

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herz- und Gefäßzentrum Hamburg
Kinderherzmedizin und Erwachsene mit angeborenen Herzfehlern

Prof. Dr. med. Michael Hübler

Eine potenzielle Therapie für Kinder mit *Fontan*-Zirkulation – Generation eines tubulären Herz-Konstruktes

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades PhD
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maria Katharina Köhne
aus Hamburg

Hamburg 2022

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.07.2022

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Jörg Siegmar Sachweh

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: _____

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.“ — Marie Salomea Skłodowska Curie

1 Inhaltsverzeichnis

2	Einleitung	4
2.1	Angeborene Herzfehler – Bedeutung für die westliche Welt	4
2.2	Blutzirkulation im gesunden menschlichen Herz.....	5
2.3	Das hypoplastische Linksherzsyndrom.....	8
2.3.1	Pathophysiologie des hypoplastischen Linksherzsyndroms.....	8
2.3.2	Limitationen der <i>Fontan</i> -Zirkulation	9
2.3.3	Experimentelle Therapie Ansätze für Patienten mit <i>Fontan</i> -Zirkulation.....	12
2.4	Herstellung von <i>Engineered Heart Tissue</i>	14
2.4.1	Induzierte pluripotente Stammzellen	14
2.4.2	Kardiale Differenzierung.....	15
2.4.3	Kultivierung von Kardiomyozyten in einer Hydrogelmatrix	17
2.4.4	Regenerative Ansätze für strukturellen Herzersatz.....	18
3	Ziel der Arbeit.....	21
4	Methoden	23
4.1	Medien für die Zellkultur	23
4.2	Zellkultur mit iPSCs	25
4.2.1	Kultivierung von iPSCs.....	25
4.2.2	Beschichtung von Zellkulturflaschen	26
4.2.3	Einfrieren von iPSCs	26
4.2.4	Auftauen von iPSCs	26
4.2.5	Mykoplasma Test	27
4.2.6	Pluripotenz-Analyse	27
4.3	Kardiale Differenzierung und Zell Präparation	28
4.3.1	Stadium 0 – Bildung von Zellaggregaten, EBs.....	28
4.3.2	Stadium 1 – Induktion der mesodermalen Differenzierung	29
4.3.3	Stadium 2 – Induktion der kardialen Spezifizierung	29
4.3.4	Dissoziation der EBs	29
4.3.5	Einfrieren von Kardiomyozyten.....	30
4.3.6	Auftauen von Kardiomyozyten.....	30
4.4	Herstellung und Kultivierung von tubulären EHTs	30
4.4.1	Tubuläre EHTs im 6-Wellformat	31
4.4.2	Stapel-EHTs.....	33
4.4.3	Gewickelte EHTs.....	34
4.4.4	Tubuläre EHTs in einer Perfusionskammer	35
4.4.5	Aufbau und Funktion des pulsatilen Perfusionssystem.....	37

4.4.6	Perfusionsschlauch aus Silikon	38
4.5	Histologie	39
4.5.1	Präparation der Gewebeschnitte	40
4.5.2	Visualisierung der Färbungen.....	41
4.5.3	Sarkomerlängenmessung	41
4.6	Funktionelle Analyse von tubulären EHTs	41
4.6.1	Kontraktionsanalyse im Organbad.....	42
4.6.2	Video-optische Kontraktionsmessung von tubulären EHTs	42
4.6.3	Druckmessungen von tubulären EHTs	43
4.6.4	Berstdruck Messung von tubulären EHTs	45
4.6.5	Messung des Drucks durch den Pumpfluss.....	45
4.7	Statistik	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Tubuläre EHTs im 6-Wellformat	47
5.1.1	Morphologische und funktionelle Evaluation.....	47
5.1.2	Stapel-EHTs.....	51
5.2	Tubuläre EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem	52
5.2.1	Tubuläre EHTs aus gewickelten Patch-EHTs.....	54
5.2.2	Tubuläre EHTs im Gussformat	55
6	Diskussion.....	64
6.1	Funktionalität – Was sollte ein <i>Fontan</i> -Tunnel aus EHT leisten?	64
6.2	Instabilität – Die Hürde für komplexe 3D-Konstrukte	68
6.3	Welche Kulturbedingungen sind am besten für Funktionalität und Reife geeignet? 71	
6.3.1	Kultivierung von tubulären EHTs unter pulsatilem Perfusion	71
6.3.2	Perfusionsschlauch – Trägermembran für die Kultivierung von EHT	73
6.3.3	Zelluläre Ausrichtung entlang von Kraftlinien.....	73
6.4	Limitationen – Ausblick für zukünftige Studien.....	76
6.4.1	Multizelluläre EHTs	76
6.4.2	Elektrische Stimulation	77
6.4.3	Integration von EHT-Klappen für einen gerichteten Fluss.....	78
6.5	Wie würde ein geeignetes Tiermodell für eine Transplantation aussehen?	79
6.6	Fazit der Diskussion.....	82
7	Zusammenfassung.....	83
8	Abstract.....	85
9	Abkürzungsverzeichnis.....	86
10	Abbildungsverzeichnis	89
11	Tabellenverzeichnis	91

12	Literaturverzeichnis.....	92
13	Geräte und Materialien	104
13.1	Geräte	104
13.2	Software.....	105
13.3	Materialien	106
13.4	Medien und Seren.....	108
13.5	Reagenzien.....	108
13.6	Proteine.....	109
13.7	Medikamente und niedermolekulare Verbindungen.....	109
13.8	Liste mit Antikörpern.....	110
13	Publikationen	111
13.1	Publikationen.....	111
13.2	Konferenzbeiträge.....	111
14	Danksagung	113
15	Lebenslauf	114
16	Eidstattliche Versicherung.....	115

2 Einleitung

2.1 Angeborene Herzfehler – Bedeutung für die westliche Welt

Angeborene Herzfehler (AHF) betreffen 0.8 - 1 % aller Neugeborenen und zählen weltweit zu den häufigsten Gründen des plötzlichen Herztodes (Hoffman and Kaplan 2002; Lyngge et al. 2018). Zugrundeliegend ist eine einzelne oder kombinierte anatomische Fehlbildung oder Unterentwicklung von Kammer- und Gefäßstrukturen während der Embryonalentwicklung. Populationsbasierte Studien aus Kanada und den USA zeigen, dass AHFs in der Kategorie angeborener Fehlbildungen am häufigsten (46 %) zum Todesfall bei Säuglingen und Kleinkindern führen. Zudem machen sie drei Prozent aller Todesfälle im Säuglingsalter aus (Hoffman et al. 2004; Marelli et al. 2007). Unter den verschiedenen Ausprägungen von AHFs werden zirka 25 % als schwerwiegend bezeichnet, wie bspw. die Fallot-Tetralogie, die Transposition der großen Gefäße oder das Hypoplastische Linksherzsyndrom (*engl. hypoplastic left heart syndrome*, HLHS) (Mahle et al. 2009; Mai et al. 2019). Diese Herzfehler gehen mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einher, sodass interventionelle oder chirurgisch rekonstruktive Verfahren innerhalb des ersten Lebensjahres erforderlich sind (Mahle et al. 2009). Betroffene Kinder haben während dieses Zeitraums, im Vergleich zu Kindern ohne schwerwiegende Fehlbildungen, zudem eine deutlich niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit (77,2 vs. 91,7 %) (Pace et al. 2018). Die Ursache von kongenitalen Herzfehlern ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass sowohl genetische als auch Umweltfaktoren Einfluss bei der Entstehung von Herzfehlbildungen haben. Mütterliche Faktoren wie Infektionen, Alkohol- und Tabakkonsum oder Diabetes mellitus während der Schwangerschaft könnten eine Rolle spielen (Hoffman and Kaplan 2002; Jenkins et al. 2007). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Kinder zwischen Verwandten ersten Grades häufiger an angeborenen Fehlbildungen leiden. Hierbei wird ein autosomal rezessiver Erbgang vermutet (Haq et al. 2011). Chromosomale Aberrationen und andere genetische Syndrome sind ebenfalls oft mit AHFs assoziiert (Ko 2015). Über die letzten Jahrzehnte konnten molekulare Signalwege, die die Herzentwicklung steuern, besser verstanden werden. Hierbei wurden zahlreiche transkriptionelle Regulatoren, Signalmoleküle und Strukturgene identifiziert, die entscheidend für die kardiale Morphogenese sind (Kelly et al. 2014). Weiterhin wurden mehrfach Gene identifiziert, die mit AHFs assoziiert sind (Gelb et al. 2013). Neben der Vererbung von genetischen Komponenten scheinen auch *de novo* Mutationen bei der Entstehung von AHFs eine Rolle zu spielen. In einer der größten internationalen genetischen Studien waren vor allem Syndrom-basierte AHFs mit *de novo* Mutationen assoziiert (Sifrim et al. 2016). Für die Studie wurden die Genome von 1891 Kindern sequenziert. Bei Kindern mit isoliert auftretenden Herzfehlern waren dahingegen öfter vererbte Genmutationen ursächlich.

Dieses multifaktorielle Geschehen macht einen therapeutischen Ansatz als Angriffspunkt für eine Gentherapie oder Medikation kompliziert. Durch die Optimierung von interventionellen und chirurgischen Eingriffen über die letzten Jahrzehnte konnte die Sterblichkeit und Prognose von Kindern mit AHFs deutlich verbessert werden (Nieminen et al. 2007). Die meisten AHFs, wie der Ventrikelseptumdefekt und der Vorhofseptumdefekt, schränken die Lebensqualität postchirurgisch oder postinterventionell kaum ein und gehen mit einer sehr geringen Mortalität einher. Bei den bereits erwähnten schwerwiegenden Fehlbildungen sind die Therapien jedoch oft nur palliativ. Zudem ist die Lebensqualität der Patienten auch nach einem Eingriff stark eingeschränkt und geht mit zahlreichen Komplikationen einher (Khairy et al. 2008). Somit hat die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Verbesserung von Lebensqualität und Prognose der betroffenen Patienten weiterhin einen hohen Stellenwert.

2.2 Blutzirkulation im gesunden menschlichen Herz

Das menschliche Herz ist eine lebenslang arbeitende muskuläre Pumpe, die die Blutzirkulation im Körper und somit die Versorgung der inneren Organe mit Nährstoffen gewährleistet. Es beinhaltet zwei funktionell und anatomisch getrennte Einheiten, die man als rechtes und linkes Herz bezeichnen kann (**Abb. 1**). Das rechte Herz besteht aus dem rechten Ventrikel und dem rechten Vorhof, das linke Herz aus dem linken Ventrikel und dem linken Vorhof. Unter physiologischen Bedingungen gelangt oxygeniertes Blut aus der Lungenzirkulation über die Pulmonalvenen in den linken Vorhof. Von dort wird es über die Mitralklappe in den linken Ventrikel geleitet und aktiv über die Aorta in den Körperkreislauf gepumpt, um dort die Organe mit sauerstoffangereichertem Blut zu versorgen (**Abb.1**). Das venöse, sauerstoffarme Blut aus dem Körperkreislauf gelangt dann über die untere (*Vena (V.) cava inferior*) und obere Hohlvene (*V. cava superior*) in den rechten Vorhof und über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Von dort wird es über die Pulmonalarterie (*Arteria (A.) pulmonalis*) in den Lungenkreislauf befördert, wo es erneut mit Sauerstoff angereichert wird (**Abb.1**). Lungen- und Körperkreislauf sind hintereinandergeschaltet und laufen nicht gleichzeitig ab. Um eine Zirkulation im Herzen gewährleisten zu können, reicht eine alleinige Muskelkontraktion nicht aus. Der Rückfluss des Blutes wird durch Klappen verhindert, die eine Ventilfunktion haben. Zwischen Vorhof und Kammern befinden sich die Atrioventrikular (AV)-Klappen mit Mitralklappe und Trikuspidalklappe, im Ausflussbereich der großen Gefäße (*Aorta* und *A. pulmonalis*) die Semilunarklappen. Damit schafft das Herz einen hydrostatischen Druckgradienten, der unter anderem Antrieb für die Blutzirkulation im Körper ist (Boron and Boulpaep 2000; Speckmann et al. 2019). Es wird zwischen einem Nieder- und Hochdrucksystem unterschieden. Das Niederdrucksystem beinhaltet das Kapillarbett, die Venen, das rechte Herz, die Gefäße des Lungenkreislaufs und den linken Vorhof. In diesem System liegen die Drücke niedrig, bei zirka

0 -15 mmHg. Das Hochdrucksystem besteht aus der linken Herzkammer und den Arterien des Körperkreislaufs. Hier liegen die Druckwerte zwischen 70 und 120 mmHg.

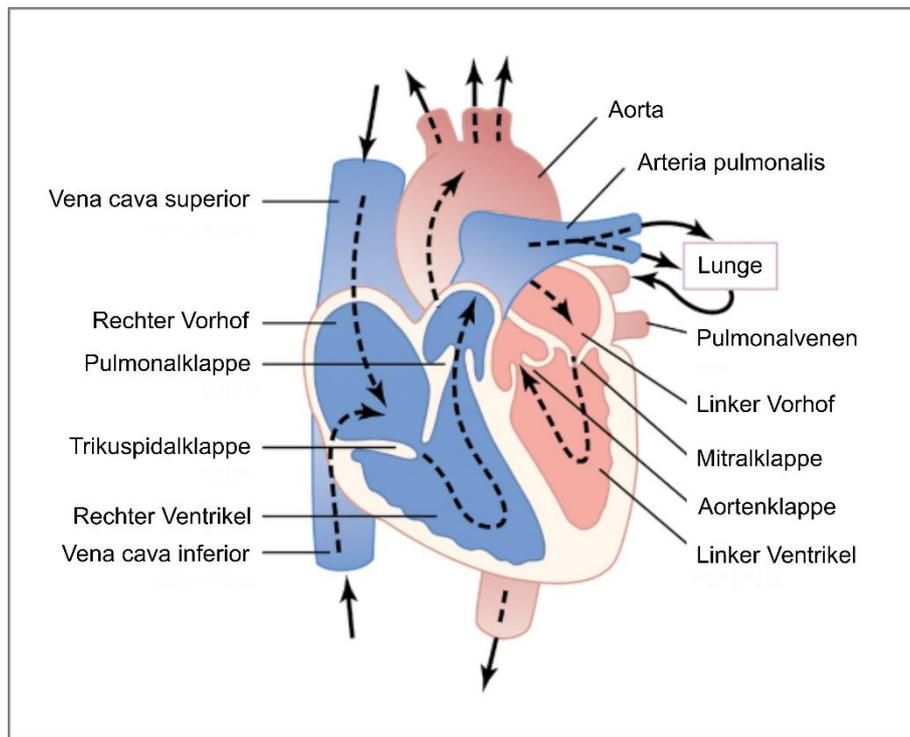


Abbildung 1: Blutzirkulation im adulten gesunden menschlichen Herz. Die Richtung des Blutflusses ist durch gestrichelte Pfeile markiert. Blaue Bereiche zeigen verbrauchtes desoxygeniertes Blut. Rote Bereiche zeigen mit Sauerstoff angereichertes oxygeniertes Blut. *Modifiziert nach Boron and Boulpaep 2000.*

Eine Herzaktion kann grundsätzlich in vier Phasen eingeteilt werden. Die einzelnen Schritte der Herzaktion, sowie der Frank-Starling-Mechanismus werden im Folgenden kurz erläutert (Boron and Boulpaep 2000; Speckmann et al. 2019).

I - Erschlaffungsphase: Isovolumetrische Relaxation

Nach einer erfolgten Kontraktion (Ende der Austreibungsphase, IV) des Herzen fällt mit abnehmenden Volumen im Ventrikel der Druck unter den Aortendruck und die Aortenklappe schließt sich. Der Druck im Ventrikel ist jedoch noch größer als im Vorhof, sodass auch die AV-Klappen geschlossen sind. Der erschlaffende Herzmuskel baut keinen Druck mehr auf eine Blutsäule auf, es handelt sich um eine isovolumetrische Druckerniedrigung (**Abb. 2 I**).

II - Füllungsphase

Wenn der Druck im Ventrikel unter den Druck im Vorhof fällt (Start der Füllung), gelangt Blut aus dem Vorhof über die AV-Klappen in den Ventrikel und es kommt erneut zur Füllung. Hierbei handelt es sich um einen passiven Prozess. Der Druck fällt durch die Muskelerlaffung noch weiter ab. Kurz vor Ende der Füllungsphase kommt es zur

Kontraktion des Vorhofs, sodass der Druck wieder ansteigt. Dadurch fließt noch mehr Blut in den Ventrikel, bis das enddiastolische Volumen (enddiastolischer Druck) erreicht ist. Der enddiastolische Füllungsdruck wird als Vorlast bezeichnet (**Abb. 2 II**).

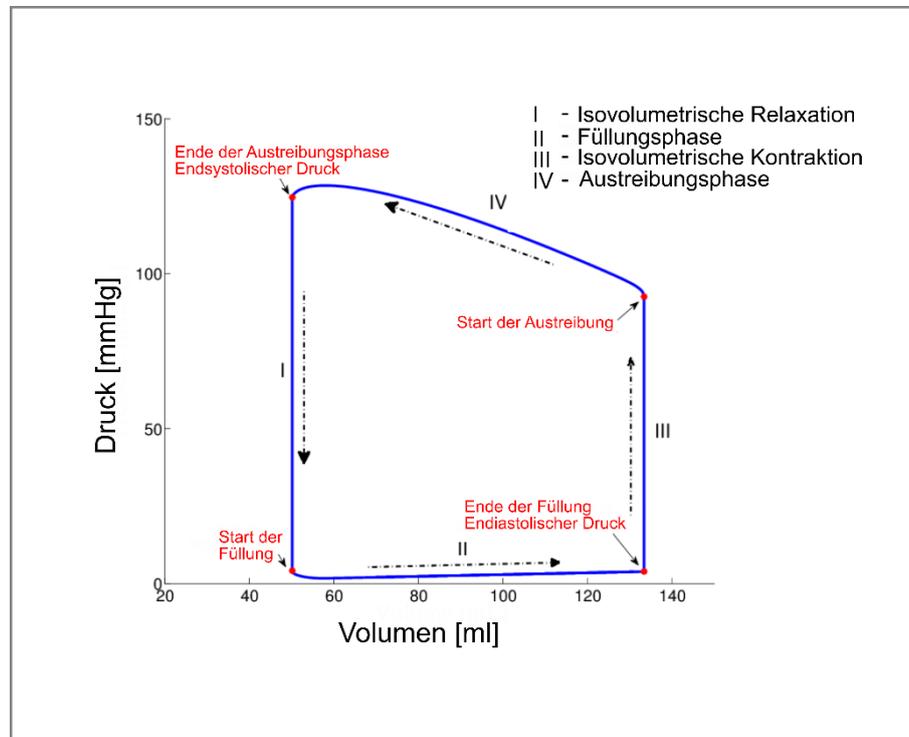


Abbildung 2: Druck-Volumen Diagramm während einer Herzaktion. Dargestellt sind die Veränderungen des Drucks in Abhängigkeit von Volumenänderungen während eines Kontraktionszyklus im Herzen. *Modifiziert nach De los Reyes V 2015.*

III - Anspannungsphase: Isovolumetrische Kontraktion

Der linke Ventrikel ist mit etwa 120 ml Blutvolumen gefüllt. Der Druck im Ventrikel ist niedriger als in der Aorta. Die Aortenklappe ist geschlossen. Die AV-Klappen sind ebenfalls geschlossen, da der Druck im Ventrikel höher ist als im Vorhof. Bei der Kontraktion arbeitet der Muskel aktiv gegen eine konstante Blutmenge, genannt isovolumetrische Kontraktion. Während der Kontraktion erhöht sich der Druck im Ventrikel zunächst auf zirka 80 mmHg, welcher im Bereich des Aortendrucks liegt (**Abb.2 III**).

