade und Hypoxieresistenzen aufweisen. All dies unterstreicht die Notwendigkeit, idealerweise stets Interventions- und Kontrollgruppen aus derselben Charge zu vergleichen (gepaarte Analysen). Aus technischen und logistischen Gründen (z.B. hohe Nachfrage an Zellen bei den Kollegen, missglückte EHT-Generierung) war dies jedoch nicht immer möglich.

Der Einfluss unterschiedlicher Kraftlinien ist wahrscheinlich ein Hauptgrund für die verbesserte Kontraktilität der EHTs der Porengruppe. Durch die Manipulation der EHTs wird die Zellorientierung beeinflusst. Die Immunfluoreszenzbilder (Abb. 3.12) stellen die Zellorientierung entlang der Poren dar. Dabei zeigt sich eine deutliche Ausrichtung der α -

Aktinin-gefärbten Kardiomyozyten entlang der Kraftlinien. Des Weiteren zeigten unsere Untersuchungen eine deutliche Zunahme der Kardiomyozytendichte zum Inneren des EHTs. Die Orientierung und die Elongation der Kardiomyozyten sind vermutlich durch die stärkere Stressaussetzung der Zellen um die Poren und die bessere Nähr- und Sauerstoffversorgung zu erklären.

Der Einfluss der Poren auf die Zellausrichtung und Kraftlinien verdeutlicht die Bedeutung von Porenkonstellation, Porengeometrie und Anzahl der Poren. Für die Ausbildung gleichmäßiger Kraftlinien ist es demzufolge notwendig, hochstandardisierte Schablonen zu nutzen. Die untersuchten EHTs wurden durch unterschiedliche Schablonen generiert (vgl. 3.1) und als Poren-Gruppe zusammengefasst. Dabei ist hervorzuheben, dass die Anzahl der Poren, die Porenabstände und die Porengeometrien (rund und ellipsenförmig) bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Des Weiteren gab es innerhalb der einzelnen Schablonen-Gruppen Unterschiede in den Säulenabständen, zumal die verwendeten Schablonen manuell in der hauseigenen Werkstatt hergestellt wurden und schon kleinste Abweichungen Einfluss auf die Kraftlinien ausüben.

Zusammenfassend wurde dargelegt, dass durch das Generieren von Poren signifikante Kontraktionskraftsteigerungen zu erzielen sind. Im Vergleich zu 24-well-EHTs, die durchschnittlich eine Kontraktionskraft von $0,45 \text{ mN/mm}^2$ vorweisen (ausgehend von einer durchschnittlichen Querschnittsfläche von $0,44 \text{ mm}^2$ und einer durchschnittlichen Kontraktionskraft von $0,2 \text{ mN}$; vgl. Hansen et al. 2010), können die Poren-EHTs eine Kontraktionskraft von durchschnittlich $1,86 \pm 1,28 \text{ mN/mm}^2$ generieren. Die Poren-EHTs erreichen somit durchschnittlich 3,65% der Herzleistung einer intakten adulten menschlichen Kardiomyozyte ($1,86 \text{ mN/mm}^2$ vs. 51 mN/mm^2 ; van der Velden et al. 1997).

4.3 Zellüberleben

4.3.1 Zellzahlbestimmung

Die gemessenen Kontraktionskraftunterschiede zwischen der Kontroll- und Interventionsgruppe ließen die Schlussfolgerung zu, dass möglicherweise durch die bessere Nähr- und Sauerstoffversorgung der Poren-EHTs mehr Zellen in den innersten Schichten überleben und dadurch insgesamt höhere Kardiomyozytenzahlen im Querschnitt der EHTs zu beobachten wären. Folglich erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und Zellgröße im Querschnitt der EHT. Des Weiteren musste sichergestellt werden, dass die Verkleinerung der Querschnittsfläche der Poren-EHTs im Vergleich zu den Kontroll-EHTs nicht mit Zellverlusten

einherging. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie unter 3.2.4.3 beschrieben mithilfe von Dystrophin-gefärbten EHT-Querschnitten.

Die Dystrophin-gefärbten Paraffinschnitte der *6w6p*-EHTs zeigten zum einen eine gleichmäßigere Zellverteilung in den Poren-EHTs (Abb. 3.14) und zum anderen eine höhere Zelldichte (Abb. 3.17). Die ermittelte Zellzahl pro mm^2 war in der Porengruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe (+2110%). Zumal die Anzahl der Zellen in den EHTs stets 6×10^6 betrug und Kardiomyozyten postpartal keine nennenswerte Zellproliferation in dem Maße durchführen, beruhen die hohen Zellzahlen in den Poren-EHTs möglicherweise auf einem verbesserten Zellüberleben. Dies ist am ehesten auf die gesteigerte Nähr- und Sauerstoffversorgung der Poren-EHTs zurückzuführen.