IV - Austreibungsphase

Der Druck durch die Kontraktion steigt weiter an. Nach dem Überschreiten des Aortendrucks von 80 mmHg, öffnet sich die Aortenklappe und Blut fließt in die Aorta. Als Nachlast wird der Druck in der Aorta bezeichnet und somit der Druck, gegen den das Herz Blut auswerfen muss. Somit sinkt das Volumen im Ventrikel. Gleichzeitig steigt der Druck weiterhin bis zirka 120 mmHg an. Vor dem Erreichen des endsystolischen Volumen von etwa 50 ml fällt der Druck im Ventrikel bereits wieder ab. Die Inaktivierung der Ca^{2+} -Kanäle und die

Wiederaufnahme von Kalzium in die Speicher des endoplasmatischen Retikulums lassen das Herz erschlaffen. Der Blutstrom hält die Klappe jedoch noch offen (**Abb. 2 IV**).

Frank-Starling-Mechanismus

Der Frank-Starling-Mechanismus bezeichnet eine physiologische Anpassung der Pumpfunktion auf eine veränderte Füllung. Die Füllung ist abhängig vom venösen Angebot. Durch einen erhöhten venösen Rückstrom kommt es zu einer erhöhten enddiastolischen Füllung mit einer vermehrten Dehnung der Herzwand. Dies führt zu der Aktivierung des Frank-Starling-Mechanismus mit einem erhöhten Schlagvolumen. Mit zunehmender Füllung erhöht sich somit das Schlagvolumen.

2.3 Das hypoplastische Linksherzsyndrom

Das hypoplastische Linksherzsyndrom (HLHS) umfasst nur zwei bis drei Prozent der angeborenen Herzfehler, ist aber einer der schwersten angeborenen Herzfehler und geht mit einer hohen Mortalität innerhalb des ersten Lebensjahres einher. Ohne eine therapeutische Intervention versterben 95 % der Patienten innerhalb der ersten Lebenswochen (Samaneck 1992; Barron et al. 2009; Gilboa 2010).

2.3.1 Pathophysiologie des hypoplastischen Linksherzsyndroms

Das HLHS ist Teil eines heterogenen Formenkreises komplexer Fehlbildungen, welcher mit einer schweren Unterentwicklung linker Herzkammerstrukturen und somit einem Funktionsverlust des linken Ventrikels einhergeht (**Abb. 3 A**). Der linke Ventrikel ist dadurch nicht in der Lage, die Organe mit Sauerstoff-angereichertem Blut zu versorgen. Pränatal zeigen betroffene Säuglinge keine Symptome. Die Lunge ist noch nicht entfaltet und der Fetus wird über die Nabelvene mit Sauerstoff-angereichertem Blut versorgt. Über eine Gefäßverbindung zwischen der Aorta und der *A. pulmonalis*, dem sog. *Ductus arteriosus* gelangt Blut in den Körperkreislauf. Es gibt keinen getrennten Körper- und Lungenkreislauf, der Blutfluss ist parallel geschaltet. Unter physiologischen Bedingungen verschließt sich diese Verbindung nach der Geburt durch einen postnatalen Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks nach Beginn der Lungenfunktion und die adulte Blutzirkulation beginnt. Körper- und Lungenkreislauf sind in Serie geschaltet und laufen nicht parallel ab (Mavroudis and Baker 2013). Neugeborene mit einem HLHS hingegen können zunächst nur überleben, wenn der *Ductus arteriosus* nach der Geburt offenbleibt. Man spricht von einem patenten *Ductus arteriosus*. Zudem benötigen sie eine Verbindung auf Vorhofebene (bspw. über einen Atriumseptumdefekt (ASD)), die entweder bereits besteht oder künstlich durch eine Intervention hergestellt werden muss (*Rashkind-Manöver*). Der rechte Ventrikel fungiert als alleiniger Systemventrikel. In dieser pathologischen Zirkulation wird das venöse Blut aus dem

Körperkreislauf über die *V. cava superior* und *V. cava inferior* in die rechte Kammer drainiert. Von dort gelangt es über die Pulmonalarterie in den Lungenkreislauf (**Abb. 3 B**).

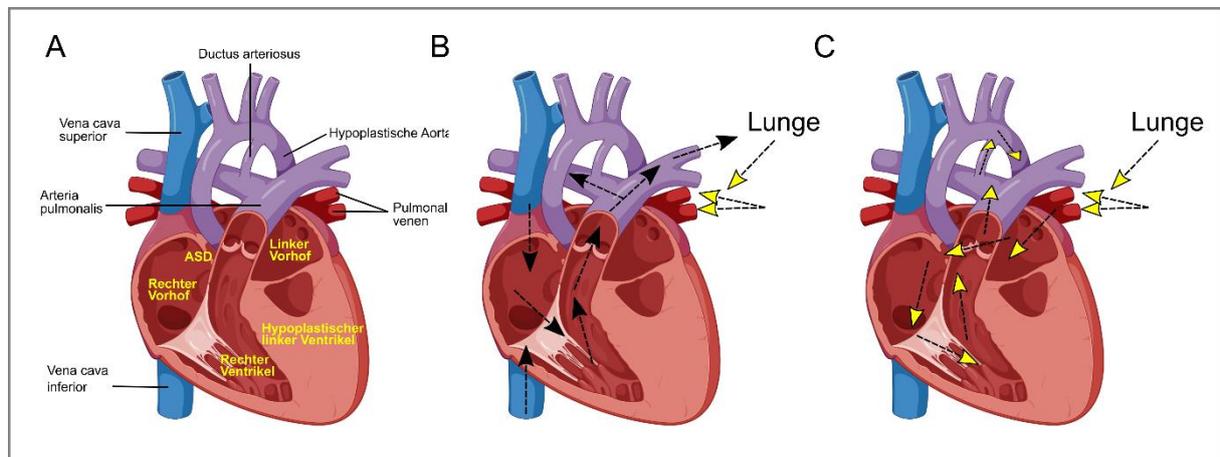


Abbildung 3: Das hypoplastische Linksherzsyndrom. A: Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen des HLHS, ASD: Atrialer Septumdefekt. B: Schematische Darstellung der Blutzirkulation im HLHS bis zum Eintritt in die Lunge (schwarze Pfeile). C: Schematische Darstellung der Blutzirkulation im HLHS nach Passage der Lunge (gelbe Pfeile). Die Abbildung dient nur als schematische Orientierung. B und C laufen parallel ab und sind nur zum Verständnis separat aufgezeigt. Die unterschiedliche Farbmarkierung der Pfeile zeigt keine Unterschiede in der Oxygenierung. Es besteht eine Mischzirkulation. *Modifiziert von BioRender.com.*

Blut aus dem Lungenkreislauf kann den rechten Ventrikel nur über den zuvor erwähnten ASD (links-rechts Shunt) erreichen. Dort mischt es sich mit dem venösen Blut aus dem Körperkreislauf und gelangt über die Pulmonalarterie in den *Ductus arteriosus* und tritt erneut in den Körperkreislauf ein (**Abb. 3 C**). Der Blutfluss ist dabei wie vor der Geburt parallel und nicht in Serie geschaltet. Verschließt sich der *Ductus arteriosus*, ist die systemische Zirkulation stark eingeschränkt und es kommt zu der Entwicklung einer metabolischen Azidose mit Nierenversagen und hämodynamischem Kollaps. Die Herstellung eines patenten *Ductus arteriosus* ist primäres Ziel nach der Geburt eines Kindes mit HLHS und wird bspw. durch die intravenöse Gabe von Prostaglandin E ermöglicht (Mavroudis and Baker 2013).

2.3.2 Limitationen der *Fontan*-Zirkulation

Die einzige kurative Therapie des HLHS (**Abb. 4 A**) ist die Herztransplantation, welche jedoch oft mit schweren Folgekomplikationen einhergeht. Zudem ist die Anzahl an möglichen Spendern stark limitiert, sodass es zu langen Wartezeiten kommt, die oft frühzeitig zum Tod führen (Alsoufi et al. 2016; Davies et al. 2019). In den meisten Fällen erfolgen daher komplexe chirurgische Verfahren. Diese haben inzwischen bessere Langzeitergebnisse, sind jedoch weiterhin nur palliativ. Die heutzutage am meisten angewandte chirurgische Intervention am funktionellen Einkammerherz ist die sogenannte „*Fontan*-Operation“ (nach Francois M.F.Fontan) (Fontan and Baudet 1971) (**Abb. 4**).

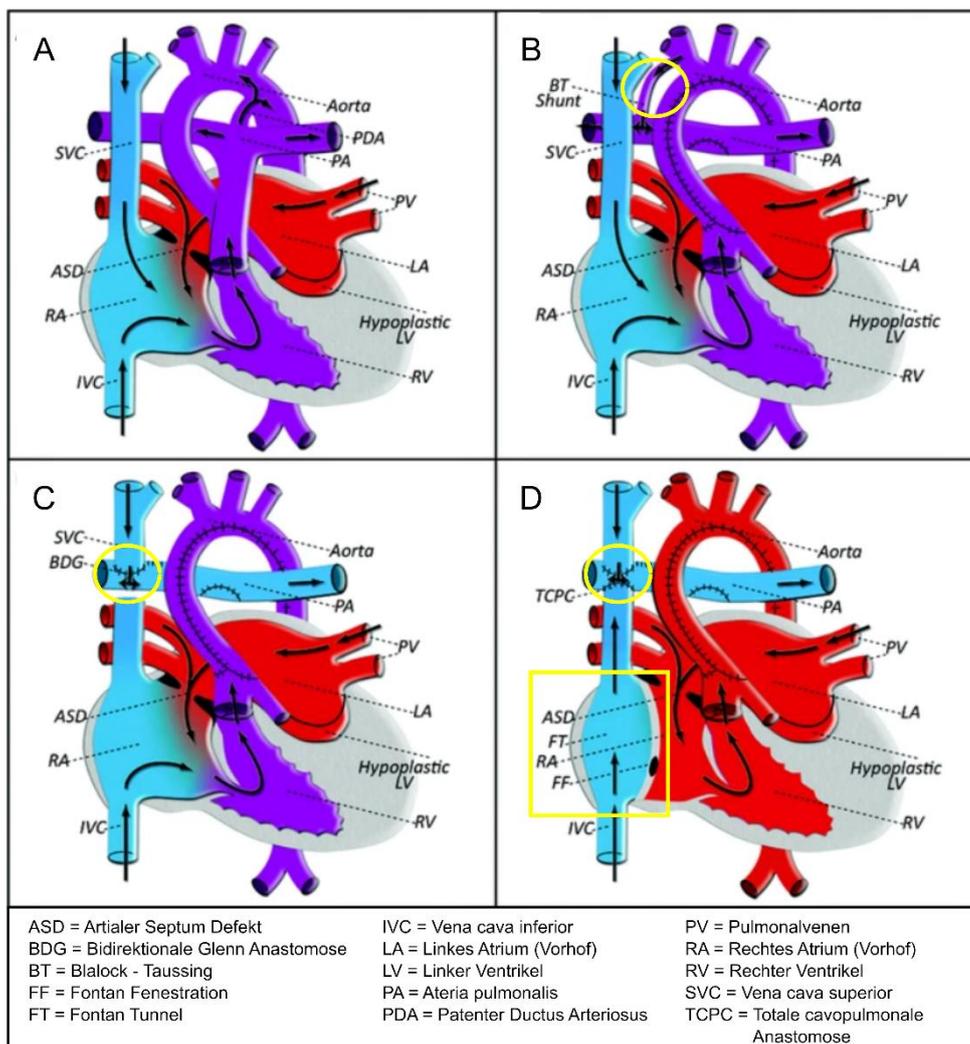


Abbildung 4: Die Fontan-Operation am HLHS. A: Anatomische Strukturen des HLHS, schwarze Pfeile symbolisieren die Richtung des Blutflusses. B: 1. Operationsschritt: Generation einer *Neo-Aorta* aus der hypoplastischen Aorta und der Wurzel der *A. pulmonalis*. Verschluss der *Ductus arteriosus*. Trennung der *A. pulmonalis* vom Herzen, separater Verschluss. Herstellung der Lungendurchblutung durch die Integration einer Shunt-Verbindung (*Blalock-Taussing* Shunt, gelber Kreis) zwischen der *A. pulmonalis* und der *Neo-Aorta*. C: 2. Operationsschritt: Herstellung einer direkten Verbindung zwischen der *V. cava superior* und der rechten *A. pulmonalis* (*Bidirektionale Glenn-Anastomose*, gelber Kreis) D: 3. Operationsschritt: Vervollständigung der totalen cavopulmonalen Anastomose (*TCPC*, gelber Kreis) durch Verbindung der *V. cava inferior* mit der rechten *A. pulmonalis* über eine getunnelte Kunststoffprothese (*FT*, gelber Kasten). *Modifiziert nach Albers et al. 2010.*

Diese Operation wird nach heutigem Stand schrittweise vor dem zweiten Lebensjahr durchgeführt, um eine Ausreifung der Lungengefäße abzuwarten. Ziel ist es, den vorhandenen Systemventrikel umzufunktionieren und einen systemischen venösen Abfluss aus der *V. cava superior* und der *V. cava inferior* auf direktem Weg in die Lungenarterie zu befördern. Im ersten Schritt dieser Operationsserie wird aus der hypoplastischen Aorta und der Wurzel der *A. pulmonalis* (*Truncus pulmonalis*) eine *Neo-Aorta* geschaffen, genannt *Damus-Kaye-Stansel-Prozedur* (Yang et al. 2014a). Weiterhin wird die Lungenperfusion durch einen künstlichen

Shunt zwischen der *Neo-Aorta* und der *A. pulmonalis* gewährleistet, genannt *Blalock-Taussing* Shunt (**Abb. 4 B**). In einem zweiten und dritten Schritt werden wie bereits erwähnt die Hohlvenen mit der *A. pulmonalis* verbunden. Die vollendete Verbindung wird als totale cavopulmonale Anastomose (*engl. total cavopulmonary connection, TCPC*) bezeichnet. Hierdurch werden zum einen Körper- und Lungenkreislauf voneinander getrennt, zum anderen wird eine Volumenüberlastung des singulären Ventrikels reduziert. Die obere Hohlvene wird dabei direkt auf die *A. pulmonalis* genäht (Bidirektionale Glenn-Anastomose) (**Abb. 4 C**). Die *V. cava inferior*, die den venösen Abfluss aus der unteren Körperhälfte drainiert, wird dahingegen über eine zwischengeschaltete, tunnelförmige Kunststoffprothese (*Fontan-Tunnel, FT*) mit der Lungenarterie verbunden (**Abb. 4 D**). Die Effizienz des passiven Blutstroms hängt dabei von dem Druckgradienten zwischen dem zentralvenösen und dem pulmonalen Kreislauf ab (Gewillig 2005; Khairy et al. 2007). Durch die fehlende gerichtete treibende Kraft eines vorgeschalteten Ventrikels kommt es nach der Herstellung des *Fontan*-Kreislaufs zu einer pulmonalarteriellen Hypo- und einer systemisch venösen Hypertension, genannt *Fontan-Paradox* (De Leval 1998).

Auch wenn sich die Prognose der *Fontan*-Patienten durch den Fortschritt chirurgischer Verfahren verbessert hat, leiden viele Patienten mit zunehmendem Alter unter den Folgekomplikationen der unphysiologischen Hämodynamik. Ungefähr 30 % der Patienten mit einer *Fontan*-Zirkulation erreichen nicht das Erwachsenenalter und versterben zuvor an Organversagen oder Infektionen (Newburger, J. W., Sleeper 2018). Die Gründe hierfür sind vor allem zwei Limitationen:

- i) Durch den passiven (nicht-pulsatilen) Fluss fehlt die treibende Kraft für das Wachstum der Lungengefäße und es kommt zu einem erhöhten Widerstand im Kapillarnetz der Lunge. Dies führt zu einem Druckanstieg im venösen System, insbesondere der unteren Hohlvene (Henaine et al. 2013a). Dadurch leiden die Patienten unter zunehmendem Versagen der Leber und des lymphatischen Systems. Infolgedessen kommt es häufig zu Blutgerinnungsstörungen und Immundefizienz, sodass sich bspw. Blutgerinnsel schneller bilden können. Ein verminderter Abfluss der Lymphe führt zu Wassereinlagerungen im Gewebe und einem vermehrten Verlust von Proteinen über den Darm mit Diarrhoe und ggf. Verdauungsstörungen (Driscoll et al. 1992). In der Lunge kommt es zu Gefäßveränderungen im Kapillarnetz. Auch hier kann es zu der Auslagerung von Proteinen über die Schleimhaut kommen. Folgen sind entzündliche Umbauprozesse und starke Atemeinschränkungen (Allen et al. 2017; Menon et al. 2017).

- ii) Der rechte Ventrikel ist morphologisch nicht dafür geschaffen, als Systemventrikel zu funktionieren. Zudem ist die Pumpleistung direkt abhängig von der Druckdifferenz zwischen der *A. pulmonalis* und dem kapillaren Verschlussdruck in der Lunge. Kleinste Verengungen, bspw. im Bereich der Klappen oder der Kunststoffprothese, führen durch einen Druckabfall in der *A. pulmonalis* zu einer Erhöhung des Lungengefäßwiderstands und somit einer verminderten Füllung und Auswurfleistung des Herzen (Gewillig et al. 2010; Nordmeyer et al. 2017). Letztlich kommt es somit häufig zu Herzrhythmusstörungen mit der Gefahr eines Multiorganversagen und des plötzlichen Herztodes (Redington 2014; Ferrer-Barba et al. 2016).

2.3.3 Experimentelle Therapie Ansätze für Patienten mit *Fontan*-Zirkulation

Nach der Erstbeschreibung der *Fontan*-Operation im Jahr 1971 kam es im Verlauf der folgenden Jahre zu verschiedensten Ansätzen, mit der Intension, die Langzeitprognose der Patienten zu verbessern. Fast alle Konzepte zielen hierbei auf einen gerichteten Fluss in die Pulmonalarterien ab, um den alleinigen Systemventrikel zu entlasten. Erste Versuche beruhten darauf, den rechten Vorhof als aktiv pumpende Kammer zu nutzen. Diese zeigten jedoch, aufgrund der für diesen Zweck ungünstigen Geometrie und Morphologie des Atriums, gegenüber der TCPC keine Vorteile (De Leval et al. 1988). Eine weitere Idee beruht darauf, Skelettmuskelgewebe (zumeist der Rückenmuskel *Musculus latissimus dorsi*) als autologes Transplantat zu verwenden und elektrisch zu stimulieren. Hierbei gibt es grundsätzlich zwei Ansätze: **i.** Einen Neoventrikel mit integrierten Klappen zu generieren (Macoviak et al. 1987; Niinami et al. 1992; Greer and Stephenson 1997), **ii.**

eine muskuläre Unterstützung als Ummantelung für den rechten Vorhof zu bilden, der zum Ersatzventrikel umfunktioniert wurde (Chachques et al. 1990; Voss et al. 2002). Auch wenn zunächst ein pulsatile Fluss generiert werden konnte, zeigten die Transplantate aus Skelettmuskel mit der angestrebten Stimulationsfrequenz histologisch Umbauprozesse mit schwerwiegenden Muskelschäden (Monnet et al. 1998). Auch funktionell war die *Compliance* des Materials zu niedrig, sodass diese Methode keinen Vorteil für die Patienten zeigte (Bridges et al. 1989). Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von mechanischen Pumpen. Mechanische Pumpen (*engl. ventricular assist devices, VADs*) konnten innerhalb der letzten Jahre einen großen Einfluss in der Therapie von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz erzielen (Rose et al. 2001; Slaughter et al. 2009; Waqas and Cowger 2016). In ersten Versuchen wurde eine TCPC in Schafen generiert. Anschließend wurde eine Axialflusspumpe in die *V. cava inferior* und superior eingebracht. Hierbei kam es zu mehreren Problemen: Ein retrograder Fluss

konnte nicht verhindert werden. Weiterhin kam es zu Ansaugphänomenen der *V. cava* mit Obstruktionen (Rodefeld et al. 2003). Im Verlauf wurden verschiedene Modelle anhand von Simulationssystemen theoretisch und praktisch *in vitro* getestet. Die meisten Pumpen waren Axialfluspumpen, die innerhalb der TCPC getestet wurden. Ein Problem war hierbei, dass die kommerziell verfügbaren VADs hauptsächlich auf Patienten mit arterieller Systemversorgung bei Linksherzversagen angepasst sind (Lacour-Gayet et al. 2009; Bhavsar et al. 2009; Chopski et al. 2015; Di Molfetta et al. 2015). In einem weiteren Ansatz wurden anstatt von Axialfluspumpen radiale Impeller-Pumpen in einem Simulationssystem getestet. Diese konnten zumindest in der Theorie zentral in der TCPC positioniert den Blutfluss steigern und den Druck in den Pulmonalarterien bei einer Flussrate von 4 l/min um 20 mmHg erhöhen (Rodefeld et al. 2010). *In vivo* Studien zu diesem Ansatz sind jedoch bis dato nicht existent. Die meisten Ansätze beziehen sich darauf, VADs intravaskulär zu testen. Einige Ansätze beziehen sich auf extravaskulär getestete Systeme. In einer Studie wurde bspw. versucht, einen pulsatilem peristaltischen Fluss durch spezielle elektrisch stimulierbare formflexible Drähte, die um einen *Fontan*-Tunnel aus PTFE gewickelt waren, zu induzieren. Auch wenn partiell pulsatile Druckwerte generiert werden konnten, änderten sich die durchschnittlichen Druck- oder Flussraten in der Zirkulation nicht signifikant (Yamada et al. 2015). In einem weiteren Ansatz wurde ein periodisch aufblasbarer Ballon genutzt, um den Blutfluss in die Pulmonalarterien zu unterstützen. Dieser war zusätzlich von zwei Klappen umgeben. Ohne die Klappen neigte das Konstrukt zur Okklusion, zudem konnten kein gerichteter Fluss erzeugt werden (Valdovinos et al. 2014). Beide Ansätze wurden nur *in vitro* anhand einer Simulation getestet. Es gibt nur wenige *in vivo*-Ansätze für die Verwendung von VADs. In einem Ansatz wurde bei einem Kind mit zunehmender Insuffizienz des alleinigen Systemventrikels ein VAD zur Funktionsunterstützung implantiert. Zuvor waren bereits die ersten beiden Operationsschritte der *Fontan*-Operation durchgeführt worden. Die Operation diente zur funktionellen Überbrückung für eine Vollendung der TCPC und konnte erfolgreich durchgeführt werden (Adachi et al. 2016). Auch in anderen Ansätzen konnten VADs in Patienten mit funktioneller Einkammer-Anatomie erfolgreich genutzt werden, um den alleinigen Systemventrikel als Überbrückung für eine Transplantation oder Vollendung der *Fontan*-Zirkulation zu unterstützen (Weinstein et al. 2014; Rossano et al. 2014; Valeske et al. 2014). Nur in einem Ansatz wurde durch mechanische Pumpen eine isolierte Unterstützung des pulmonal arteriellen Blutflusses nach erfolgter *Fontan*-Operation getestet. Auch dieser Ansatz diente zur Überbrückung für eine Herztransplantation (Prêtre et al. 2008).

Auch wenn einzelne Ansätze mit mechanischen Pumpen zumindest in der Theorie Potenzial für eine Verbesserung der hämodynamischen Situation in *Fontan*-Patienten haben, müssten hierfür Pumpen entwickelt werden, die an niedrige Flussbedingungen angepasst sind.

Weiterhin bleibt die Gefahr von Hämolyse, Obstruktionen und Thromben durch das künstliche Material. Durch die Sogwirkung der Pumpen kann es weiterhin zu Ansaugphänomenen in der subpulmonalen Zirkulation kommen. Durch den hierbei entstehenden Abfall des pulmonal arteriellen Drucks besteht die Gefahr des Kreislaufkollaps mit plötzlichem Herztod. Weiterhin müssen die VADs über eine extrakorporale elektrische Leitung (*engl. driveline*) reguliert werden. Diese schränkt das postoperative Leben für Kinder stark ein und bietet einen möglichen Fokus für Infektionen. Bisher basieren die meisten Studien bzgl. einer direkten Stimulation des Flusses in die Pulmonalarterien auf Simulationsmodellen und müssten auch *in vivo* getestet werden. Trotzdem könnten VADs eine Möglichkeit sein, den überlasteten, alleinigen Systemventrikel zu unterstützen, um eine *Fontan*-Operation erfolgreich vollenden zu können (*engl. bridge-to-therapy*). Die Herstellung von künstlichem Herzmuskelgewebe ist mittlerweile technisch möglich und könnte neue Alternativen für eine verbesserte Hämodynamik von Patienten mit *Fontan*-Zirkulation darstellen. Weiterhin könnten durch vitale Konstrukte Probleme wie Hämolyse, Obstruktionen und vermehrte Thrombenbildung adressiert werden.

2.4 Herstellung von *Engineered Heart Tissue*

Bei *engl. Engineered Heart Tissues* (EHTs) handelt es sich um kleine kontraktile Einheiten von künstlich hergestellten Herzmuskel-Konstrukten. Die Herstellung von EHTs ist mittlerweile gut etabliert und bietet eine Plattform für die Untersuchung von verschiedenen Krankheiten (*engl. disease modelling*) (Prondzynski et al. 2019) und das Testen von Medikamenten (*engl. drug testing*) (Saleem et al. 2020; Mannhardt et al. 2020), ohne dabei von Tiermodellen abhängig zu sein. Dieses Kulturformat von Kardiomyozyten (KMs) und anderen Zelltypen ähnelt, im Vergleich zu einer 2D-Kultivierung, mehr den physiologischen Gegebenheiten. Weiterhin könnte es als Gewebeersatz in der regenerativen Medizin einen wichtigen klinischen Stellenwert einnehmen (Querdel et al. 2021).

2.4.1 Induzierte pluripotente Stammzellen

Pluripotente Stammzellen besitzen das Potenzial, sich zu Zellen aller drei embryonalen Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) und somit auch zu Herzzellen differenzieren zu können. Zudem können sie sich fast uneingeschränkt weiter teilen und stellen somit, zumindest in der Theorie, eine unendliche Zellquelle dar. Lange Zeit gab es nur Embryonen als Zellquelle für pluripotente Stammzellen (*engl. embryonic stem cell, ESC*) (Yamanaka and Blau 2010). Die Verwendung von Embryonen ist vor allem ethisch fragwürdig. Eine große Revolution im Feld der Stammzellforschung erfolgte im Jahr 2007, als es Forschern erstmals gelang, somatische Zellen durch das retrovirale Einbringen von vier Transkriptionsfaktoren (c-Myc, Oct3/4, Sox2, and Klf4) in einen pluripotenten Zustand zu versetzen (**Abb.5**) (Takahashi

et al. 2007). Im weiteren Verlauf konnte dies noch optimiert werden, indem die Transkriptionsfaktoren mithilfe eines Sendai Virus in die Zelle eingebracht wurden. Dieses integriert nicht in das menschliche Genom und stellt somit potenziell keine Gefährdung für eine klinische Anwendung dar (Fusaki et al. 2009). Seit der Entdeckung von induzierten pluripotenten Stammzellen (*engl. induced pluripotent stem cells*, iPSCs) wird an Protokollen zur Herstellung reiner und großer Stammzellpopulationen geforscht.

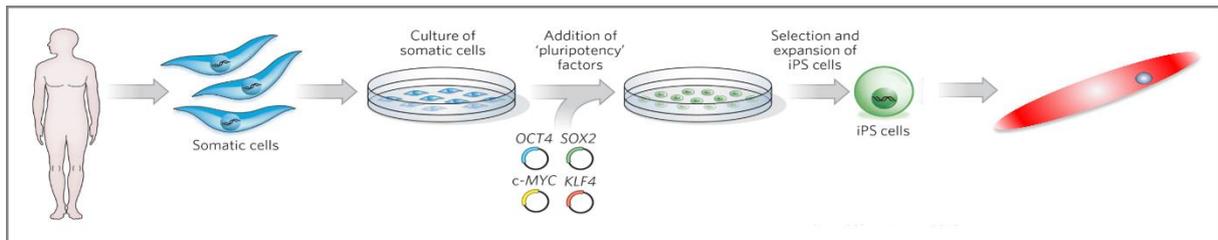


Abbildung 5: Reprogrammierung von iPSCs. Humane somatische Zellen bspw. Fibroblasten werden entnommen, kultiviert und retroviral reprogrammiert. Die iPSC-Klone werden selektiert, kultiviert und expandiert. Anschließend können die iPSCs zu Zellen aller drei Keimblätter des Embryo wie bspw. Kardiomyozyten differenziert werden. *Modifiziert nach Yamanaka and Blau 2010.*

iPSCs weisen morphologisch und molekular leichte Unterschiede zu embryonalen Stammzellen auf (Tonge et al. 2014). Nachdem es 2009 einer Forschergruppe gelang, vermehrungsfähigen Mäuse auf der Basis von iPSCs zu züchten, war die funktionelle Wirksamkeit jedoch bewiesen. Hierbei wurden iPSCs zu tetraploiden Blastozysten (Zellen mit einem vierfachen Chromosomensatz) hinzugegeben. Diese konnten sich nur zu extraembryonalem Plazentagewebe differenzieren. Die hinzugegebenen iPSCs waren die Basis für die Entwicklung des Mäuseembryo (Zhao et al. 2009). Zudem konnten bis dato fast alle Zellarten aus iPSCs differenziert werden, die den primären Targetzellen morphologisch und funktionell ähneln. iPSCs bieten somit eine attraktive Zellquelle für die Herstellung von KMs (Yamanaka and Blau 2010).

2.4.2 Kardiale Differenzierung

Es gibt viele verschiedene Protokolle für die Differenzierung von KMs. Grundsätzlich sind jedoch bei allen Protokollen zwei aufeinanderfolgende entscheidende Schritte enthalten:

- i.) Die Induktion der mesodermalen Differenzierung. Hierfür ist die Aktivierung des Wachstumsfaktors *engl. Transforming growth factor beta* (TGF) oder die Aktivierung des nodalen Signalwegs über TGF- β 1, *engl. Bone morphogenic Protein-4* (BMP-4) und Aktivin-A entscheidend.
- ii.) Die Induktion der kardialen Differenzierung. Eine kardiale Spezifizierung wird durch die Inhibition des *engl. wingless-related integration site* (WNT) Signalweg eingeleitet. Niedermolekulare Moleküle, sog. *engl. small molecules*, oder

spezifische rekombinante Protein-Verbindungen können diesen Signalweg hemmen oder aktivieren (Batalov and Feinberg 2015).

Mithilfe dieser Protokolle können heutzutage KMs in hoher Reinheit und Anzahl hergestellt werden (Denning et al. 2016; Breckwoldt et al. 2017). Trotzdem gleichen iPSC- oder ESC-abgeleitete KMs transkriptionell, strukturell und funktionell eher KMs in einem embryologischen Vorläuferstadium. Das liegt unter anderem daran, dass die Reifung von Kardiomyozyten im Fetus während der späteren Schwangerschaft bisher kaum verstanden ist (Sizarov et al. 2011). Die meisten Erkenntnisse basieren auf Studien aus Tiermodellen während der Embryonalentwicklung oder der Entwicklung von Kardiomyozyten nach der Geburt. Zudem können die elektromechanischen, hämodynamischen und räumlichen Gegebenheiten im Zellverband nach Abschluss der Herzformation *in vitro* schwer imitiert werden. Diese wirken sich vermutlich auf die Reifung aus (Karbassi et al. 2020). Vor der Geburt wächst das Herz vor allem durch Proliferation (Zellvermehrung durch Zellteilung) von KMs, genannt Hyperplasie (Li et al. 1996; Laflamme and Murry 2011). Nach der Geburt kommt es in der Entwicklung von KMs zu einigen entscheidenden Veränderungen, die ebenfalls Charakteristika für deren Reife darstellen. Kurz nach der Geburt verlassen KMs vermehrt den Zellzyklus und verlieren somit ihre Fähigkeit, sich in einer großen Anzahl zu teilen. Das Zellwachstum beruht nun vor allem auf Volumenzunahme, genannt Hypertrophie (Mollova et al. 2013; Lundy et al. 2013; Yiangou et al. 2019). Nach Abschluss des zehnten Lebensjahres haben fast alle KMs im Menschen den Zellzyklus verlassen und weisen polyploide (mehr als ein kompletter Chromosomensatz) und teilweise multinukleäre Kerne (mehrere Kerne in einer Zelle) auf. Dies liegt daran, dass weiterhin DNA synthetisiert wird, jedoch ohne eine anschließende Zellteilung. Mehrfache Kerne oder ein polyploider Chromosomensatz gehören zu den Reifezeichen von KMs (Lundy et al. 2013). Humane adulte KMs (Länge: 150 µm, Breite: 15 µm) sind deutlich größer als von ESC abgeleitete KMs und haben eine längliche Form. ESC-KMs sind dahingegen kleiner (Länge: zirka 5-30 µm, Breite: zirka 10 µm; abhängig vom Kulturstadium) und rundlicher (Snir et al. 2003). Nach der Geburt wird Energie für die Zellen vor allem aus der Oxidation von Fettsäuren und nicht mehr durch Glykolyse aus dem Abbau von Einfachzuckern generiert. Durch den massiven Energiebedarf der Zellen wächst der Anteil an Mitochondrien und nimmt etwa 30 % des Zellvolumens ein (Porter et al. 2011). Die Größenzunahme der Zellen ist vor allem durch den wachsenden und reifenden Kontraktionsapparat bedingt. Die Proteine des Kontraktionsapparats organisieren sich neu mit präzise ausgerichteten Myofibrillen (einzelne Muskelfasern) und einheitlichen Sarkomeren (kleinste Einheiten der Myofibrillen), die an Länge zunehmen (Siedner et al. 2003). Auch das Expressionsmuster von Proteinen des Kontraktionsapparats verändert sich. Für die Kraftentwicklung ist eine starke Aktin-Myosin-Interaktion entscheidend. Nach der Geburt

nimmt der Anteil des Proteins *engl. Beta-Myosin heavy chain* (β -MHC) in ventrikulären KMs deutlich zu. In unreifen KMs werden sowohl die Isoform β -MHC als auch die Isoform α -MHC exprimiert (Iorga et al. 2018). Weiterhin ist ein oft herangezogener Reifemarker die Expression von *engl. Myosin light chain 2* (MLC2) in KMs. Reife ventrikuläre KMs exprimieren MLC2v anstelle von MLC2a, das vor allem in unreifen oder atrialen KMs exprimiert wird (Gottshall et al. 1997; Lian et al. 2012). Elektrophysiologisch kommt es zu einer Umstrukturierung von Ionenkanälen in der Zellmembran von KMs. Während adulte ventrikuläre KMs nur kontrahieren, wenn sie durch eine benachbarte Zelle depolarisiert werden, kontrahieren iPSC-KMs spontan. Diese Fähigkeit haben im adulten Herzen nur einzelne KMs aus spezifischen Schrittmacherzentren, wie bspw. dem Sinus- oder AV-Knoten (Carmeliet 2019). Spezielle Membraneinstülpungen zur Weiterleitung von Erregungen (sog. T-Tubuli) der KMs formen sich weiter aus, sodass Stimulationsreize gezielter in die Zellen gelangen. Interzelluläre elektromechanische Verbindungen, sog. *engl. intercalated discs*, die elektrische Impulse mechanisch synchronisiert zwischen den Zellen weiterleiten, reifen weiter aus und verändern ihre Form. iPSC-KMs haben primitive T-Tubuli und eine weniger spezifizierte elektromechanische Kopplung zwischen den Zellen (Lieu et al. 2009; Yang et al. 2014b). Aufgrund der Reifeunterschiede eignen sich iPSC-KMs für die Herstellung und Erprobung von kleinen funktionellen Muskeleinheiten (Mannhardt et al. 2016; Querdel et al. 2021). Zudem können KMs in einem dreidimensionalen Format besser ausreifen als in einer 2D-Kultur (Lemoine et al. 2017).