Neben Kardiomyozyten kommen im EHT auch andere Zellen wie z. B. Fibroblasten vor. Um möglichst die Nicht-Kardiomyozyten aus der Zellzählung auszuschließen, gingen ausschließlich Dystrophin-positive Zellen ab einer Querschnittsfläche von $>40 \text{ mm}^2$ in die Auswertung ein. Des Weiteren wurden Zellen ausgeschlossen, die nicht annähernd kreisförmig waren. Dadurch sollten Artefakte und Zellfortsätze, am Rand getroffener Kardiomyozyten weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung der Zellzahl erfolgte nicht verblindet, da die beiden Gruppen offensichtliche Unterschiede aufwiesen und die wenigen untersuchten EHT-Querschnitte stets der jeweiligen Gruppe zugeordnet werden konnten. Für umfangreichere Versuche mit mehr Proben wäre eine Verblindung wünschenswert. Durch die manuelle Markierung der Zellen konnten einerseits Artefakte besser ermittelt und aus der Wertung ausgeschlossen werden und andererseits durch das Setzen der Markierung entlang des Zelldiameters die Zellgröße der markierten Zellen bestimmt werden (vgl. 3.2.4.3). Dabei zeigte die Flächenauswertung der Dystrophin-gefärbten *6w6p*-EHTs keine signifikanten Unterschiede in der Zellgröße (Abb. 3.16). Die in der Vergangenheit etablierte Methode der automatischen Zellgrößenquantifizierung mit Hilfe der Zeiss Software Axiovision (Hirt et al. 2012, Vollert et al. 2014) stand leider zur Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit nicht mehr zur Verfügung. Zur besseren Standardisierung wurde eine Automatisierung der Zähltechnik mit der Software Image J avisiert, diese Technik musste jedoch aufgrund einer unzureichenden Genauigkeit verworfen werden.

4.3.2 DNA-Gehalt

Die mikroskopisch evaluierten hohen Zellzahlen (Abb. 3.17) in den Poren-EHTs sollten mithilfe des DNA-Gehalts im EHT überprüft werden. Tatsächlich korrelierte der DNA-Gehalt mit der Zellkernanzahl und damit indirekt mit der Zellzahl. Die DNA-Bestimmung erfolgte mittels Trizol®-Auftrennung (vgl. 2.7.2). Die makroskopisch sichtbaren Unterschiede in der Größe der EHTs zeigten signifikante Gewichtsunterschiede zwischen der Kontroll- und der Interventionsgruppe und erforderten für die Bestimmung des relativen DNA-Gehalts bezogen auf die EHT-Masse. Dabei wurde jeweils nur ein zentrales Teilstück (circa 30%) des EHTs für die DNA-Isolation verwendet, da das gesamte EHT für die Isolation zu einem zu großen und zum anderen die zweite Gewebehälfte für histologische Untersuchungen herangezogen werden sollten. Folglich wurde die DNA-Menge aus den 50–100 mg (vgl. 2.7.2) schweren EHT-Proben in Relation zum Gesamtgewicht des jeweiligen EHTs gesetzt. Dabei muss bedacht werden, dass etwaige Schwankungen in der Zellverteilung im EHT die Ergebnisse verfälschen könnten und im Idealfall die Aufreinigung ganzer EHTs akkurater wäre. Dies würde jedoch benötigte Anzahl an EHTs verdoppeln, was vor dem Hintergrund des 3R-Prinzipes in dieser Rattenstudie nicht erstrebenswert wäre und auf die ethisch vertretbarere Folgestudie mit menschlichen iPS-abgeleiteten Kardiomyozyten vertagt werden sollte. Der DNA-Gehalt in den Poren-EHTs zeigte wie erwartet höhere DNA-Mengen pro EHT ($92,4 \pm 31,8 \mu\text{g}/\text{EHT}$ vs. $17,2 \pm 10,7 \mu\text{g}/\text{EHT}$). Die durchschnittlich gemessene DNA-Menge war in der Porengruppe >538% höher als in der Kontrollgruppe. Die Werte bestätigen, dass am 21. Inkubationstag mehr Zellen in den Poren-EHTs zu finden sind.

Der DNA-Gehalt von $92,35 \mu\text{g}/\text{EHT}$ in der Porengruppe überstieg den Literaturwert für 6 Millionen eingesetzten Zellen ($6 \text{ pg DNA}/\text{Zelle} = 36 \mu\text{g}$; Herget et al., 1997) um 257%. Um technische Fehler in der DNA-Auswertung auszuschließen, wurde nach demselben Verfahren die DNA-Menge in 6 Millionen NRCMs (bzw. des Zellgemisches am Ende der Isolation aus Rattenherzen) ermittelt. Das leicht höhere Ergebnis von $64,2 \mu\text{g}$ in NRCMs bestätigte aber größenordnungsmäßig den Literaturwert ($10,7 \text{ pg}/\text{Zelle}$). Verglichen mit 6 Millionen NRCMs zeigt der DNA-Gehalt in Kontroll-EHTs während einer Kulturzeit von 21 Tagen einen DNA-Verlust auf. Diese Beobachtung ist aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, in denen nach einer Kulturzeit von drei Tagen 20% der Zellen in EHTs abstarben (Hansen et al., 2010). Die Zunahme der DNA-Menge in Poren-EHTs im Vergleich zum Ausgangswert von 6 Millionen NRCM widerspricht dem Zellabsterben. Da es bekannt ist, dass Kardiomyozyten postpartal keine nennenswerte Zellproliferation in dem Maße vollziehen, ist einerseits die höheren DNA-Mengen ($92,4 \pm 31,8 \mu\text{g}/\text{EHT}$ vs. $64,2 \mu\text{g}/6 \text{ Millionen NRCM}$) in der Proliferation von anderen in den EHTs vorkommenden DNA-haltigen Zellen wie beispielsweise Fibroblasten, glatten Muskelzellen oder Endothelzellen zu vermuten. Andererseits erlaubt der DNA-Gehalt keine

sichere Aussage über die Zellzahl, denn Kardiomyozyten können postpartal mehr als einen Zellkern entwickeln. Des Weiteren bleibt zu vermerken, dass die Zellisolation zu einem Produkt von schwankender Zusammensetzung führt und nur eine einzelne Charge zur Bestimmung des DNA-Gehaltes der reinen Zellen herangezogen wurde. Schließlich könnte die höhere DNA-Menge in den EHTs durch die Hochrechnung auf das ganze EHT zurückzuführen sein. Denn die untersuchte EHT-Probe wurde stets aus einem zentralen EHT-Bereich entnommen und auf das Gesamtgewicht der EHTs hochgerechnet. Diese Hochrechnung setzt eine gleichmäßige Zellverteilung im gesamten EHT voraus, was unwahrscheinlich ist. Um die Frage nach Zellüberleben und Zellproliferation in den Geweben abschließend zu beurteilen, können in zukünftigen Experimenten die Apoptose- und Proliferationsraten mittels ELISA bestimmt werden.