2.4.3 Kultivierung von Kardiomyozyten in einer Hydrogelmatrix

Eine Methode für die Herstellung von EHTs ist die *in vitro*-Kultivierung von KMs in einer Hydrogelmatrix (Eschenhagen et al. 1997). Diese Technik wurde in den letzten Jahren weiter optimiert (Naito et al. 2006; Hansen et al. 2010). Die KMs werden hierbei vor der Kultivierung, eingebettet in ein Hydrogel, in vorgefertigte Gussformen eingebracht. Nach der Polymerisation des Hydrogels werden sie entnommen und in einer Kulturschale mit Medium kultiviert. Somit können verschiedene Formate hergestellt werden (Naito et al. 2006). Klassischerweise wurde künstliches Herzmuskelgewebe im Ringformat hergestellt (Zimmermann et al. 2000). Dieses Format wurde weiterentwickelt, sodass EHTs in einer Streifenform zwischen zwei Silikonstifthalterungen kultiviert werden konnte (Hansen et al. 2010; Schaaf et al. 2014; Mannhardt et al. 2016). Nach wenigen Tagen beginnt das EHT in diesem Kulturformat auxoton zu kontrahieren. Dieses Format ist mittlerweile gut etabliert und ermöglicht die Analyse von Kinetik und Kontraktilität unter verschiedenen Bedingungen. Weiterhin kann das Gewebe während der Kultur und Analyse elektrisch stimuliert werden. In den letzten Jahren konnte zudem die Herstellung von größeren, netzförmigen EHTs in diesem Format erfolgreich

etabliert werden (Weinberger et al. 2016; Querdel et al. 2021). Dieses Gewebe eignet sich als regenerativer Ansatz für den Gewebeersatz am Herzen (Querdel et al. 2021).

2.4.4 Regenerative Ansätze für strukturellen Herzersatz

Durch die fehlende Regenerationsfähigkeit (0,5 bis 1 % neugebildete KMs pro Jahr) (Bergmann et al. 2009, 2015) des Herzens führt der Verlust einer größeren Menge an KMs zu einer eingeschränkten kontraktile Funktion des Herzens (Eschenhagen et al. 2017). Zudem können fehlende oder unterentwickelte Strukturen nicht nachgebildet werden. In den letzten zwanzig Jahren haben sich regenerative Ansätze zur Therapie von Herzerkrankungen stark weiterentwickelt. Die meisten Ansätze beziehen sich auf Patienten, die an einer ischämisch bedingten Herzinsuffizienz leiden (Shiba et al. 2016; Romagnuolo et al. 2019; Querdel et al. 2021). Ein großes Forschungsfeld ist hierbei die Transplantation von KMs. Die Transplantation von KMs in das ischämisch verletzte Herz konnte bereits mehrfach in Studien, sowohl als Injektion (Shiba et al. 2012; Chong et al. 2014) als auch in Form eines EHTs (Zimmermann et al. 2006; Querdel et al. 2021), funktionell eine Verbesserung der Kontraktilität zeigen und die narbige Region partiell remuskularisieren. Injektionsstudien haben den Vorteil, dass eine große Menge an KMs auch in tiefere Schichten des Herzens bis zum Myokard vordringen kann. Studien an Großtiermodellen zeigten in diesem Zusammenhang jedoch auch das wiederkehrende Auftreten von Arrhythmien (Chong et al. 2014; Shiba et al. 2016; Romagnuolo et al. 2019). Die ersten klinischen Studien zur Injektion von KMs wurden bereits initiiert (HEAL-CHF (NCT03763136), LAPiS study (NCT04945018)). Auch die Transplantation von KMs in einer festen Matrix (EHT) wird schon lange untersucht (Zimmermann et al. 2006). Hierbei wird das EHT in den meisten Ansätzen epikardial auf das Herz genäht. Eine elektrische Koppelung mit den Wirtszellen wird zumindest partiell vermutet (Weinberger et al. 2016). Die Geometrie dieser EHTs konnte in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. Zu Beginn wurden mehrere streifenförmige EHTs sternförmig kombiniert und als Gewebepflaster transplantiert (Zimmermann et al. 2006). Im Verlauf konnten auch einheitliche Gewebepflaster hergestellt werden (Weinberger et al. 2016). Diese Geometrie wurde zusätzlich verbessert, sodass heutzutage sogar netzförmige, handtellergroße EHT-Pflaster, genannt *engl. Patch-EHTs*, transplantiert werden können (Querdel et al. 2021). Weiterhin gibt es eine erste klinische Studie (BioVAT-HF (NCT04396899) in der dieser Ansatz in Patienten mit ischämisch bedingter Herzinsuffizienz getestet wird. Auch für Patienten mit schweren angeborenen Herzfehlbildungen könnte ein struktureller Herzersatz vielversprechend sein. Hierfür ist jedoch die Herstellung von sehr großen und dreidimensional komplexen Herzmuskel-Konstrukten von Nöten. Es handelt sich hierbei oft um ganze Anteile des Herzens, die im Gegensatz zu den bisherigen Ansätzen beispielsweise eine schlauchförmige Geometrie haben oder Klappen

beinhalten. In diesem Gebiet des *Tissue Engineerings* gibt es bisher nur wenige Vorarbeiten und *in vivo*-Modelle. Ursächlich dafür sind vor allem zwei Limitationen:

- i.) Die Komplexität und Genauigkeit von *in vitro* gezüchteten Herzmuskel-Konstrukten zeigt zum Teil schon sehr viel Ähnlichkeit mit der Form nativer Herzen, bisher konnten mit diesen Modellen jedoch keine klinisch relevanten Kräfte und Flusssynamiken generiert werden.
- ii.) Bei der künstlichen Herstellung von Herz-Konstrukten erfolgt die Versorgung des Gewebes in den meisten Ansätzen über Diffusion. Daher ist die Wanddicke und somit die Stabilität bisher stark limitiert. Auch konnten mit den bisherigen Methoden keine funktionsfähigen Gebilde menschlichen Maßstabs gezüchtet werden.

Die meisten Ansätze, tubuläre Strukturen aus künstlichem Gewebe herzustellen, beziehen sich auf Gefäß-Konstrukte, die keine Herzzellen enthalten (Koch et al. 2010; Wolf et al. 2018; Von Bornstädt et al. 2018; Ghorbel et al. 2019). Erste Ansätze, um komplexere EHTs herzustellen, beruhen auf der Idee, KMs aus neonatalen Ratten im Patch-Format vorzukultivieren und dann *in vivo* um Gefäße zu nähen oder zu wickeln, sodass eine tubuläre Form entsteht (Sekine et al. 2006, 2013; Biermann et al. 2016). Auch komplexe Ventrikel-ähnliche Formen konnten mithilfe der Hydrogel-Methode hergestellt und *in vivo* getestet werden (Yildirim et al. 2007). Erste Implantationsergebnisse zeigten vitales Gewebe mit beginnender Vaskularisierung und partieller elektromechanischer Koppelung. In anderen Ansätzen wurden native adulte Herzen dezellularisiert und mit KMs besiedelt (Ott et al. 2008). Weiterhin wurden bspw. künstliche Matrizen durch eine feine Positionierung von Nanofasern mithilfe des Elektrosplinnens (Wang et al. 2017; Jin et al. 2018) kreiert. So konnten ganze Herz-Konstrukte hergestellt werden, die sogar die Größe eines ausgewachsenen Herzens erreichten. In keinem der Ansätze konnte jedoch eine klinisch relevante Funktionalität gezeigt werden. In den letzten Jahren hat sich das 3D-Bioprinting zu einem breiten Forschungsfeld im Bereich der Herstellung von komplexen Herz-Konstrukten entwickelt. Durch die präzise Positionierung von Biomaterialien, Zellen und biochemischen Substanzen in einem Schichtverfahren können Strukturen mit einer hohen Genauigkeit anhand von MRT-Vorlagen hergestellt werden. So gelang es kürzlich mehreren Forschungsgruppen, ganze Herzstrukturen aus vitalen Zellen und Biomaterialien zu drucken. Die Konstrukte zeigten jedoch bis dato keine klinisch relevante Funktionalität (Noor et al. 2019; Kupfer et al. 2020). Hiervon abgrenzen lassen sich Techniken, bei denen Zellen nicht direkt in Biotinten als Einzelzellsuspension gedruckt werden, sondern in zuvor gedruckte Trägermaterialien eingebracht werden. Auch in diesem Ansatz konnte bisher keine klinisch relevante Funktionalität gezeigt werden. Die

Herstellung von komplexen EHTs im 3D-Format steht also noch vor vielen Herausforderungen.

3 Ziel der Arbeit

Die Herstellung von EHTs aus iPSC-abgeleiteten KMs könnte potenziell durch einen Gewebeersatz neue Perspektiven für Therapien von komplexen angeborenen Herzfehlern schaffen. Kinder mit einem HLHS leider nach einer *Fontan*-Operation vor allem an einem erhöhten zentralvenösen Druck, einem fehlenden pulsatilen Fluss im Kapillarnetz der Lunge und der Überlastung des alleinigen Systemventrikels. Ein aktiver, pulsatiler Fluss in die Lungenzirkulation könnte die Langzeitprognose der Patienten dramatisch verbessern. Bisher wird das venöse Blut aus dem Körperkreislauf passiv über eine tunnelförmige Kunststoffprothese direkt in die Pulmonalarterien geleitet. Der alleinige Systemventrikel wird hierbei umgangen. Ziel dieser Arbeit war, ein kontraktiles tunnelförmiges EHT mit einer stabilen Form herzustellen, das sich perspektivisch für eine Testung am Tiermodell eignet. Die übergeordnete Absicht ist hierbei, einen *Neoventrikel* aus EHT zu schaffen, der anstelle der bisher verwendeten Kunststoffprothese einen gerichteten, pulsatilen Fluss in die Pulmonalarterien generieren kann (**Abb. 6**).

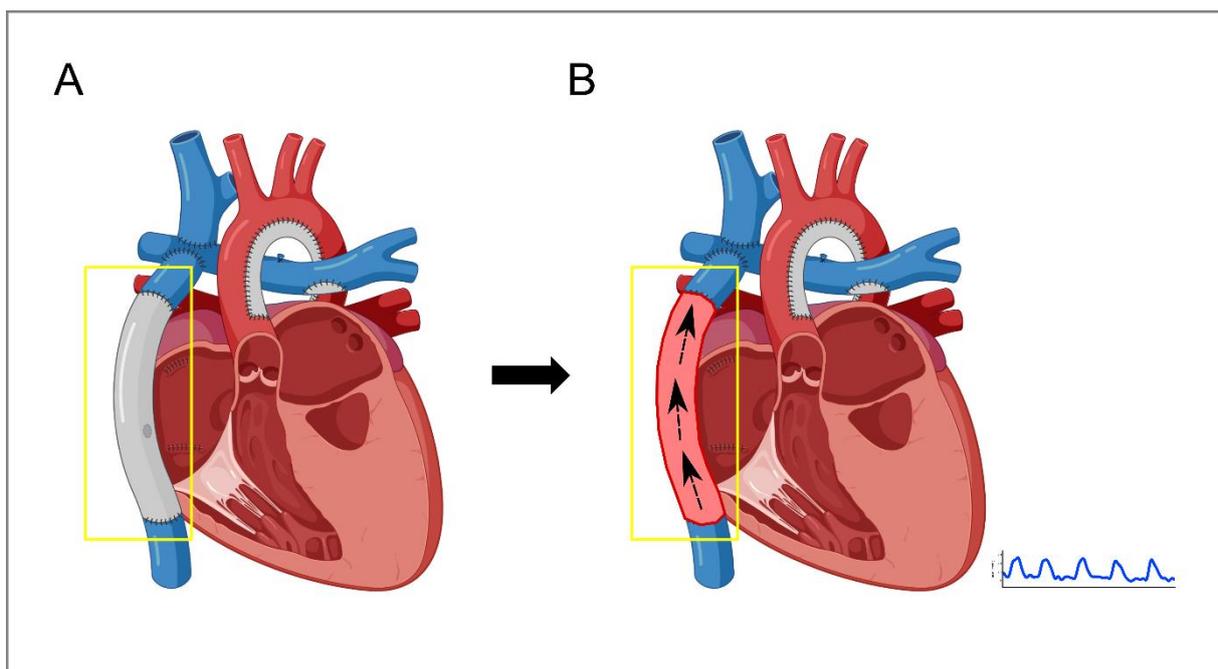


Abbildung 6: Ziel des Projekts. A: Ausgangssituation: *Fontan*-Zirkulation nach palliativer Operation am HLHS. Venöses Blut wird über die TCPC (Totale cavopulmonale Anastomose) durch einen *Fontan*-Tunnel aus Kunststoff (gelber Kasten) direkt in die *A. pulmonalis* geleitet. Der Fluss ist passiv. B: Ziel: Der *Fontan*-Tunnel aus Kunststoff soll durch ein kontraktiles tunnelförmiges EHT (gelber Kasten), ersetzt werden. Dieses soll aktiv Druck aufbauen können, um in der Theorie einen pulsatilen und gerichteten Fluss in die *Arteria pulmonalis* befördern zu können. *Modifiziert nach BioRender.com.*

Als vitales Konstrukt könnte der *Neoventrikel* zudem die Gefahr von Thromben und Obstruktionen im venösen System vermindern. Die Herstellung von kleineren komplexen 3D-Konstrukten aus EHT ist zwar mittlerweile möglich; eine stabile Form zu generieren, die sich für eine Implantation eignet, jedoch weiterhin eine Herausforderung. Um dieses Ziel zu erreichen, lag der Fokus dieser Arbeit auf folgenden zwei Punkten:

- i.) Das primäre Ziel dieser Studie war die Etablierung eines Kulturformats, um kontraktile tubuläre EHTs mit einer stabilen Form *in vitro* herzustellen. Bestenfalls sollten die Kulturbedingungen den pathologischen Bedingungen (Drücken im venösen System von *Fontan*-Patienten) ähneln. Zu diesem Zweck sollten Methoden untersucht werden, um tubuläre EHTs unter einem erhöhten Druck kultivieren zu können, die Zellen aber nicht in ihrer Entwicklung und Reife zu hemmen.
- ii.) Weiterhin sollten Methoden entwickelt werden, um tubuläre EHTs nach der Kultivierung morphologisch und funktionell zu untersuchen. Hierbei sollte vor allem geprüft werden, ob das Gewebe aktiv Kräfte generieren kann. Weiterhin sollten KMs in dem Gewebe visualisiert werden, um auf deren Anordnung, Ausrichtung und Reife rückschließen zu können.

4 Methoden

Eine umfassende Liste von verwendeten Geräten, Materialien und Substanzen ist im Anhang aufgelistet.

4.1 Medien für die Zellkultur

Folgende Medien wurden für die Kultivierung von iPSCs und zur Differenzierung von KMs verwendet (Tbl.1). Die Medien wurden wöchentlich hergestellt, steril filtriert (0.2 µm Filter) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Weiterhin sind hausintern hergestellte Lösungen und Puffer bspw. für Immunfluoreszenz-Färbungen aufgelistet.

Tabelle 1: Hausintern hergestellte Medien

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Stammzellkulturmedium FTDA	DMEM/F-12 ohne Glutamin 2 mM L-Glutamin 5 mg/L Transferrin 6,6 µg/L Natriumselenit 1% (v/v) Humanes Serumalbumin (HSA) (10% Lösung) 0,1% (v/v) Lipid Mix 5 mg/L Humanes rekombinantes Insulin 50 nM Dorsomorphin 2,5 µg/L Aktivin-A 0,5 µg/L Transforming growth factor-β 1 (TGF-β1) 30 µg/L bFGF wurde kurz vor der Verwendung hinzugegeben. Zur Passagierung wurden 10 µM Y-27632 hinzugegeben.
Medium für das Stadium 0 (EB-Medium)	FTDA 4 g/L Polyvinyl Alkohol in 1 x DPBS 10 µM Y-27632 30 µg/L bFGF wurde kurz vor der Inkubation hinzugegeben.
Medium für das Stadium 1 (Mesodermale Induktion)	RPMI 1640 4 g/L Polyvinyl Alkohol 10 mM HEPES (pH 7.4) 0,05% (v/v) Humanes Serumalbumin 5 mg/L Transferrin 6,6 µg/L Natriumselenit 0,1% (v/v) Lipid Mix 10 µM Y-27632 250 µM Phosphoascorbat Die Wachstumsfaktoren 5 µg/L bFGF, 3 µg/L Aktivin-A, und 10 µg/L BMP-4 wurden kurz vor der Verwendung hinzugegeben.