4.3.3 RNA-Analyse

Um Veränderungen auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Gene, die Rückschlüsse auf den Reifegrad der EHTs erlauben, in der Kontroll- und Interventionsgruppe ermittelt (Abb. 3.19). Dabei zeigen die untersuchten EHTs keine Unterschiede auf Transkriptionsebene, die die beobachteten EHT-Qualitätsverbesserungen in der Poren-Gruppe erklären könnten. Auch bezüglich der Annahme von Unterschieden in der Sauerstoffversorgung durch das Generieren von Poren zeigte der Transkriptionsfaktor ‚Hypoxie-induzierter Faktor‘ (Hif1a) keine Unterschiede in den beiden Gruppen. Für die Bestätigung der RT-qPCR Ergebnisse und den Ausschluss von möglichen Verunreinigungen durch genomische DNA erfolgte die Untersuchung ausgewählter Gene mittels einer Gelelektrophorese. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls keine Unterschiede in den untersuchten EHTs (Abb. 3.20).

Das Ausbleiben der Unterschiede in den untersuchten Genen legt nahe, dass die Kontraktionsunterschiede in den EHT durch das vermehrte Zellüberleben in den EHTs zu erklären ist oder dass die Unterschiede in anderen weiter zu ermittelnden Genen liegen. Dies kann Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein und mögliche Unterschiede auf Transkriptions- oder gar Translationsebene aufdecken. Des Weiteren ist hervorzuheben, dass das Ausbleiben von Unterschieden auf Transkriptionsebene mögliche Unterschiede auf der Translationsebene nicht ausschließt. Dies wurde in dieser Arbeit nicht ermittelt.

4.4 Stoffwechselaktivität

Da Glukose die Hauptenergiequelle im Nährmedium der Ratten-EHTs ist, erfolgte die Untersuchung der Stoffwechselaktivität der EHTs durch Bestimmung des Glukoseverbrauchs. Dabei zeigte sich, dass die unterschiedlichen EHT-Gruppen auf Basis der Glukose als Indikator für die Stoffwechselaktivität keine Unterschiede aufwiesen (vgl. 3.2.3). Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Kulturbedingungen der 6p6w-EHTs in 8 ml Medium mit Mediumwechsel alle 2-3 Tage suboptimal waren. Die Messwerte zeigten, dass die im *well* zur Verfügung stehende Glucose (8 ml DMEM mit 1g/l Glucose + 10% Pferdeserum = circa 8-9 mg Glucose total) bereits nach 24 h fast vollständig verbraucht war. Um die Kontraktilität der EHTs weiter zu verbessern, wäre entweder ein Medienwechsel alle 24 h oder ein größeres Nährmediumsreservoir erforderlich. Da allerdings eine stärkere Kontraktionskraft der Poren-EHTs und in diesen eine höhere Zellzahl gezeigt werden konnte (Abb. 3.17), ist an dieser Stelle eine stärkere Inanspruchnahme von alternativen Energiequellen bei den Poren-EHTs anzunehmen. Diese Annahme würde für eine höhere Reifung der Kardiomyozyten in der Porengruppe sprechen. Denn es ist bekannt, dass es Unterschiede in der Energieversorgung fetaler und adulter Kardiomyozyten gibt. Während der Energiegewinn fetaler Kardiomyozyten größtenteils auf Glykolyse und nur zu einem kleinen Teil auf die β -Oxidation der freien Fettsäuren beruht, findet der Energiegewinn im reifen Herzen hauptsächlich über die β -Oxidation freier Fettsäuren und zu geringem Anteil über die Glykolyse statt (Katz, 2011). Daraus folgt, dass sich mit zunehmender Reifung der Kardiomyozyten die Energiestoffwechsellage der EHTs ändert, sodass für die bessere Nährstoffversorgung der EHTs ein auf die metabolischen Bedürfnisse der reifenden Kardiomyozyten abgestimmter Medienwechsel stattfinden sollte. Eine zusätzliche Verbesserung der Sauerstoffzufuhr während der Kultur (z.B. durch Konvektion des Mediums durch Verwendung eines Kippschüttlers in Inkubator; Juhas and Bursac 2014) könnte die EHT-Kontraktilität weiter verbessern, sofern die Kardiomyozyten weit genug gereift sind, um Fettsäuren als Energiequelle zu nutzen. Ein weiteres Substrat ist Laktat, das im oxidativen Stoffwechsel genutzt werden kann (Ulmer et al. 2018).

4.5 Vergleich mit anderen Methoden

Viele Arbeitsgruppen verfolgen das Ziel, durch *tissue engineering* die kausale Therapie des Myokardinfarkts mit der daraus folgenden Herzinsuffizienz zu revolutionieren. Dabei werden unterschiedliche Ansätze verfolgt (vgl. 1.2.2). Eine vielversprechende Methode stellt die *in-vitro*-Herstellung von künstlichem Herzmuskelgewebe dar, das als *Patch* auf das infarzierte

Myokard implantiert wird, um die Herzfunktion wiederherzustellen. Da diese Arbeit sich mit der Gewebeersatztherapie in Form von *Patches* beschäftigt, wird v. a. diese Methode hier diskutiert.