Wasch-Medium für das Stadium 1	RPMI 1640 4 g/L Polyvinyl Alkohol 10 mM HEPES (pH 7,4)
FDM Medium (Induktion der kardialen Spezifizierung)	RPMI 1640 0,5% (v/v) Penicillin/Streptomycin 10 mM HEPES (pH 7,4) 0,5% (v/v) HSA 5 mg/L Transferrin 6,6 µg/L Natriumselenit 0,1% (v/v) Lipid Mix 1 µM Y-27632 250 µM Phosphoascorbat 1µM Xav-939 wurde kurz vor der Verwendung hinzugeben.
Medium für das Stadium 2 (Kardiales Spezifizierungs-Medium 2)	RPMI 1640 0,5% (v/v) Penicillin/Streptomycin 10 mM HEPES (pH 7,4) 1 µM Y-27632 500 µM 1-Thioglyzerin 2% (v/v) B27 mit Insulin and 1 µM XAV-939 wurden kurz vor der Verwendung hinzugegeben.
RDM Medium (Kardiales Spezifizierungs-Medium 3)	RPMI 1640 0,5% (v/v) Penicillin/Streptomycin 10 mM HEPES (pH 7,4) 1 µM Y-27632 500 µM 1-Thioglyzerin 2% (v/v) B27 mit Insulin wurden kurz vor der Verwendung hinzugegeben.
Basismedium (Dissoziation)	RPMI 1640 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
Blocking-Medium (Dissoziation)	RPMI 1640 6 ml/L DNase II Type V 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin
KM Auftaumedium	RPMI 1640 10% B27 + Insulin
EHT Kultivierungsmedium	DMEM 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 10% (v/v) inaktiviertes Pferdeserum 10 mg/L Insulin 33 mg/L Aprotinin
Mastermix Medium	RPMI 1640 5% (v/v) inaktiviertes Pferdeserum 5% B27 + Insulin 10 µM Y-27632

Tabelle 2: Hausintern hergestellte Puffer und Lösungen

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Blocking-Lösung (histologische Färbungen)	10% Ziegen Serum 1% BSA 0,5% Triton-X100 In TBS
Immunfluoreszenz-Puffer (IF-Puffer; histologische Färbungen)	0,25% BSA 0,5% Triton-X100 In TBS
Tyrode-Lösung (Organbad)	126,7 mM NaCl 5,4 mM KCl 1,05 mM MgCl ₂ 1,8 mM CaCl ₂ 5 mM Glukose 22 mM NaHCO ₃ 0,42 mM Na ₂ HPO ₄
TAE Puffer (Mykoplasma-Test)	0,4 M TRIS Acetate 0,01 M EDTA pH 8,3

4.2 Zellkultur mit iPSCs

4.2.1 Kultivierung von iPSCs

Für diese Arbeit wurden humane (h) iPSCs der Linie UKEi001-A (<https://hpscereg.eu/cell-line/UKEi001-A>) verwendet. Für deren Herstellung wurden primäre Fibroblasten durch eine Hautbiopsie von einem gesunden Spender entnommen. Anschließend erfolgte eine Sendai Virus-basierte Reprogrammierung (AZ. PV4798/28.10.2014) durch die *Core Facility* des Hamburg Zentrum für Experimentelle Therapieforschung (HEXT). Die Versuche wurden durch die Hamburger Ethikkommission genehmigt (AZ. PV4798/28.10.2014). Die in dieser Studie verwendeten hiPSCs stammten aus einer Working-Zellbank, die im Rahmen des ERC Projektes *IndividuHeart* angelegt worden war. Diese zeigten einen normalen Karyotyp und waren Mykoplasma-negativ getestet. Die Zellkultur mit iPSCs erfolgte unter sterilen Bedingungen. Für die Stammzellkultur wurden keine Antibiotika verwendet. Dies erforderte zusätzliche hygienische Maßnahmen. Für alle Arbeiten mit Stammzellen wurden medizinische Gesichtsschutzmasken, Plastikarmschützer und Handschuhe getragen. Zusätzlich wurden Arme und Hände regelmäßig vor und während der Arbeit mit 70 % Ethanol desinfiziert. Die Expansion und Kultivierung von iPSCs erfolgte unter hypoxischen Bedingungen im Inkubator (5 % CO₂, 5 % O₂, 37 °C, *engl. relative humidity* (RH) 98 %) in Geltrex®-beschichteten Zellkulturflaschen. Wenn das Zellwachstum auf dem Boden der Zellkulturflaschen eine Konfluenz von 100 % erreicht hatte, wurden die Zellen abgelöst, gezählt, neu ausgesät und ggf. expandiert. Hierfür wurde der Zellrasen zunächst einmalig mit DPBS gewaschen und mit 0,1 ml/cm² Accutase + Y-27632 (10 µM) für 5 bis 10 Minuten unter o.g. Bedingungen inkubiert.

Dieser Schritt erfolgte, um die Zell-Zellkontakte zu lösen. Anschließend wurde die Accutase mit demselben Anteil an FTDA + Y-27632 neutralisiert. Nach einer Zentrifugation bei 200 g für 2 Minuten wurden die Zellen in FTDA + Y-27632 resuspendiert. Mithilfe des Zellzählers (CASY) wurden die Anzahl der Zellen in der Suspension, die Vitalität und die Anzahl an verbliebenen Zellaggregaten bestimmt. Eine Vitalität von mindestens 85 % und ein Aggregations-Koeffizient (AGG) von <2 wurde hierbei für eine weitere Kultur der Zellen vorausgesetzt. Alternativ wurden die Zellen mithilfe von Trypan-Blau und einer Neubauer-Zählkammer manuell gezählt. Für eine fortlaufende Kultivierung oder eine Expansion wurden $4 \times 10^4 - 8,6 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 in FTDA + Y-27632 ausgesät und für 24h kultiviert. Anschließend erfolgte die Kultivierung in FTDA Medium ohne die Zugabe von Y-27632. Es wurden darauffolgend tägliche Medienwechsel durchgeführt. Bei starkem Medienverbrauch mit steigender Zellzahl wurde der Medienwechsel auch zweimal täglich ausgeführt.

4.2.2 Beschichtung von Zellkulturflaschen

Die Zellkulturflaschen wurden vor der Verwendung für die Stammzellkultur mit einer Geltrex®-Beschichtung, 1:100 Verdünnung in RPMI 1640 Medium, versehen. Hierfür wurden Standard-Zellkulturplatten oder -flaschen mit einem Volumen von $0,09 \text{ ml/cm}^2$ beschichtet und anschließend für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert.

4.2.3 Einfrieren von iPSCs

Für eine spätere Verwendung wurden die Stammzellen nach der Expansion kryokonserviert. Hierfür wurden die iPSCs-Zellen nach der Zellzählung nicht ausgesät, sondern in fetalem Kälber-Serum (*engl. Fetal Bovine Serum, (FBS)*) + Dimethylsulfoxide (DMSO); 10:1; zirka 1×10^6 iPSC-Zellen in 1 ml) eingefroren. Zunächst wurde die Zellsuspension in einem Behälter mit Isopropanol-Alkohol (*engl. „Mr. Frosty“*) für 24 h bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Als alternative Möglichkeit wurde ein automatischer Kryokonservierer (Asymptote EF 600, GE Healthcare) genutzt, um die Zellsuspension schrittweise und schonend auf -80°C herunterzukühlen. Anschließend wurden die Suspension bis zur erneuten Verwendung in einen Stickstofftank überführt und bei $-150 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.2.4 Auftauen von iPSCs

Zum Auftauen wurden die Zellen für wenige Minuten in einem Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen zurückblieb (zirka 5 mm Durchmesser). Anschließend wurde 1 ml Medium (vorgewärmt auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$) hinzu pipettiert. Darauffolgend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit 2 ml Medium aufgefüllt und bei 200 g für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in Stammzellkulturmedium FTDA + Y-27632 ($10 \text{ } \mu\text{M}$) aufgenommen und auf Geltrex®-

beschichteten Platten ausgesät (siehe Kapitel 4.2.1 und 4.2.2). Nach weiteren 24 h erfolgte eine Kultivierung in FTDA ohne die Zugabe von Y-27632, wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben.

4.2.5 Mykoplasma Test

Während der Stammzellkultur und nach dem Auftauen erfolgten regelmäßige Kontrollen auf Mykoplasmen, um einen schleichenden Befall der Kultur auszuschließen. Hierfür wurde verbrauchtes Zellkulturmedium (zirka 1 ml) entnommen, für 10 min bei 100 °C inkubiert und anschließend für kurze Zeit zentrifugiert. Anschließend wurden 2 µl des Überstands zu einem PCR Mastermix (**Tbl. 3**) hinzugegeben.

Tabelle 3: PCR Mastermix für den Mykoplasma Test

Name	Volumen
10x Puffer	5 µl
Q-Lösung	10 µl
MgCl₂ (25mM)	4 µl
Primerpool Myco-F (10pM)	1 µl
Primerpool Myco-R (10pM)	1 µl
dNTPs	1 µl
Taq-DNA Polymerase	0,25 µl
DNA Probe	2 µl
Nuclease freies Wasser	25,75 µl
Total	50 µl

Nach Ablauf der PCR-Zyklen nach dem empfohlenen Programm (**Tbl. 4**) wurden die Produkte mithilfe von Gelelektrophorese auf einem 1% (w/v) Agarose-Gel mit TAE Puffer (**Tbl. 2**) aufgetrennt und analysiert. Positiv- und Negativkontrollen wurden für jeden Ablauf miteinbezogen.

Tabelle 4: PCR Protokoll für den Mykoplasma Test

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min	40x
94 °C	30 sek	
56 °C	30 sek	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

4.2.6 Pluripotenz-Analyse

Neben morphologischen Kontrollen erfolgten regelmäßige Färbungen für den Pluripotenz-Marker SSEA3 (*engl. Stage-Specific Embryonic Antigen 3*), um eine Ausdifferenzierung der Stammzellen während der Kultivierung ausschließen zu können. Für die Färbung wurden $0,5 \times 10^6$ - 1×10^6 iPSCs vor dem erneuten Aussäen entnommen und in 1 ml FBS für zirka 15

Minuten inkubiert. In einem nächsten Schritt wurde die Zellsuspension in spezielle FACS (*engl. Fluoreszenz Activated Cell Sorting*) Röhrchen überführt und mit 1 ml DPBS + 5% FBS gewaschen. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 200 g für 2 Minuten. Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die Zellen in 100 µl Antikörper-Lösung resuspendiert und für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweifach gewaschen und zentrifugiert, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für die Analyse wurden die Zellen nach dem Waschen in 250 µl DPBS aufgenommen. Eine Analyse erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie. Hierfür wurde das Gerät Canto II (BD Biosciences) verwendet. Als Kontrolle wurden ungefärbte Zellen verwendet. Diese wurden genutzt, um den Fluoreszenz-Schwellenwert (< 0,5% der Zellen wurden als SSEA3⁺ bezeichnet) festzulegen. Die Daten wurden mit der FlowJo V10 oder FACS Diva Software analysiert. Alle Durchflusszytometrie-Messungen wurden in der FACS Core Facility des UKE durchgeführt.

4.3 Kardiale Differenzierung und Zell Präparation

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden zwei hiPS-Zelllinien verwendet. Die meisten Experimente basierten auf der Verwendung von KMs, die aus der Reprogrammierung der in Kapitel 4.2.1 beschriebenen hiPS-Zelllinie UKEi001-A hervorgegangen sind. Für anfängliche Versuche (tubuläre EHTs, die in einem 6-Wellformat kultiviert wurden; Kapitel 4.4.1 – 4.4.2) wurden KMs verwendet, die von hiPSCs der Linie C25 abstammen. Diese wurde von Dr. Moretti zur Verfügung gestellt und retroviral reprogrammiert (Moretti et al. 2010). KMs aus dieser Zelllinie waren von Dr. Kaja Breckwoldt differenziert worden. Diese Zellen wiesen, im Gegensatz zu den KMs, welche von der hiPS-Zelllinie UKEi001-A abgeleitet waren, eine Trisomie 1 auf. Da es aber zunächst nur um eine grobe funktionelle Orientierung in verschiedenen Formaten ging, war dieser Fakt vernachlässigbar. Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten hiPSC-abgeleiteten KMs wurde ein Protokoll verwendet, das die Differenzierung im 3D-Format in Form von Zellaggregaten s.g. *engl. Embroid Bodys* (EBs), beschreibt. Dieses Protokoll wurde leicht modifiziert und beruht auf der Publikation von Kaja Breckwoldt (Breckwoldt et al. 2017).

4.3.1 Stadium 0 – Bildung von Zellaggregaten, EBs

Nach der Expansion der Stammzellen in T75-Zellkulturflaschen wurden diese, nach Erreichen der Konfluenz, zunächst in FTDA + Y-27632 (10 µM) für zirka 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, vom Zellrasen abgelöst und gezählt, wie in Kapitel 4.2.1 für die Stammzellkultur beschrieben. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in Medium für das Stadium 0 (**Tbl. 1**; 3×10^4 per ml) aufgenommen. Diese Suspension wurde schrittweise in Spinnerflaschen pipettiert. Für die EB-Bildung wurden die Flaschen auf einem Magnetrührer positioniert und unter konstanten Rührbewegungen für 24 h bei 40

Umdrehungen pro Minute inkubiert. Die Kultivierung erfolgte unter hypoxischen Bedingungen (siehe Kapitel 4.2.1).

4.3.2 Stadium 1 – Induktion der mesodermalen Differenzierung

Nach 24 h (Tag 2) auf dem Magnetrührer wurde die Suspension mit EBs aus den Spinnerflaschen in T175 Zellkulturflaschen überführt. Diese wurden zuvor mit 1% Pluronic-F127 in DPBS für 24 h bei 37 °C inkubiert und vor der Verwendung zweimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden diese für die Überführung der EB-Suspension auf V-förmigen Halterungen platziert, sodass sich die EBs in einer Ecke der Flasche sammeln konnten. Das ungefähre Zellvolumen wurde in einem Falcon-Röhrchen (15 ml) abgeschätzt, nachdem ein Anteil der EB Suspension (10 ml) in das Falcon-Röhrchen überführt wurde und sedimentieren konnte. Das Gesamtvolumen an EBs wurde anschließend mit folgender Formel bestimmt: $EB_{\text{total}} = EB_{10\text{ml}} \times V_{\text{total}} / 10 \text{ ml}$. Nach der Abschätzung des EB-Volumens wurde die Gesamtzellsuspension auf mehrere T175 Zellkulturflaschen (200 - 250 µl EBs in 46 ml/T175) verteilt und mit Medium für das Stadium 1 (**Tbl.1**) aufgefüllt. In diesem Medium wurden die EBs bis zum Tag 5 weiterhin unter hypoxischen Bedingungen inkubiert, um die Induktion der mesodermalen Differenzierung zu starten. Innerhalb dieser Zeit wurde täglich die Hälfte des Mediums (23 ml/d) erneuert.

4.3.3 Stadium 2 – Induktion der kardialen Spezifizierung

An Tag 5 wurden die T175 Flaschen erneut auf den V-förmigen Gestellen positioniert, sodass die EBs sedimentieren konnten. Anschließend wurden die EBs mit dem FDM Medium (**Tbl.1**) gewaschen. Zudem wurde das Volumen der Zellaggregate erneut geschätzt (siehe Kapitel 4.3.2), da während der mesodermalen Differenzierung Zellen absterben. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder auf T175 Flaschen verteilt (200 µl EBs in 46 ml FDM Medium/T175) und unter Normoxie (21 % O₂, 5 % CO₂) für weitere 48 h (bis Tag 7) kultiviert. Es wurden erneut täglich 23 ml des Mediums gewechselt. An Tag 7 wurde FDM Medium durch Medium für das Stadium 2 (**Tbl.1**) ausgetauscht und es erfolgten erneut halbe tägliche Medienwechsel bis Tag 11. In diesem Zeitraum begannen die EBs zu kontrahieren (etwa ab Tag 9). An Tag 12 war die kardiale Differenzierung in der Regel bereits erfolgt und das Medium für das Stadium 1 wurde durch RDM Medium (**Tbl.1**) ersetzt. Für die letzten beiden Medienwechsel wurden keine Waschschriffe durchgeführt.

4.3.4 Dissoziation der EBs

Nach 18 Tagen Kultivierung wurden die Zellen entweder für Experimente verwendet oder kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellaggregate zunächst dissoziiert. Nach der Sedimentierung der EBs auf den V-förmigen Halterungen wurde in einem ersten Schritt das

überstehende Medium aspiriert. Weiterhin erfolgten zwei Waschschriffe mit HBSS. Für die Dissoziation wurde die Zellsuspension in 20 ml pro T175 Kollagenase II (200 U/ml in HEPES) mit 30 μM *engl. N-benzyl-p-toluene Sulfonamide* (BTS) und 10 μM Y-27632 für 2 - 4 h bei 37 °C inkubiert, bis sich die EB-Struktur auflockerte. Während dieser Zeit wurde die Morphologie der EBs regelmäßig unter dem Mikroskop untersucht. Anschließend wurden die EBs in 20 ml/T175 Blocking-Medium (**Tbl.1**) aufgenommen und weiter durch zügiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Suspension wurde dann bei 100 g für 10 Minuten schonend zentrifugiert und in Basismedium (**Tbl.1**) aufgenommen. Abschließend erfolgte die Zellzählung mit der Neubauer Zählkammer wie für die Stammzellkultur in Kapitel 4.2.1 beschrieben.

4.3.5 Einfrieren von Kardiomyozyten

Zur Lagerung wurden die KMs bei -150 °C kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen nach der Dissoziation erneut bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert und in hitzeinaktiviertem FBS und DMSO (10:1) resuspendiert. Das Einfrieren wurde, wie in Kapitel 4.2.3 für die Stammzellen beschrieben, durchgeführt.

4.3.6 Auftauen von Kardiomyozyten

Für das Auftauen von KMs wurden die Ampullen mit der Zellsuspension in einem Wasserbad, wie zuvor in Kapitel 4.2.3 beschrieben, bei 37 °C vorgewärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in vorgewärmtes Auftaumedium (9 ml) aufgenommen, welches tröpfchenweise hinzugegeben wurde. Die Zellen wurden darauffolgend mithilfe von Trypan-Blau in der Neubauer Zählkammer gezählt und für die Herstellung von EHTs verwendet.