Die gegenwärtigen Limitationen (Stand 02/2018) dieser Methode bestehen in der Nähr- und Sauerstoffversorgung der EHTs. Da diese bislang allein auf Diffusion beruht, können nur die äußersten EHT-Schichten vom Nährmedium versorgt werden. Daraus folgt eine Begrenzung der EHT-Größe v. a. in ihrer Dicke ($<100\ \mu\text{m}$; Radisic et al., 2006), da Zellen im Gewebeerinneren durch den Nährstoffmangel absterben. Die Größe der EHTs ist wiederum von hoher Bedeutung, denn für die Anwendung der EHTs als *Patches* zur Gewebeersatztherapie werden größere Konstrukte mit mehreren cm^2 Größe benötigt.

In den vergangenen Jahren sind viele Arbeitsgruppen die Problematik der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der EHTs angegangen und haben dabei unterschiedliche Konzepte erstellt, um das Zellüberleben im EHT zu verbessern und auf diese Weise stark kontrahierende und zugleich große, auf den Menschen übertragbare Herzgewebe herzustellen. Das Hauptaugenmerk war dabei auf die verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Kardiomyozyten im EHT gerichtet.

Das Einwachsen von Blutgefäßen und die Perfusion dieser Gefäße stellt eine wesentliche Voraussetzung für das Überleben des Transplantats dar. Die Arbeitsgruppe um Shimizu zeigte in einer aufwendigen Mehrfachtransplantationsstudie, dass der *Cell-sheet*-Ansatz eine Methode darstellt, das geschädigte Herz durch die Transplantation von sogenannten *Cell-monolayern* (vgl. 1.2.2) in ihrer Funktion zu verbessern. Dabei wurden sehr dünne, dichte künstliche Muskelgewebe ohne die Verwendung einer Matrix hergestellt und auf ein geschädigtes Rattenherz transplantiert. In wiederholten Operationen in ein bis zwei Tagesabständen wurden weitere *Cell-monolayer* auf das Herz transplantiert und mit den zuvor angebrachten *Cell-monolayern* zu sogenannten *Cell-sheets* verknüpft. Auf diese Weise konnte ein $\sim 1\ \text{mm}$ dickes Myokard mit einer gut organisierten Mikrovaskulatur entstehen. Die *Cell-sheet*-Methode zeigte weiterhin, dass die Implantation von >3 *Cell-monolayern* (Dicke: $>80\ \mu\text{m}$) zur Nekrose des Transplantats führte, wobei die Implantation von ≤ 3 *Cell-monolayern* in ein bis zwei Tagesabständen das Überleben dicker Transplantate ermöglichte (Shimizu et al. 2006). Somit konnte mit dieser Technik nicht die volle Wandstärke des menschlichen Herzens (linksventrikuläre Wanddicke: 7–9 mm; Kawel et al., 2012) durch ein Transplantat ersetzt werden. Allerdings wurde durch diese Arbeit gezeigt, dass künstliches Herzgewebe bis zu einer Maximaldicke von 80 μm auf das native Herz transplantiert werden können und die notwendige Vaskularisierung des Transplantats ein bis zwei Tage benötigt. Es gilt jedoch zu bedenken, dass Mehrfachimplantationen von dünnen *Cell-monolayern* aufgrund der Belastungsgefahr für den Patienten im klinischen Alltag schwer realisierbar sind.

Ein weiterer Ansatz wurde im hiesigen Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie auf Basis von Calciumalginat-*Templates* erarbeitet. Die Methode ermöglicht durch die Verwendung löslicher Calciumalginat-*Templates* die Perfusion von EHTs *in vitro*. Dabei werden 6-*well*-EHTs (25 mm x 15 mm x 5 mm) auf Basis von Fibrin hergestellt, die Alginat-Fäden einschließen. Diese werden daraufhin enzymatisch abgebaut, sodass tubuläre Kanäle im EHT zurückbleiben. Entlang dieser Lumina können die EHTs durch kontinuierliche Perfusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Dadurch konnten sowohl die Kardiomyozytendichte und -größe als auch die Kraftentwicklung der EHTs erhöht werden (Vollert et al. 2014). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Perfusionsgeschwindigkeit der Lumina im Hydrogel limitiert ist (0,05–0,64 mm/s). Der geringe Widerstand der EHTs würde die Perfusionsgeschwindigkeit am nativen Herzen (6–13 mm/s) nicht standhalten und höhere Perfusionsdrücke führten zur Destruktion des künstlichen Gefäßes.

Die genannten Methoden ermöglichten zwar per se durch die bessere Nähr- und Sauerstoffversorgung ein höheres Zellüberleben in den EHTs, sind allerdings für eine Anwendung als *Patch* mit großem Aufwand verbunden. Die Ansätze zeigen technisch sehr anspruchsvolle Protokolle, die für die korrekte Umsetzung mit einem immensen Aufwand verbunden sind und folglich Probleme in der Reproduzierbarkeit aufzeigen, was einer klinischen Anwendung entgegensteht.

Für die klinische Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit der EHTs als *Patch* musste daher eine einfachere Methode ausgearbeitet werden. Einen theoretisch einfachen Weg zur Verbesserung der Nähr- und Sauerstoffversorgung der EHTs stellt die Verkürzung der Diffusionsstrecke dar. Dies wird durch die Generierung von 200 µm voneinander entfernten Poren ermöglicht. Dabei kann der EHT-Abschnitt zwischen jeweils zwei Poren durch Diffusion erreicht werden. Des Weiteren können mithilfe von Porenform und Porenkonstellation vorteilhafte Kraftlinien erzeugt werden, die in kontraktionsstarken EHTs resultieren.

Das Einbauen von Poren in EHTs für die bessere Nährstoffversorgung wurde von der Gruppe um Bursac et al. etabliert (Bian et al., 2009). Dabei wurden dreidimensionale EHTs auf Basis eines Hydrogels auf einer Polydimethylsiloxan-Schablone (PDMS-Schablone) gezüchtet. Die Schablone enthielt elliptische Säulen (*Posts*), die eine definierte Größe und Anordnung vorwiesen. Auf die Schablonen konnten NRCM-Hydrogel-Gemische pipettiert werden, die anschließend 8 bis 13 Tage um die Schablone herum inkubierten. Dabei diente ein flexibler Rahmen aus Velcro® zur EHT-Befestigung und ließ zugleich ungerichtete EHT-Kontraktionen zu. Nach diesem Prinzip entstanden dreidimensionale EHT-*Patches* mit der gewünschten Anzahl und Anordnung von Poren. Die Poren ermöglichten bei dieser Methode zum einen, dass die innenliegenden EHT-Schichten leichter mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt wurden, zum anderen konnten die Zellausrichtungen und die Kraftlinien anhand von *Post-*

Anordnung und -Richtung vorgegeben werden. Immunhistologische Untersuchungen konnten zeigen, dass ein dichtes und zugleich gleichmäßig verteiltes Kardiomyozyten-Netz entlang des EHTs entstand (Bian et al. 2009).

Bei diesen Poren-EHTs wurden stets ellipsenförmige Poren mithilfe von PDMS-Schablonen hergestellt. Die Verwendung von Velcro® ließ zwar Kontraktionen zu; diese waren jedoch ungerichtet, da das EHT von allen Seiten am Velcro® hing. In einer daran anschließenden Arbeit zeigte die Arbeitsgruppe um Bursac et al., dass mithilfe einer diffusionsgewichteten Magnetresonanztomographie (*DTMRI*; Englisch: *Diffusion tensor magnetic resonance imaging*) eine Schablone vom Epikard eines menschlichen Ventrikels rekonstruiert werden konnte. Infolgedessen wurde mit der Schablone ein EHT mit den Maßen 2,5 cm x 2,5 cm² (zum Vergleich: 6w6p-EHT: 25 x 15 x 3,6 mm³; vgl. Tabelle 4.1) – identisch der Topographie des Ventrikel-Areals – hergestellt (Bien et al., 2014).

Das Hauptaugenmerk der Arbeiten war auf die Histologie der EHTs gerichtet. Bedeutende Qualitätsmerkmale der EHTs, wie die Kontraktionskraft oder die Stoffwechselaktivität, wurden nicht untersucht. Des Weiteren wurde die Austestung des Protokolls an größeren EHTs, die zu Transplantationszwecken für das menschliche Herz dienen könnten, nicht untersucht (3.2.1).

4.6 Ausblick

Bei der Nutzung von EHTs zu Transplantationszwecken am Menschen wird die Größe der EHTs von entscheidender Bedeutung sein. Hier wurde erstmals eine Methode zur Herstellung großer, makroskopisch kontrahierender EHTs im 7 x 5 cm²-Format auf Basis von Herzzellen aus neonatalen Ratten vorgestellt. Damit ist ein entscheidender Schritt zur Übertragung der kardialen Gewebeersatztherapie auf den Menschen gemacht worden. Dennoch ist der Weg noch weit und weitere Untersuchungen sind notwendig.

Die in dieser Arbeit hergestellten EHTs wurden u. a. aus Kostengründen aus neonatalen Rattenkardiomyozyten hergestellt. Die Übertragung des Ansatzes auf humane EHTs mithilfe von iPSC ist am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie derzeit Ziel einer Folge-Studie. Auch bezüglich des verwendeten EHT-Nährmediums ist Raum zur Optimierung gegeben. Die Erkenntnisse aus der Stoffwechselaktivität (vgl. 3.2.3 und 4.4) suggerieren eine weitere Erforschung der Medienzusammensetzung, das auf den jeweiligen Maturationsgrad der EHTs zugeschnitten sein sollte, da Kardiomyozyten abhängig von ihrem Reifegrad ihren Nährstoffbedarf mit unterschiedlichen Mengen an Fettsäuren und Glukose decken. Folglich könnten vergleichende Untersuchungen der EHTs zu unterschiedlichen Zeiten bezüglich des Fettsäureverbrauchs im Nährmedium Aufschluss über den Nährstoffbedarf der Zellen zu den

unterschiedlichen Kulturzeiten geben. Infolgedessen könnte die Nährstoffzusammensetzung auf den individuellen Reifegrad der EHTs angepasst werden.

Bei den Kontraktionsmessungen der EHTs wurde lediglich die Kraft ermittelt und die Frequenz außer Acht gelassen, da diese bei Ratten-EHTs sehr hoch und mit ihrem *Burst*-artigen Schlagverhalten sehr variabel sind. Nach der Übertragung der Methode auf humane EHTs können Frequenz, T1- und T2-Zeit weitere Qualitätsmerkmale der EHTs darstellen.

Auch die Untersuchung unterschiedlicher Geometrien der Silikonhalterungen und deren *Posts* wurden in den hier beschriebenen Experimenten nicht durchgeführt. Es wurde lediglich der Ansatz von Hansen et al. 2010 auf das *6-well*-Format vergrößert und die Anzahl der *Posts* an den Enden der Silikonhalterung durch anheften leicht versetzter *Posts* erhöht. Durch eine andere *Post*-Verteilung oder gar unterschiedliche Silikon-Härtegrade (veränderte Ladung), könnten sich andere Kraftlinien ergeben, die weiter untersucht werden sollten. Des Weiteren könnte in zukünftigen Experimenten beispielsweise die Zellorientierung der Kardiomyozyten durch Veränderung der Porenausrichtung beeinflusst und untersucht werden. Alternativ könnte durch eine diffusionsgewichtete Magnetresonanztomografie die Zellausrichtung im natürlichen Herz rekonstruiert werden (Bien et al., 2014).