4.4 Herstellung und Kultivierung von tubulären EHTs

Alle in dieser Arbeit entwickelten Methoden zur Herstellung von tubulären EHTs basieren auf der Methode, KMs in einer Fibrinmatrix in vorgefertigte Gussformen einzubringen. Diese Methode wurde für die Herstellung von streifenförmigen EHTs im Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf entwickelt (Hansen et al. 2010; Schaaf et al. 2014). Hierfür wird das Enzym Thrombin in einer spezifischen Konzentration kurz vor dem Guss zu einem gekühlten (4°C auf Eis) Mastermix aus Zellen, Fibrinogen, Wachstums- und Ernährungsbestandteilen hinzugegeben. Dies führt zur Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und damit zum Aushärten des Hydrogels. Standardmäßig geschieht dies in einem Gussformat für streifenförmige EHTs. Dieses wurde für die Herstellung von tubulären EHTs modifiziert. Alle EHTs wurden unter hyperoxischen Bedingungen (40% O₂, 7% CO₂, 98% RH) bei 37 °C kultiviert. Die Mastermixprotokolle für die unterschiedlichen Gussformate sind in den jeweiligen Kapiteln zu finden. Zunächst wurde zur Herstellung von tubulären EHTs für das Austesten von verschiedenen Kulturformaten nur eine

geringe Stückzahl an EHTs hergestellt. Zudem erfolgten nur Wiederholungen oder systematische Analysen und Auswertungen, wenn sich das Gewebe in dem Kulturformat entwickeln konnte und zu kontrahieren begann. Dies erfolgte, um zunächst eine Orientierung für ein optimales Setting zu bekommen und somit Kosten und Zeit in der Produktion von KMs zu sparen. Eine Verwendung von Matrigel für die EHT Herstellung erfolgte nur in anfänglichen Versuchen dieser Arbeit (Kapitel 4.4.1. – 4.4.2). Für weiterführende Versuche (Kapitel 4.4.3 – 4.4.4) wurde auf diese Komponente verzichtet, da gezeigt werden konnte, dass sie für die Funktion der EHTs nicht entscheidend ist (Naito et al. 2006).

4.4.1 Tubuläre EHTs im 6-Wellformat

Für die ersten Versuche zur Herstellung tubulärer EHTs wurden KMs in einer Fibrinmatrix um kleine vertikal fixierte Silikonsäulen (zwei Innendurchmesser (ID): zirka 0,8 cm und 0,6 cm, Höhe (H): 1 cm) auf einer 6-Wellplatte gegossen (**Abb. 7**).

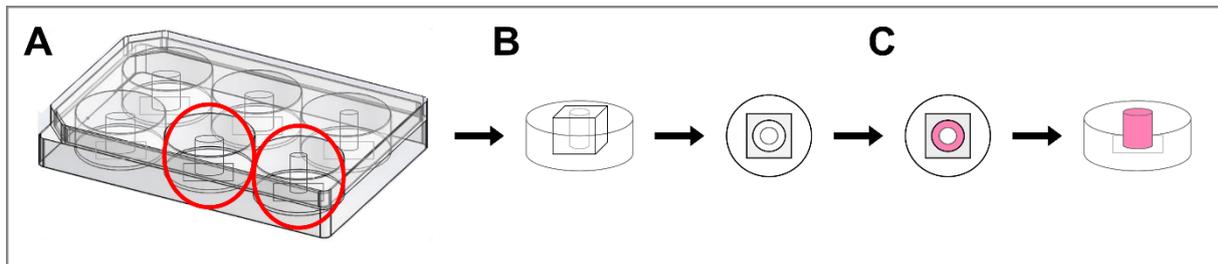


Abbildung 7: Gussystem von tubulären EHTs im 6-Wellformat. A: Modifizierte 6-Wellplatte mit zentral fixierten Silikonsäulen (rot). B: Würfelförmige Hohlzylinder positioniert im Well, links: Ansicht von der Seite, rechts: Ansicht von oben. C: Zustand nach dem Guss des EHTs (pink), links: Ansicht von oben, rechts: Ansicht von der Seite, der Zylinder wurde bereits entfernt.

Hierfür wurde ein selbst angefertigtes Gussformat entwickelt. Dieses beruht auf der Vorarbeit von Dr. Ingra Mannhardt. Für das Gussformat wurden i) modifizierte 6-Wellplatten und ii) quaderförmige Hohlzylinder aus Teflon (Breite (B): 1,5 cm, Länge (L): 1,5 cm, H: 1 cm, ID: 1,1 cm) hergestellt.

4.4.1.1 Materialherstellung

Für die modifizierten 6-Wellplatten wurden zunächst kleine Silikonsäulen selbst gegossen. Entscheidend war hierbei eine geringe Silikonwandstärke (Wandstärke (WS) <0,5 mm). Hierfür wurde ein Silikon-Kit (Sylgard 184) verwendet und in einem Verhältnis von 1:10 mit dem Vernetzer unter kontinuierlichen Rührbewegungen vermischt. Anschließend wurde die Lösung unter Vakuum entlüftet. Dann wurden kleine Plastikzylinder (*engl. small sample container* (SSC)), die als Form-Matrize für den Guss dienten, kurz in das noch flüssige Silikon eingetaucht und durch Büroklammern innerhalb von Falcon-Röhrchen befestigt (**Abb.8**). Die Falcons wurden fortlaufend in einem Hybridisierungsöfen auf einer Rotationsvorrichtung positioniert. Eine Aushärtung des Silikons um die Plastikzylinder erfolgte bei 40°C über 24 h

unter kontinuierlicher Rotation. So wurde eine gleichmäßige Verteilung des Silikons ermöglicht. Anschließend wurden die Zylinder für 1 h in 70% Ethanol eingelegt.

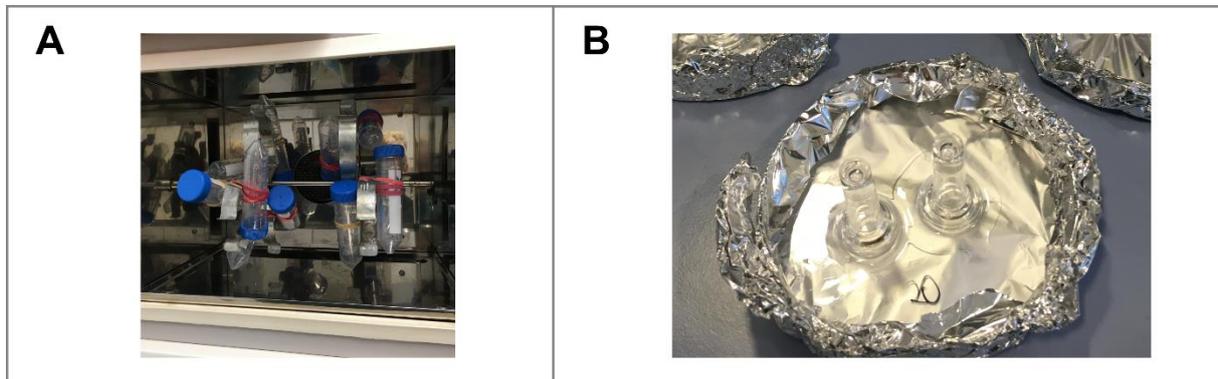


Abbildung 8: Herstellung von Silikonschläuchen. A: Falcons auf einer Rotationsvorrichtung im Hybridisierungsöfen. B: Guss-Matrizen mit Silikon beim Trocknen.

Dies erleichterte die Ablösung des sehr dünnwandigen Silikon von den Plastikzylindern. Die Ablösung erfolgte manuell. Unter Zuhilfenahme eines Skalpell wurde die Silikonzylinder anschließend an die Höhe der Teflonzylinder (zirka 1 cm) angepasst. Weiterhin wurden die Silikonsäulen zentral auf den einzelnen Wellflächen der Zellkulturplatte positioniert, mit frisch angemischtem flüssigen Silikon umgossen und anschließend bei 40 °C für 24 h im Wärmeofen verfestigt. Nach der Aushärtung wurden die selbstangefertigten Teflonzylinder um die Silikonsäulen positioniert und ebenfalls mit frisch angemischtem flüssigem Silikon umgossen. Nach der erneuten Aushärtung des Silikons bei 40 °C für 24 h wurden die Teflonzylinder entfernt. So entstand ein spezifischer Abdruck für die Zylinder um die Silikonsäule. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um ein Verrutschen der Teflonzylinder um die Silikonsäule während der Herstellung des EHTs zu vermeiden. Vor dem Guss wurden Teflonzylinder und Instrumente zur Sterilisation autoklaviert. Die modifizierte 6-Wellplatte wurde zuvor für 30 min in 70 % Ethanol eingelegt und anschließend mit sterilem Wasser gereinigt.

4.4.1.2 Guss

Für den Guss der EHTs wurden in einem ersten Schritt die Teflonzylinder mit einer Pinzette um die Silikonsäulen, innerhalb des spezifischen Abdrucks, positioniert (**Abb. 7 B**). In einem nächsten Schritt wurde der vorgekühlte Mastermix (**Tbl. 5**) mit den KMs in den Raum zwischen dem Teflonzylinder und der Silikonsäule gegossen (**Abb. 7 C**). Anschließend wurde die Platte verschlossen und zur Vernetzung des Hydrogels bei 37 °C für 20 min inkubiert. Nach Abschluss der Polymerisation wurde der Teflonzylinder durch leichte Kippbewegungen mit einer Pinzette von dem EHT entfernt, sodass ein tubuläres Format in vertikaler Ausrichtung um die Silikonsäule entstand (**Abb. 7 C**). Für die Kultivierung wurden die 6-Wellplatten mit 5 ml EHT-Kultivierungsmedium (**Tbl.1**) gefüllt, sodass die EHTs von außen vollständig mit

Medium benetzt waren. Es erfolgte eine Kultivierung für 21 Tage mit täglichen Medienwechseln.

Tabelle 5: Mastermix-Komponenten für tubuläre EHTs im 6-Wellformat

<i>Mastermix-Komponente</i>	<i>Konzentration</i>
Mastermix Medium (siehe Tbl.1)	Füllvolumen, um auf ein Endvolumen von 400 oder 600 µl zu kommen
2 x DMEM	1,7 mg/ml
Matrigel	10 %
Fibrinogen	5 mg/ml
Thrombin	1,6 U/ml
hiPSC Kardiomyozyten	10x10 ⁶ /ml

Die EHTs wurden entweder unter kontinuierlichen Kippbewegungen auf einem Schüttler, wie bereits für die Kultivierung von Patch-EHTs gezeigt (Querdel et al. 2021), oder unter statischen Bedingungen im Inkubator kultiviert. Im Gegensatz zur Herstellung von Patch-EHTs (Querdel et al. 2021) wurde der Anteil an Thrombin (3 U/ml) für den Mastermix erhöht, um eine Vernetzung nach dem Guss zu beschleunigen. EHTs wurden mit einem Gesamtgussvolumen von 400 µl (bei Silikonsäulen mit ID: 0;8 cm) oder 600 µl (bei Silikonsäulen mit ID: 0;6 cm) hergestellt. Während der Kultivierung erfolgten kontinuierliche morphologische Kontrollen durch die Verwendung eines Binokularmikroskops.

4.4.2 Stapel-EHTs

Für ein weiteres Experiment, in dem EHTs um eine Silikonsäule übereinandergestapelt wurden, wurde das zuvor beschriebene 6-Wellformat abgewandelt. Hierfür wurden die Silikonsäulen wie zuvor hergestellt, jedoch in einer größeren Höhe präpariert (Höhe: zirka 2 cm). Anschließend wurden diese nicht auf einer 6-Wellplatte, sondern auf einer Kristallisierungsschale befestigt. Für die Kultivierung wurde die Kristallisierungsschale in einem dafür hergestellten kastenförmigen Behälter aus Teflon befestigt, der auf dem Schüttler fixiert werden konnte. Der Deckel einer 6-Wellplatte konnte passgenau auf dem Behälter als Abdeckung befestigt werden. Die Kristallisierungsschale und der Behälter aus Teflon konnten vor dem Versuch autoklaviert werden. Für die Herstellung von Stapel-EHTs wurden EHTs zunächst bis zur mikroskopisch sichtbaren Kontraktion im 6-Wellformat vorkultiviert. Anschließend wurden diese vorsichtig unter Zuhilfenahme einer sterilen Pinzette von den Silikonsäulen auf der 6-Wellplatte entfernt und auf die höheren Silikonsäulen auf der Kristallisierungsschale überführt. Um eine Säule wurden bis zu drei EHTs übereinandergestapelt und mit der Pinzette leicht aneinandergedrückt, um Spalträume zwischen den EHTs zu minimieren. Diese Stapel-EHTs wurden anschließend bis zum Tag 21 mit regelmäßigen Medienwechseln (alle zwei Tage 20 ml) kultiviert.

4.4.3 Gewickelte EHTs

In einem weiteren Experiment wurden Patch-EHTs um einen Perfusionsschlauch aus Silikon gewickelt und in einem pulsatilen Perfusionssystem (siehe Kapitel 4.4.5) kultiviert.

4.4.3.1 Herstellung von Patch-EHTs

Die Entwicklung von netzförmigen Patch-EHTs erfolgte im Institut für experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des UKE. Die Methoden zu deren Herstellung und Kultivierung und deren Testung am Tiermodell wurden kürzlich publiziert (Querdel et al. 2021). Kurz zusammengefasst wurden KMs in einer Fibrinmatrix in eine viereckige Gussform mit bodenbehafteten Silikonknoten eingebracht. Nach der Polymerisation und Ablösung der Matrix aus der Gussform entstand ein netzförmiges EHT, welches zwischen sechs Silikonfortsätzen aufgehängt war (**Abb. 9**).

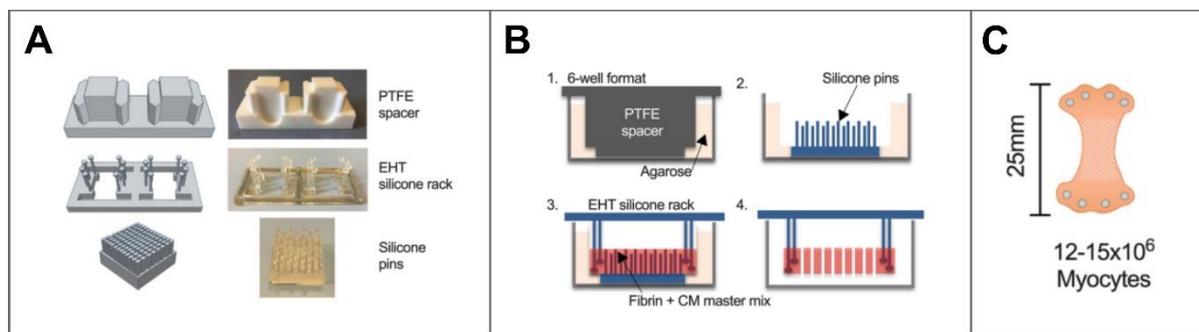


Abbildung 9: Gussformat für Patch-EHTs. A: Materialien für den Guss von Patch-EHTs. B: Gussystem für Patch-EHTs. 1. Herstellung einer Gussform in Agarose durch Platzhalter aus Teflon (engl. *PTFE spacer*). 2. Positionierung von Silikonknoten (engl. *Silicone pins*) in der Gussform. 3. Platzierung der EHT-Halterung aus Silikonstiften (engl. *EHT silicone racks*) in der Gussform. 4. Kultivierung von Patch-EHTs im 6-Wellformat. Zustand nach Guss, die EHT-Halterung wurde mit dem EHT aus der Gussform entfernt und auf eine 6-Wellplatte mit Kulturmedium überführt. C: Schematische Darstellung eines Patch-EHTs nach dem Ende der Kultivierungszeit. *Modifiziert nach* (Querdel et al. 2021).

Das EHT wurde anschließend in hängender Position auf 6-Wellplatten fixiert und für 21 Tage unter kontinuierlichen Kippbewegungen auf einem Schüttler im Inkubator kultiviert. Netzförmige Patch-EHTs wurden für diese Arbeit auf der Basis dieser Protokolle hergestellt und kultiviert. Hierbei wurde das Gesamtgussvolumen leicht erhöht (von 1500 μ l auf 2000 μ l). Dies erfolgte mit der Intension, die Netzlöcher, welche durch die Silikonknoten in der Gussform bei der Herstellung des EHTs entstehen, anteilig zu verdecken und somit eine stabilere Form zu generieren. Zudem wurde eine höhere Fibrindosis (10 mg/ml anstelle von 5 mg/ml) für den Mastermix gewählt und verschiedene KM-Zelldichten untersucht. Es wurden drei Patch-EHTs mit drei unterschiedlichen Dosen an KMs hergestellt, eine niedrige (17×10^6 KMs/2000 μ l), eine mittlere (23×10^6 KMs/2000 μ l) und eine hohe Dosis (29×10^6 KMs/2000 μ l). Die Mastermix Komponenten für den Guss von Patch-EHTs sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Mastermix-Komponenten für Patch-EHTs

<i>Mastermix-Komponente</i>	<i>Konzentration</i>
Mastermix Medium (siehe Tbl.1)	Füllvolumen, um auf ein Endvolumen von 2000 µl zu kommen
2 x DMEM	1.7 mg/ml
Fibrinogen	10 mg/ml
Thrombin	1,6 U/ml
hiPSC Kardiomyozyten	8,5x10 ⁶ /ml; 11,5x10 ⁶ /ml; 14,5x10 ⁶ /ml

Nach dem Gießen wurden die EHTs anstelle von 21 Tagen nur bis zum Beginn der mikroskopischen Kontraktion (5 - 9 Tage) unter kontinuierlichen Kippbewegungen im Inkubator vorkultiviert.

4.4.3.2 Herstellung von gewickelten EHTs aus Patch-EHTs

Nach der Vorkultivierung wurden die Patch-EHTs vorsichtig mit einer Pinzette von den Silikonhalterungen gelöst, tubulär um einen Perfusionsschlauch aus Silikon in einer Perfusionskammer gewickelt und an den Enden zweifach mit einem Prolene-Faden der Stärke 3.0 mithilfe der Einzelknopftechnik vernäht. Diese Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die EHTs für weitere 8 Tage in einem pulsatilem Perfusionssystem kultiviert (siehe Kapitel 4.4.5).

4.4.4 Tubuläre EHTs in einer Perfusionskammer

Für die Kultivierung von tubulären EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem wurde im Zuge dieser Arbeit ein neues Gussformat entwickelt. Dieser Teil der Arbeit, zur Herstellung von tubulären EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem, wurde in dem Journal EJCTS von Köhne et al. publiziert (Köhne et al. 2022). Die Zusammensetzung des Mastermix wurde für dieses Format weiter adaptiert (**Tbl. 7**).