Schlussendlich können klinische Studien am Kleintiermodell und später an größeren nicht-humanen Primaten Aufschluss über die klinische Anwendbarkeit der EHTs am Menschenherzen geben.

5. Zusammenfassung

Künstliche Herzmuskelgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) dienten bisher in der Grundlagenforschung der Aufklärung zellulärer Mechanismen, der Krankheitsmodellierung und der *in-vitro*-Testung von Pharmaka.

Das ultimative klinische Ziel der EHT-Forschung auf Basis von Hydrogelen ist ihre Anwendung in der Gewebeersatztherapie in Form von *Patches* bei Postmyokardinfarkt-Patienten. Eine aktuelle Hürde stellt dabei die Größe der EHTs dar. Dies ist wahrscheinlich zum großen Teil auf Limitationen in der Nähr- und Sauerstoffversorgung größerer EHTs zurückzuführen. Beim *Upscaling* kommt es bei den EHTs zum vermehrten Zellabsterben während der Kulturzeit, da die Nähr- und Sauerstoffversorgung der EHTs auf Diffusion besteht. Ziel dieser Arbeit war die Herstellung großer EHTs, möglichst im cm²-Format, die makroskopisch kontrahieren und histologisch ein höheres Zellüberleben und eine bessere Zellverteilung entlang des gesamten EHT-Querschnitts vorweisen.

Durch diese Arbeit konnte ein Protokoll zur Herstellung von großen EHTs im 6- und 1-*well*-Format erarbeitet werden, die makroskopisch kontrahieren. Hierfür wurden Poren unter Zuhilfenahme von biokompatiblen Schablonen aus Agarose, Gelatine PDMS und PTFE in die EHTs generiert. Die Poren in den EHTs beeinflussen durch eine bessere Nähr- und Sauerstoffversorgung und veränderte Kraftlinien die Zellstruktur im Inneren der Gewebe. Während bei Kontroll-EHTs im inneren Gewebe kaum Kardiomyozyten detektiert wurden, konnten durch den Einbau von Poren entlang des gesamten EHT-Querschnitts mehr Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Eine histologische Zellzählung zeigte ein höheres Zellüberleben in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die DNA-Bestimmungen bestätigten die Ergebnisse der Zellzählung. Auf Transkriptionsebene wiederum zeigten RNA-Untersuchungen keine Unterschiede auf. Durch die Kraftmessung mithilfe der Software *ImageJ* und der Überlistung des video-optischen Analyse-Messgeräts konnten zwei einfache und sterile Methoden der Kontraktionskraftmessung an großen EHTs (6*w6p*-Format) etabliert werden. Die Kontraktionsmessungen zeigten, dass die Poren-EHTs signifikant stärker kontrahierten als die Kontroll-EHTs.

Zusammenfassend konnte erstmals eine Methode zur Herstellung großer, makroskopisch kontrahierender EHTs mit einer histologisch verbesserten Zellverteilung entlang des gesamten EHTs vorgestellt werden, die eine bedeutende Limitation der kardialen Gewebeersatztherapie mithilfe von *Patches* aufhebt. Die Übertragung der Methode auf humane EHTs mithilfe von iPSC-basierten Kardiomyozyten und darauffolgende Transplantationsstudien am Tiermodell stellen hieran anschließende Projekte dar.

6. Summary

Engineered heart tissues (EHT) are hydrogel-based cardiac tissues that are attached to posts of a silicone rack. *In vitro* they are used as screening platforms for disease modelling and preclinical drug safety screenings. The ultimate clinical aim of the EHT-research is to use the hydrogel-based-EHTs *in vivo* as cardiac tissue replacement on injured human hearts.

A major challenge in using the EHTs in cardiac tissue replacement in humans is the size of the EHTs. Since the EHTs are not vascularized, the oxygen and nutrient supply in EHTs are based on diffusion especially during cell-culture. Due to diffusion limitations bigger tissues receive insufficient oxygen and nutrients which results in increased cell-death and a very poor contractility.

The objective of this project was to generate macroscopically contracting big EHTs - preferably in cm²-format- with an increased cell survival throughout the whole EHT in order to improve the contractility of the EHTs.

In order to do so we decided to generate pores in our EHTs referring to the mesh technique of Bian et al. (2014). Thereby we expected an improved oxygen and nutrient supply resulting in a good cell survival/-distribution and increased contractile function.

For our upscaling project we used biocompatible templates from agarose, gelatin, PDMS and PTFE to generate pores in our EHTs. Generation of pores within the EHTs increased cell survival and therefore contractility of the tissue. The mechanism behind this is likely a combination of improved oxygen/nutrient supply and ultrastructural force lines introduced by the pores.

While in control-EHTs only a few cells could be detected in the middle layers of the EHT, we could show histologically by a cell-counting procedure more cell survival due to all cell-layers of the porous EHTs.

The Force measurements via ImageJ and via a video-optical analysis system could show two easy methods of force-measurements on bigger EHTs. Those measurements showed a significant higher force development in porous EHTs compared to the control-group.

To sum up, here we present a method of generating bigger, macroscopically contracting EHTs with an improved cell-distribution throughout the whole EHT. This method obviously solves one of the important bottlenecks of EHT-Upscaling. The technique of pore formation can now be applied to larger EHTs and tested with hiPSC-derived cardiomyocytes for implantation studies.