Tabelle 7: Mastermix-Komponenten für Tubuläre EHTs in einer Perfusionskammer

<i>Mastermix-Komponente</i>	<i>Konzentration</i>
Mastermix Medium	Füllvolumen, um auf ein Endvolumen von 905 µl zu kommen
2 x DMEM	1,7 mg/ml
Fibrinogen	10 mg/ml
Thrombin	3 U/ml
hiPSC Kardiomyozyten	18x10 ⁶ /ml

Um eine schnellere Aushärtung des Hydrogels und somit eine gleichmäßigere Zellausrichtung zu erlangen, wurde die Konzentration von Thrombin im Gegensatz zu der Kultivierung von EHTs im 6-Wellformat auf 3 U/ml erhöht. Es wurde die gleiche Konzentration an Fibrinogen gewählt (10 mg/ml), welche für die Kultivierung von Patch-EHTs verwendet worden war, um

eine höhere Stabilität zu erhalten. Zudem wurde auch die Anzahl an KMs pro ml erhöht (**Tbl. 7**). In diesem Format wurden EHTs in horizontaler Ausrichtung um einen selbstangefertigten Perfusionschlauch aus Silikon (siehe Kapitel 4.4.6) gegossen. Dieser war in einer eigenangefertigten Kultivierungskammer aus Teflon befestigt (**Abb. 10**).

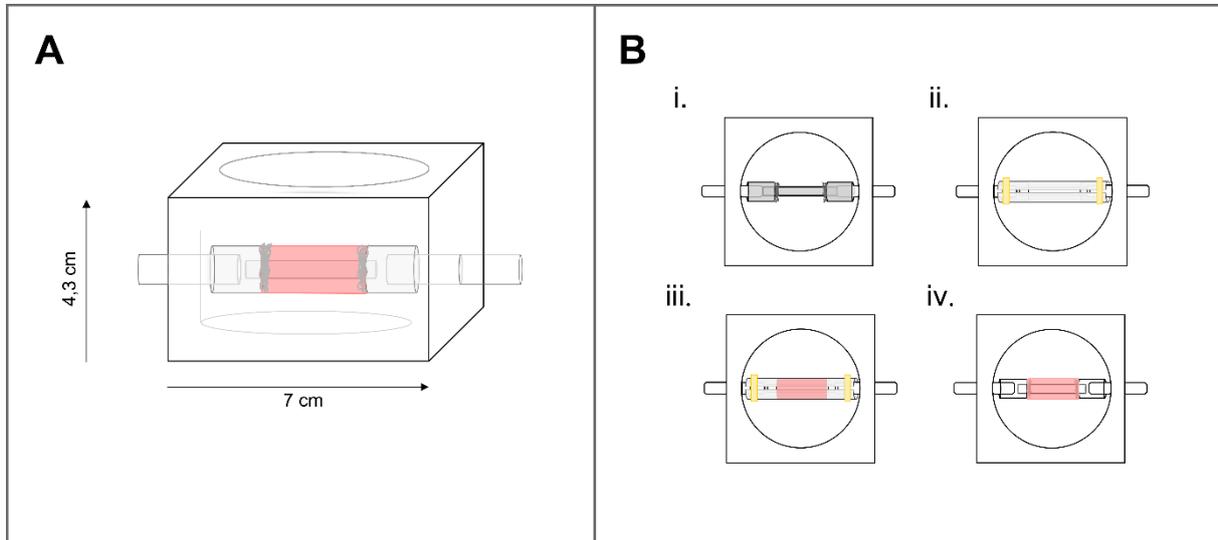


Abbildung 10: Kulturformat für tubuläre EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem. A: Schematische Darstellung der Kultivierungskammer mit EHT (rosa). B: Gussystem für tubuläre EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem. *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Für den Guss wurde erstens der Perfusionschlauch mithilfe einer chirurgischen Pinzette zwischen zwei Flussadaptern aus Edelstahl (ID: 0,4 cm, WS: 0,1 cm) positioniert (**Abb. 10 B i**). Zweitens wurde ein Silikonchlauch mit einem größeren Innendurchmesser (0,8 cm), der zuvor längs einseitig eingeschnitten wurde, unter Zuhilfenahme der Pinzetten von außen um den Perfusionschlauch positioniert und mit Kabelbindern an beiden Enden fixiert (**Abb. 10 B ii**). Hierbei wurde der Schlauch so positioniert, dass der Längseinschnitt als schmaler Spalt zentral von oben sichtbar war. Der äußere Silikonchlauch wurde zuvor für zirka 20 min mit 5 % Pluronic in DPBS beschichtet und anschließend zweimalig kurz mit DPBS gewaschen. Dieser Schritt erfolgte, um nach dem Guss ein Ablösen vom EHT zu erleichtern. Während der vorherigen Schritte wurde zeitgleich der Mastermix mit den KMs vorbereitet und auf Eis kühlgestellt. Kurz vor dem Guss wurde Thrombin zu dem vorbereiteten Mastermix hinzugegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit dem Mastermix vermischt. Der Mastermix wurde dann durch den o.g. Längseinschnitt in den Raum zwischen dem Perfusionschlauch und dem darüber positionierten Silikonchlauch gegossen (**Abb. 10 B iii**). EHTs wurden mit einem Gesamtgussvolumen von 905 μl hergestellt. Anschließend wurde die Kammer mit einer als Deckel fungierenden Glaspetrischale (60 x 15 mm) verschlossen und bei 37 °C für 20 min inkubiert, um eine Vernetzung des Hydrogels zu beschleunigen. Nach der Aushärtung des Hydrogels wurde der Kabelbinder um den äußeren Schlauch mit einer Zange gelöst. In einem

weiteren Schritt wurde der äußere Silikonschlauch unter Zuhilfenahme von zwei Pinzetten von der verfestigten Matrix (EHT) gelöst, sodass eine tubuläre Form in horizontaler Ausrichtung um den Perfusionsschlauch zurückblieb (**Abb. 10 B iv**). Um den Perfusionsschlauch luftdicht um die Flussadapter zu fixieren, wurden dieser vor der Kultivierung erneut mit Kabelbindern um die Edelstahladapter befestigt. Nach dem Guss wurden 25 ml EHT Kultivierungsmedium (**Tbl.1**) zur Ernährung des EHTs in die Kulturkammer gefüllt. Zur weiteren Stabilisierung der EHT-Matrix erfolgte für die nächsten 24 h zunächst eine Kultivierung unter statischen Bedingungen. Nach 24 Stunden (an Tag 1) wurde das pulsatile Perfusionssystem angeschlossen (siehe Kapitel 4.4.5). Eine Kultivierung unter pulsatiler Perfusion erfolgte bis Tag 23. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Während der Medienwechsel erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Morphologie und Funktionalität. Alle für den Guss benötigten Materialien (Kulturkammer, Pinzetten, Schläuche) wurden zuvor autoklaviert. Der Guss fand unter sterilen Bedingungen unter der Zellkulturbank statt.

4.4.5 Aufbau und Funktion des pulsatilen Perfusionssystem

Für das pulsatile Perfusionssystem wurden tubuläre EHTs innerhalb der Kultivierungskammer mithilfe eines selbst entwickelten Gussformats generiert. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, wurden die Konstrukte hierfür um einen selbstangefertigten, dünnwandigen Perfusionsschlauch (ID: < 250 μm) aus Silikon gegossen, der horizontal in einer eigens angefertigten Kultivierungskammer aus Teflon befestigt war. Die Kultivierungskammer war über zwei Flussadapter aus Edelstahl über ein zirkuläres Silikonschlauchsystem mit einer kleinen peristaltischen Pumpe (Flussraten 0 - 150 ml/min) und einem Medium-Reservoir (Becherglas, 50 ml) verbunden. Die kastenförmige Kultivierungskammer hatte ein zylinderförmiges Füllvolumen von zirka 25 ml und beinhaltete einen integrierten Glasboden (Petrischale, 40 x 12 mm), um die EHTs regelmäßig mikroskopisch auf eine beginnende Kontraktion untersuchen zu können. Das Medium wurde während der Kultivierung jeden zweiten Tag über einen ablösbaren Glasdeckel (Petrischale, 60 x 15 mm) gewechselt. Die Kultivierungskammer konnte über zwei Dreivegehähne von dem Pumpsystem getrennt werden, um Medienwechsel und morphologische Kontrollen durchführen zu können. Eine Medium-Perfusion (EHT Kultivierungsmedium) durch den Perfusionsschlauch erfolgte 24 h nach dem Guss des EHTs über peristaltische Pumpen durch eine selbst gebaute Steuereinheit. Das Medium im Pumpsystem wurde zweimal wöchentlich gewechselt (50 ml). Über die Steuereinheit konnten mehrere peristaltische Pumpen (bis zu 4 Stück) gleichzeitig angesteuert werden. Zudem konnte ein pulsatile Fluss durch einen integrierten automatischen Schalter mit unterschiedlichen Impulsfrequenzen (max. 100 Impulsen/min) und Impulsamplituden generiert werden. Für den pulsatile Fluss während der Kultivierung wurde eine

Flussrate von 10 ml/min und eine Pulsfrequenz von 83 Impulsen / min festgelegt. Alle Elemente des Pumpsystems, bis auf die Dreiwegehähne, konnten vor der Verwendung autoklaviert werden. Für jedes Experiment wurden neue Dreiwegehähne benutzt. Um zu untersuchen, ob das EHT während der Kultivierung mit Sauerstoff versorgt wird, wurden Blutgasanalysen (Radiometer) von Medienproben, sowohl aus dem Inneren des Perfusionsschlauchsystems als auch aus der Kultivierungskammer durchgeführt. Da bei der Entnahme des Mediums Sauerstoff aus dem Inkubator entweicht, wurde zudem eine positive und negative Kontrolle ausgeführt. Hierfür wurden zusätzlich Proben aus Kulturmedium genommen, dass auf 6-Wellplatten unter **i.** Normoxie (Negativkontrolle, niedrigere Sauerstoffsättigung) und **ii.** Hyperoxie (Positivkontrolle, Sauerstoffsättigung wie im pulsatilem Perfusionssystem) im Inkubator gelagert wurde. Weiterhin wurden vor jedem Mediumwechsel die Glucosekonzentration im verbrauchten Medium gemessen. Für die Photo- und Videodokumentation während der Kultivierung wurde eine eigenangefertigte Vorrichtung aus Edelstahl für das iPhone 8 konstruiert.

4.4.6 Perfusionsschlauch aus Silikon

Das Standardformat des in dieser Arbeit verwendeten Perfusionsschlauches bestand aus den folgenden zwei Elementen: **i.** Einem Grundelement, welches aus Silikon selbst hergestellt wurde und **ii.** zwei Silikonadaptern, die beidseitig an dem Grundelement befestigt waren (**Abb. 11 A**).

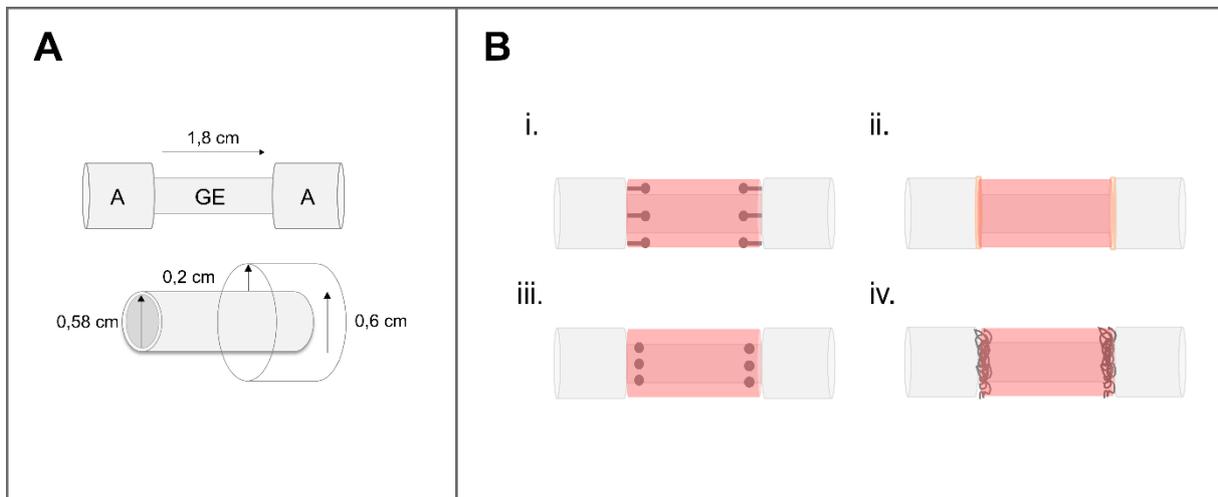


Abbildung 11: Perfusionsschlauch aus Silikon. A: Silikonadapter, GE: Grundelement. B: Vier verschiedene Modifikationen des Grundmodells, i) Silikonstifte, ii) Fibrinogen-Gemisch, iii) Noppenfortsätze, iv) Klettverschluss, *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Das EHT wurde für die Kultivierung in den Raum zwischen den beiden Silikonadaptern um das Grundelement gegossen. Über die zwei Silikonadapter (ID: 0,6 cm, WS: 1 mm, L: 1,2 cm) konnte der Perfusionsschlauch um die Edelstahlflussadapter in der Kultivierungskammer

befestigt werden. Das Grundelement wurde folgendermaßen hergestellt: Zunächst wurde eine dünne Schicht frisch angemischtes, flüssiges Silikon auf einer Petrischale durch leichte Kippbewegungen verteilt. Die Herstellung von Silikon erfolgte, wie bereits in Kapitel 4.4.1 beschrieben. Nach der Aushärtung des Silikons bei 40°C im Wärmeofen wurde mit einem Skalpell ein rechteckiges Stück (zirka B: 0,8 cm, L: 2,2 cm) von dem Silikonbodenbelag auf der Petrischale ausgeschnitten. Anschließend wurde das Silikonstück um einen dünnen, selbstangefertigten Stab aus Teflon (D: 5 mm, L: 4 cm) gewickelt, der als Matrize für eine tubuläre Form diente. Die überlappenden Ränder wurden mit Silikonkleber fixiert und die Silikonüberstände wurden mit einem Skalpell entfernt. So entstand ein dünnwandiger Schlauch (ID: 6 mm, WS: zirka 200 µm), der auf eine Länge von zirka 2 cm angepasst wurde. Dieses Elementarstück wurde anschließend beidseitig *intraluminal* mit den Silikonadaptern verklebt, sodass eine zirka 1,8 cm lange Aussparung zwischen den Adaptern entstand. Dieses Grundmodell wurde für weitere Versuche modifiziert, um die optimale Matrix für die Kultivierung von tubulären EHTs zu schaffen. Hierfür wurden vier Modelle getestet: **i.** Die Silikonadapter wurden zur EHT zeigenden Seite um stiftförmige Silikonfortsätze ergänzt. **ii.** Die Silikonadapter wurden zur EHT zeigenden Seite mit einer dünnen Schicht eines Thrombin-Fibrinogen Gemisches beschichtet. **iii.** Das Grundelement wurde an den Rändern um kleine Noppenfortsätze aus Silikon ergänzt. **iv.** Silikonadapter wurden zur EHT zeigenden Seite ringförmig mit Klettverschluss beklebt (**Abb. 11 B**). Die Silikonfortsätze- und Noppen wurden von Gussformen für alte Streifen-EHTs verwendet, die im UKE Hamburg hergestellt wurden. Klettverschluss wurde in einer Kreisform verwendet (D: 8 mm) und mit einer Lochstanze in dem benötigten Diameter (ID: 6 mm) ausgestanzt. Das Thrombin-Fibrinogen-Gemisch (**Tbl. 8**) wurde kurz vor dem Guss des EHTs auf die Innenränder der Silikonadapter pipettiert.

Tabelle 8: Mastermix-Komponenten für das Thrombin-Fibrinogen Gemisch

<i>Mastermix-Komponente</i>	<i>Konzentration</i>
Mastermix Medium	Füllvolumen, um auf ein Endvolumen von 230 µl zu kommen
Fibrinogen	25 mg/ml
Thrombin	3 U/ml

4.5 Histologie

Nach der Kultivierung wurden die EHTs histologisch aufgearbeitet, um morphologisch analysiert werden zu können.

4.5.1 Präparation der Gewebeschnitte

Zunächst wurden die EHTs in größere Ringe (Länge: zirka 0,5 mm) zerschnitten und in Roti®-Histofix für 24 h bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie in PBS bis zur Aufbereitung gelagert. Für die Herstellung von Paraffinschnitten erfolgte eine weitere Bearbeitung durch Kristin Hartmann, Maus Pathologie, UKE. Kurz zusammengefasst wurden die Gewebeproben hierbei dehydriert und in Paraffinblöcke eingebettet. Daraus wurden Paraffinschnitte angefertigt. (Dicke: 4 µm). Diese wurden auf Glasobjektträgern platziert und anschließend gefärbt. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe rehydriert (**Tbl. 9**).

Tabelle 9: Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

<i>Chemikalie</i>	<i>Zeit</i>
Xylene	2x 5 min
Ethanol 99%	2x 2 min
Ethanol 96%	Mehrfach kurz
Ethanol 70%	1x 1 min
PBS	1x 5 min

Dies erfolgte durch eine schrittweise Inkubation in verschiedenen Lösungsmitteln, gefolgt von einem Waschschrift in PBS (**Tbl.8**). Anschließend erfolgte die Vorbereitung auf eine Behandlung mit Antikörpern, mit dem Versuch, chemische Modifikationen durch die vorherige Fixierung des Gewebes zu reduzieren und das Gewebe für Antikörper zugänglich zu machen (*engl. antigen-retrieval*). Hierfür wurden die Schnitte für 15 min bei 37°C in Tris-HCl (pH 7,6, 10 mM) mit Proteinase K inkubiert oder es erfolgte eine hitzeinduzierte Behandlung mit Natriumcitrat-Puffer. Dafür wurden die Schnitte für 20 min in Natriumcitrat (pH 6,0, 10 mM) gekocht und darauffolgend in einer 0.1 % Triton X-100 in PBS Lösung inkubiert. Dann wurden die Schnitte in einer Blocking-Lösung (**Tbl. 1**) für 30 min inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Anschließend wurden drei Waschschriffe mit PBS durchgeführt. Hierauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Konzentration 1:100) in IF-Puffer + DAPI (1:1000). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte mit Mowiol (Fluoromount G) eingedeckelt und über Nacht bei RT getrocknet. Eine Liste mit den in dieser Arbeit verwendet Antikörpern und den jeweiligen Verdünnungen ist im Anhang aufgelistet. Primäre Antikörper wurden entweder mit dem *Multimer-Technology*-basierten UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana® BenchMark® XT; Roche) oder mit einem Fluorochrom-markierten sekundären Antikörper visualisiert.