6. Literaturverzeichnis

- Apple FS, Ricchiuti V, Voss EM, et al (1998) Expression of cardiac troponin T isoforms in skeletal muscle of renal disease patients will not cause false-positive serum results by the second generation cardiac troponin T assay. *EurHeart J* 19 Suppl N:N30–N33.
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161:1566–1575. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.026
- Bian W, Liao B, Badie N, Bursac N (2009) Mesoscopic hydrogel molding to control the 3D geometry of bioartificial muscle tissues. *Nat Protoc* 4:1522–1534. doi: 10.1038/nprot.2009.155
- Bolli R, Tang X-L, Sanganalmath SK, et al (2013) Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Stem Cells Improves Cardiac Function in a Porcine Model of Chronic Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation* 128:122–131. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001075
- Cannon CP, Weintraub WS, Demopoulos LA, et al (2001) Comparison of early invasive and conservative strategies in patients with unstable coronary syndromes treated with the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban. *N Engl J Med* 344:1879–87. doi: 10.1056/NEJM200106213442501
- Carrier PM RL, Rupnick M, Schoen FJ, et al (1999) Cardiac tissue engineering: Cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64:580–589. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990905)64
- Chan MY, Sun JL, Newby LK, et al (2009) Long-Term Mortality of Patients Undergoing Cardiac Catheterization for ST-Elevation and Non – ST-Elevation Myocardial Infarction. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.799981
- Chong JJH, Yang X, Don CW, et al (2014) cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510:273–277. doi: 10.1038/nature13233
- Civerchia-Perez L, Faris B, Lapointe G, et al (1980) Use of collagen-hydroxyethylmethacrylate hydrogels for cell growth (connective tissue/cell surface/cell biology/fibroblasts). *Cell Biol* 77:2064–2068. doi: 10.1073/pnas.77.4.2064
- Cyranoski D (2018) “Reprogrammed” stem cells approved to mend human hearts for the first time news /631/532. *Nature* 557:619–620.
- de Lange WJ, Hegge LF, Grimes AC, et al (2011) Neonatal Mouse-Derived Engineered Cardiac Tissue: A Novel Model System for Studying Genetic Heart Disease. *Circ Res* 109:8–19. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.242354
- Dow J, Simkhovich BZ, Kedes L, Kloner RA (2005) Washout of transplanted cells from the heart: A potential new hurdle for cell transplantation therapy. *Cardiovasc Res* 67:301–307. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.011
- Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al (2017) Cardiomyocyte regeneration: A consensus statement. *Circulation* 136:680–686. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *FASEB J* 11:683–694.
- Fink C, Ergün S, Kralisch D, et al (2000) Chronic stretch of engineered heart tissue induces

- hypertrophy and functional improvement. *FASEB J* 14:669–679. doi: 10.1007/0-387-21547-6_18
- Friedrich FW, Wilding BR, Reischmann S, et al (2012) Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 21:3237–3254. doi: 10.1093/hmg/dds157
- Furuta A, Miyoshi S, Itabashi Y, et al (2006) Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel Three-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique Functionally Integrates With the Host Heart , In Vivo. doi: 10.1161/01.RES.0000209515.59115.70
- Ganote RJC (1974) Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res* 35:156–172. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.187397
- Gara PTO, Kushner FG, Ascheim DD, et al (2013) 2013 ACCF / AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction. 61:78–140. doi: 10.1016/j.jacc.2012.11.019
- Golden AP, Tien J (2007) Fabrication of microfluidic hydrogels using molded gelatin as a sacrificial element. *Lab Chip* 7:720–725. doi: 10.1039/b618409j
- Hansen A, Eder A, Bönstrup M, et al (2010a) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107:35–44. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211458
- Hansen A, Eder A, Bönstrup M, et al (2010b) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* 107:35–44. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.211458
- Huang Y-C, Khait L, Birla RK (2007) Contractile three-dimensional bioengineered heart muscle for myocardial regeneration. *J Biomed Mater Res Part A* 80A:719–731. doi: 10.1002/jbm.a.31090
- Ifkovits JL, Tous E, Minakawa M, et al (2010) Injectable hydrogel properties influence infarct expansion and extent of postinfarction left ventricular remodeling in an ovine model. *Proc Natl Acad Sci* 107:11507–11512. doi: 10.1073/pnas.1004097107
- Kehat I, Kenyagin-karsenti D, Snir M, et al (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. 108:363–364. doi: 10.1172/JCI200112131.Introduction
- Kumar A, Cannon CP (2009) Acute Coronary Syndromes: Diagnosis and Management, Part I. 84:917–938.
- Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al (2011) Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 57:455–465. doi: 10.1016/j.jacc.2010.07.049
- Leor J, Aboulafia-etzion S, Dar A, et al (2000) Bioengineered Cardiac Grafts A New Approach to Repair the Infarcted Myocardium ?
- Mannhardt I, Saleem U, Benzin A, et al (2017) Automated Contraction Analysis of Human Engineered Heart Tissue for Cardiac Drug Safety Screening. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/55461
- Menasché P, Alfieri O, Janssens S, et al (2008) The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117:1189–1200. doi:

10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734103

Mooney D, Vacanti JP (1993) Tissue Engineering Using Cells and Synthetic Polymers. 7:153–162.

Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL, et al (2007) National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation* 115:356–376. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.182882

Mullasari AS, Balaji P, Khando T (2011) Managing complications in acute myocardial infarction. *J Assoc Physicians India* 59 Suppl:43–8.

Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K (2006) Optimizing Engineered Heart Tissue for Therapeutic Applications as Surrogate Heart Muscle. 72–79. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001560

Ohki T, Yamato M, Murakami D, et al (2006) Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 55:1704–1710. doi: 10.1136/gut.2005.088518

Ott HC, Matthiesen TS, Goh S, et al (2008) Perfusion-decellularized matrix : using nature ' s platform to engineer a bioartificial heart. 14:213–221. doi: 10.1038/nm1684

Radisic M, Park H, Shing H, et al (2004) Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci* 101:18129–18134. doi: 10.1073/pnas.0407817101

Reimer K a, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB (1977) The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56:786–794. doi: 10.1161/01.CIR.56.5.786

Riezebos RK, Ronner E, Ter Bals E, et al (2009) Immediate versus deferred coronary angioplasty in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Heart* 95:807–812. doi: 10.1136/hrt.2008.154815

Rota M, Padin-iruegas ME, Misao Y, et al (2009) NIH Public Access. 103:107–116. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178525.Local

Schaaf S, Shibamiya A, Mewe M, et al (2011) Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0026397

Schulte H, Cullen P, Assmann G (1999) Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Münster Heart Study (PROCAM). *Atherosclerosis* 144:199–209. doi: 10.1016/S0021-9150(99)00055-6

Shiba Y, Fernandes S, Zhu W, et al (2012) couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489:322–325. doi: 10.1038/nature11317

Shimizu T (2002) Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces. *Circ Res* 90:40e–48. doi: 10.1161/hh0302.105722

Shimizu T, Sekine H, Yang J, et al (2006) Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues. *FASEB J* 20:708–10. doi: 10.1096/fj.05-4715fje

Stöhr A, Friedrich FW, Flenner F, et al (2013) Contractile abnormalities and altered drug

- response in engineered heart tissue from Mybpc3-targeted knock-in mice. *J Mol Cell Cardiol* 63:189–198. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.07.011
- Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al (2012) ESC / ACCF / AHA / WHF Expert Consensus Document Third Universal Definition of Myocardial Infarction. 2020–2035. doi: 10.1161/CIR.0b013e31826e1058
- Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, et al (2009) Automated drug screening with contractile muscle tissue engineered from dystrophic myoblasts. *FASEB J.* 23:3325–3334.
- Vandenburgh HH, Karlisch P, Farr L (1988) Maintenance of highly contractile tissue-cultured avian skeletal myotubes in collagen gel. *In Vitro Cell Dev Biol* 24:166–174.
- Vollert I, Seiffert M, Bachmair J, et al (2014) In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue Eng Part A* 20:854–63. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0214
- Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH (1993) Induction and nuclear accumulation of Fos and Jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268:16852–16858.
- Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, et al (2015) Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* 525:479–485. doi: 10.1038/nature15372
- Weinberger F, Breckwoldt K, Pecha S, et al (2016) Cardiac repair in guinea pigs with human engineered heart tissue from induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 8:363ra148-363ra148. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf8781
- Yamato M, Utsumi M, Kushida A, et al (2001) Thermo-Responsive Culture Dishes Allow the Intact Harvest of Multilayered Keratinocyte Sheets without Dispass by Reducing Temperature. *Tissue Eng* 7:473–480. doi: 10.1089/10763270152436517
- Zimmermann W-H, Didié M, Wasmeier GH, et al (2002) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106:1151–1157. doi: 10.1161/01.cir.0000032876.55215.10
- Zimmermann W-H, Melnychenko I, Wasmeier G, et al (2006) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12:452–458. doi: 10.1038/nm1394

Weitere Quellen:

Dissertation Nils Sörensen 2013 - Entwicklung eines Herzhypertrophie-modells *in vitro* basierend auf künstlichem Herzmuskelgewebe; Universität Hamburg

Dissertation Ingra Vollert 2013 - Optimierung künstlicher Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT) für den Einsatz der kardialen Gewebeersatztherapie; Universität Hamburg

ESC Guidelines 2017

Statistisches Bundesamt 2015

7. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit, die Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken. Die kreativen Diskussionen und Anregungen während der Mittwochs-Besprechungen motivierten mich stets auf Neue gesetzte Ziele umzusetzen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Ingra Mannhardt, die während des gesamten Forschungsprojekts, angefangen vom Vorstellungsgespräch bis zur Fertigung der Dissertation mich unterstützte, meine Fähigkeiten formte und meinen wissenschaftlichen Stil prägte. Ein herzliches Dankeschön für deine unermüdlichen, tatkräftigen und motivierenden Anregungen zu jeder Zeit. Ohne deine motivierenden Worte und deine Zuverlässigkeit würde die Dissertation noch einige Jahre auf sich warten lassen.

Ich danke Birgit Klampe und Mirja Schulze für die tolle Nachbarschaft, die aufmunternden Gespräche und das leckere Naschzeug für zwischendurch. Bülent Aksehirlioglu danke ich für das aufopfernde Tüfteln an gemeinsamen Ideen. June Übeler und Thomas Schulze danke ich für die Präparation der Zellen und die Geduld gegenüber meiner NRCM-Gier. Ich danke allen Kollegen und Kolleginnen des Instituts für die tolle Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das tolle Arbeitsklima.

Meinen Eltern danke ich für die Liebe und das Vertrauen, das sie mir entgegenbringen. Ohne euch wäre ich nie dort wo ich bin. Euer Dasein ermöglichte mir mein Studium, meine Doktorarbeit und mein Leben.

Meiner Verlobten Muska danke ich für ihre Unterstützung und Liebe. Ohne deinen Optimismus und deine motivierenden Worte wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen. Es macht mich stolz dich an meiner Seite zu haben.

Lebenslauf

8. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

9. Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, 29.12.2018

.....
Mohammad Yusuf Nejhsie