4.5.1.1 Vibratomschnitte

Dickere Gewebeschnitte (zirka 100 µm) wurden generiert, indem die Gewebestücke nach der Kultivierung in 4 % Agarose eingebettet und mit einem Vibratom geschnitten wurden. Als Vorbereitung für die Färbungen wurden die Schnitte zunächst in 1% BSA + 0,3% Triton X-100 in PBS für zirka 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper in IF-Puffer bei 4°C über Nacht. Die Schnitte wurden danach dreimal in PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper + DAPI (1:1000) bei RT für 90 min inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrte mit PBS, bevor die Schnitte auf einem Glasobjektträger mit Mowiol eingedeckelt und anschließend, wie zuvor beschrieben, getrocknet wurden.

4.5.2 Visualisierung der Färbungen

Dystrophin-gefärbte Schnitte wurden mit einem NanoZoomer (Hamamatsu) eingescannt und durch die Verwendung der NPD Software (NPD view 2.6.13) visualisiert. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Axioskop 2 (Zeiss) generiert. Konfokale Bilder wurden durch die Verwendung des LSM 800 Mikroskops (Zeiss) erzeugt. Um eine Übersichtsaufnahme zu erlangen, wurde in dem Programm die entsprechende Region zuvor anhand von Fixpunkten definiert. Anschließend wurden mithilfe des Programms Einzelbilder (im Mosaikverfahren) aus der zuvor definierten Region aufgenommen und zu einem Gesamtbild kombiniert. Um ein 3D-Bild zu generieren, wurden Übersichtsaufnahmen aus mehreren Ebenen (Z-Achse) kombiniert. Hierfür wurde die gewünschte Tiefe (µm) und die Anzahl der zu scannenden Ebenen zuvor definiert.

4.5.3 Sarkomerlängenmessung

Die Sarkomerlängenbestimmung erfolgte aus immunhistologischen Bildern nach der Anfärbung von Alpha-Aktinin. Die Bilder wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen. Es wurden jeweils drei Bilder von drei verschiedenen tubulären EHTs ausgewertet. Zur Längenskalkulation der einzelnen Sarkomere wurde das Open-Source Programm Image J verwendet. In jedem Bild wurde die Distanz von 30 Sarkomeren zueinander gemessen.

4.6 Funktionelle Analyse von tubulären EHTs

Für die Analyse der Funktion von tubulären EHTs wurden in dieser Arbeit neue Methoden etabliert. Dafür wurden bestehende Methoden zur funktionellen Analyse von Herzgewebe adaptiert. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. Torsten Christ und Anna Steenpass durchgeführt.

4.6.1 Kontraktionsanalyse im Organbad

Nach Ende der Kultivierungszeit wurden tubuläre EHTs für isometrische Kraftmessungen in einem gas- und temperaturregulierten (95% O₂, 5% CO₂, 37°C) Organbad in 50 ml Tyrodelösung aufgehängt. Die EHTs wurden horizontal zwischen zwei Drähten befestigt (**Abb. 12**).

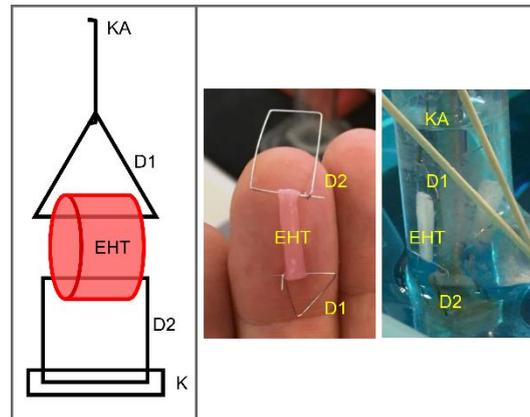


Abbildung 12: Tubuläres EHT im Organbad. Von links nach rechts: Schematische Darstellung der Aufhängung des tubulären EHTs. Tubuläres EHT zwischen Drähten. Aufhängung im Organbad. KA: Kraftaufnehmer, D1: Draht 1, EHT: *Engineered Heart Tissue*, D2: Draht 2, K: Klemme.

Die Drähte waren zuvor für die Messung von *A. mammaria* Präparaten von Dr. Simon Pecha aus der Herzchirurgie des UKE, basierend auf einer Publikation von Mulvany und Halpern von 1977, hergestellt worden (Mulvany and Halpern 1977). Der untere Draht wurde in einer Dehnungsklemme zwischen zwei Platinelektroden fixiert, der obere Draht wurde an einem Kraftaufnehmer befestigt. Wenn die EHTs während der Messung keine Spontankontraktion aufzeigten, wurden sie durch Platinelektroden mit 90 mA elektrisch stimuliert. Die Kontraktionskraft (mN) wurde während der Messung mit der Chart™5 Pro Software über die Zeit dargestellt. Initial wurden die EHTs einmalig gedehnt, bis ein maximaler Kraftwert generiert und abgeleitet werden konnte. Darauf folgend wurden die EHTs ausgehend von diesem Wert bis zur halbmaximalen Kraft vorgedehnt, um eine Ruhespannung zu simulieren. Anschließend wurde Isoprenalin in steigender Konzentration von 0.1 nM - 100 µM hinzugegeben. Eine Auswertung und Aufarbeitung der Messungen als Konzentrations-Wirkungskurve erfolgte mit der Chart™5 Pro Software und GraphPad Prism 9 Software.

4.6.2 Video-optische Kontraktionsmessung von tubulären EHTs

Zur Darstellung und Untersuchung der Kontraktionskinetik von tubulären EHTs wurde ein video-optisches Messsystem verwendet, welches im UKE Hamburg für die funktionelle Auswertung von kleinen Streifen-EHTs im 24-Wellformat entwickelt wurde und mittlerweile gut etabliert ist (Hansen et al. 2010; Mannhardt et al. 2016). Dieses System wurde für die

Verwendung von tubulären EHTs adaptiert. Hierfür wurden tubuläre EHTs, nach dem Ende der Kultivierungszeit, von dem Perfusionsschlauch gelöst. Die beiden Silikonadapter wurden zuvor mit einer Schere abgeschnitten, sodass die EHTs manuell von dem Perfusionsschlauch abgelöst werden konnten. Vor der Messung wurden die tubulären EHTs in 25 mM HEPES-gepufferten Kultivierungsmedium auf einer 6-Wellplatte für mindestens zwei Stunden unter hyperoxischen Bedingungen (40 % O₂, 7 % CO₂, 98 % RH) inkubiert. Für die Analyse wurden tubuläre EHTs auf einer modifizierten 6-Wellplatte freischwimmend in Kultivierungsmedium platziert. Die 6-Wellplatte wurde in einer gas- und temperaturkontrollierten Kammer (37°C, 5 % CO₂) fixiert. Anschließend wurden die spontanen Wandbewegungen des EHTs mit einer motorisierten Kamera registriert und mithilfe einer Figurerkennungssoftware (*Consulting Team Machine Vision*; CTMV, Pforzheim) erfasst. Als Orientierung dienten zwei Messpunkte, die zuvor manuell definiert wurden. Die EHTs wurden entweder in Längsausrichtung oder von oben im Querschnitt aufgenommen. Eine Querschnittsaufnahme wurde ermöglicht, indem die EHTs mit dem Lumen vertikal über einem kleinen Stab aus Teflon (L: 10 mm, D: 3 mm) positioniert wurden. Dieser wurde zuvor mit Silikonkleber zentral auf der 6-Wellplatte befestigt. Kontraktionsfrequenzen wurden als Piktogramm von dem automatischen Erkennungsalgorithmus erstellt. In diesem System konnte nur eine relative Kraftentwicklung gemessen werden, da keine definierten Referenzwerte zur Verfügung standen. Eine elektrische Stimulation der tubulären EHTs erfolgte mit leichten Abänderungen nach dem bereits publizierten Modell für Streifen-EHTs (Hirt et al. 2014a). Hierfür wurden auf ein 6-Wellformat angepasste Karbonelektroden für tubuläre EHTs hergestellt. Die EHTs wurden mit 6 V bei einer Impulsdauer von 4 ms stimuliert. Die von der Software erfassten Kontraktionsausschläge wurden anhand folgender Parameter analysiert: Frequenz (Ausschläge/min) und Kontraktions- und Relaxationszeit (RT).

4.6.3 Druckmessungen von tubulären EHTs

Die Druckmessungen von tubulären EHTs erfolgten auf Basis eines von Tim Stüdemann, UKE, etablierten Systems zur hydrostatischen Druckmessung. Die Drücke wurden mit einem Druckaufnehmer aufgenommen, der mit einem Brückenverstärker verbunden war. Das Signal wurde über das Datenerfassungssystem Powerlab8 digital verarbeitet und mit der Chart™5 Pro Software aufgezeichnet und analysiert. Der Druckaufnehmer wurde vor den Messungen mithilfe des Programms durch eine Zweipunktkalibrierung gegen eine 2 m Wassersäule geeicht. Vor jeder Messung wurde ein Nullabgleich durchgeführt, indem der Druckabnehmer mit dem Atmosphärendruck abgeglichen wurde. Für die Aufnahme der Drucksignalkurve wurde in der Chart™5 Pro Software ein Tiefpassfilter angewandt, der tiefe Frequenzen passieren lässt und hohe Störfrequenzen blockiert. Die Grenzfrequenz wurde für diese

Messungen bei 5 Hz gesetzt. Für die Druckmessung wurde der Pumpfluss abgeschaltet und die Kultivierungskammern nach Ende der Kultivierungszeit von dem pulsatilem Perfusionssystem gelöst. Die EHTs befanden sich während der Messungen weiterhin um den Perfusionsschlauch innerhalb der Kammer und waren mit Kulturmedium versorgt. Der Druckabnehmer wurde einseitig über die Dreiwegehähne angeschlossen, nachdem der Perfusionsschlauch mit Flüssigkeit (steriles H₂O) befüllt, entlüftet und beidseitig verschlossen wurde. Druck wurde innerhalb des Perfusionsschlauchs gemessen. Die analysierten Daten wurden anschließend in GraphPad Prism 9 aufgearbeitet. Mit dieser Methode konnte nicht bestimmt werden, ob Druck während der Messung durch das Material des Perfusionsschlauchs abgefangen wurde. Um die *Compliance* des Perfusionsschlauchs während der Messung näherungsweise ermitteln zu können, wurde ein eigenangefertigtes System entwickelt (**Abb. 13**).

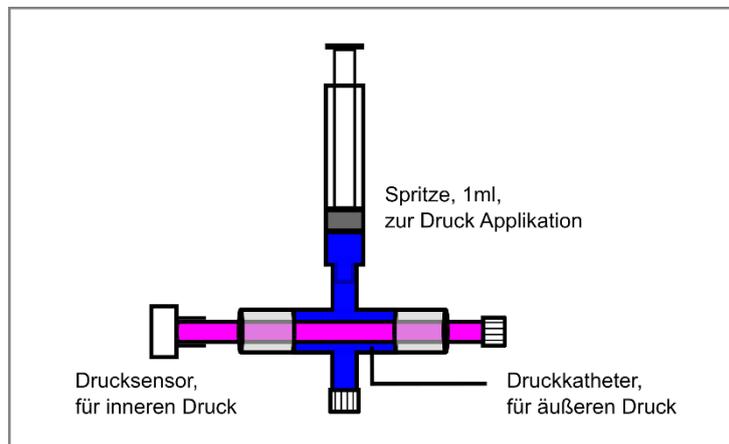


Abbildung 13: Aufbau des Systems zur Testung der *Compliance* des Perfusionsschlauchs. Äußerer Druck wurde über Volumenänderungen durch eine 1 ml Spritze appliziert, die mit einer flüssigkeitsgefüllten Kammer (blau) in Verbindung stand. Äußerer Druck wurde durch einen Katheter gemessen. Innerer Druck wurde in dem mit Flüssigkeit gefüllten Silikonrohr (pink) mit einem Druckabnehmer gemessen. *Adaptiert von Köhne et al. 2022.* In diesem System wurde aktiv ein niedriger Druck (< 2 mmHg) von außen auf den Perfusionsschlauch ausgeübt, mit der Absicht, das EHT zu simulieren. Dieser Druck wurde über minimale Volumenänderungen durch eine 1 ml Spritze appliziert, die zuvor an das äußere System angeschlossen wurde (siehe Ergebnisse, Kapitel 5.2.5). Der dadurch über die Membran des Perfusionsschlauchs nach innen übergeleitete Druck wurde mit einem Druckabnehmer, wie bereits zuvor beschrieben, aufgenommen. Der von außen generierte Druck wurde zeitgleich über einen Druckkatheter gemessen, der zuvor über die Seldinger-Technik eingebracht wurde (Seldinger 1953). Das äußere System wurde konstruiert, indem ein Silikonrohr mit einem größeren Innendurchmesser (8 mm) um den Perfusionsschlauch mit Silikonkleber luftdicht fixiert wurde. Weiterhin wurden zwei Zugänge mit einem Luer-Lock System integriert, um Flüssigkeit applizieren und das System entlüften zu können.

4.6.4 Berstdruck Messung von tubulären EHTs

Um tubuläre EHTs von *luminaler* Seite einem Druck auszusetzen, wurde ein Ballonkatheter nach einem Modell für Langendorff-Experimente konstruiert (siehe Ergebnisse, Kapitel 5.2.5) (Sutherland et al. 2003). Kurz zusammengefasst wurde hierbei zunächst ein kreisförmiges Stück (Radius: 3 cm) aus Standard-Küchen-Frischhaltefolie ausgeschnitten und in einer speziellen Falttechnik um eine 2 mm Kanüle aus Edelstahl gewickelt, um eine Ballonform zu generieren. Die Kanüle wurde zuvor abgestumpft und angeraut, um den Ballon mit einem 6-0 Faden befestigen zu können. Zunächst wurde die Nadel mit einer 1 ml Spritze verbunden. Anschließend wurde die Spritze über einen Dreiwegehahn mit Flüssigkeit befüllt, entlüftet, und an einen Druckabnehmer, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, angeschlossen. Die Grenzfrequenz für den Tiefpassfilter wurde für dieses Experiment bei 50 Hz gesetzt. Für die Messung wurde der Katheter mit der Ballonseite zentral im Lumen des EHTs platziert. Dann wurde der Ballon schrittweise mit Wasser gefüllt. (30 μ l pro Schritt). Nach jedem Volumenschritt wurde der Druck im Ballon gemessen. Dieselbe Messung wurde erst ohne das EHT durchgeführt, um die *Compliance* des Ballons bestimmen zu können.

4.6.5 Messung des Drucks durch den Pumpfluss

Um den systolischen Druck messen zu können, der während der Kultivierung in einem pulsatilem Perfusionssystem auf tubuläre EHTs einwirkt, wurde das in Kapitel 4.6.3 beschriebene System zur Messung der *Compliance* des Perfusionsschlauchs adaptiert (**Abb. 14**).

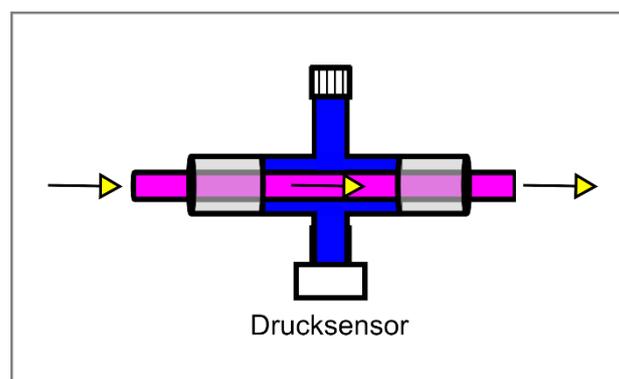


Abbildung 14: Aufbau des Systems zur Testung des Drucks, der durch den Pumpfluss von *luminal* auf das Gewebe wirkt. Der Druck, der durch den Pumpfluss (gelbe Pfeile) im Inneren des Perfusionsschlauchs (pink) entstand, wurde außerhalb der Perfusionsschlauchs (blau) mit einem Drucksensor gemessen.

Hierfür wurde kein Druck aktiv von außen aufgebaut. Der Perfusionsschlauch wurde an das pulsatile Perfusionssystem angeschlossen und der Pumpfluss angestellt. Dann wurde der Druck im äußeren Schlauch gemessen.

4.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde ein EHT jeweils als biologisches Replikat angesehen. Für jedes Experiment wurde die Nummer an Replikaten (EHTs) unter dem entsprechenden Kapitel oder in der entsprechenden Graphik benannt. Statistische Analysen und graphische Darstellungen wurden mit GraphPad Prism 9 erstellt. Die in den Versuchen erhobenen Daten wurden als Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (\pm) oder nur als Mittelwert dargestellt.

5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Der erste Teil beinhaltet die Kultivierung von tubulären EHTs in vertikaler Orientierung auf einer 6-Wellplatte. Der zweite Teil beschreibt tubuläre EHTs, die in horizontaler Ausrichtung in einem pulsatilem Perfusionssystem kultiviert wurden. Dieser Teil der Arbeit wurde in dem Journal *engl. European Journal of Cardiac-Thoracic Surgery* (EJCTS) publiziert (Köhne et al. 2022).

5.1 Tubuläre EHTs im 6-Wellformat

Erste Versuche, um tubuläre EHTs herzustellen basierten darauf, EHTs in vertikaler Ausrichtung um dünne Silikonsäulen auf einer 6-Wellplatte zu kultivieren. In diesem Aufbau wurde der Einfluss folgender Parameter untersucht: **i)** Wandstärke. Ziel hierbei war es, verschiedene Wandstärken zu testen. **ii)** Dynamische Kulturbedingungen. Hierbei wurde untersucht, ob sich dynamische Kulturbedingungen positiv auf die Zellausrichtung auswirken. Hierfür wurden tubuläre EHTs unter kontinuierlichen Kippbewegungen auf einem Schüttler kultiviert.

5.1.1 Morphologische und funktionelle Evaluation

Tubuläre EHTs konnten mit einem neu entwickelten Gussformat (siehe Methoden, Kapitel 4.4.1) auf einer 6-Wellplatte mit zwei verschiedenen Wandstärken hergestellt werden ($n = 4$). Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Silikonschlauch-Diametern konnten EHTs mit einer dickeren Wand und einem kleineren Innendurchmesser (0,6 cm) und EHTs mit einer dünneren Wand und einem größeren Innendurchmesser (0,8 cm) hergestellt werden. Nach der Polymerisation des Mastermix um die Silikonsäulen zeigte sich in beiden Fällen eine tubuläre Form in vertikaler Ausrichtung (**Abb.15**).

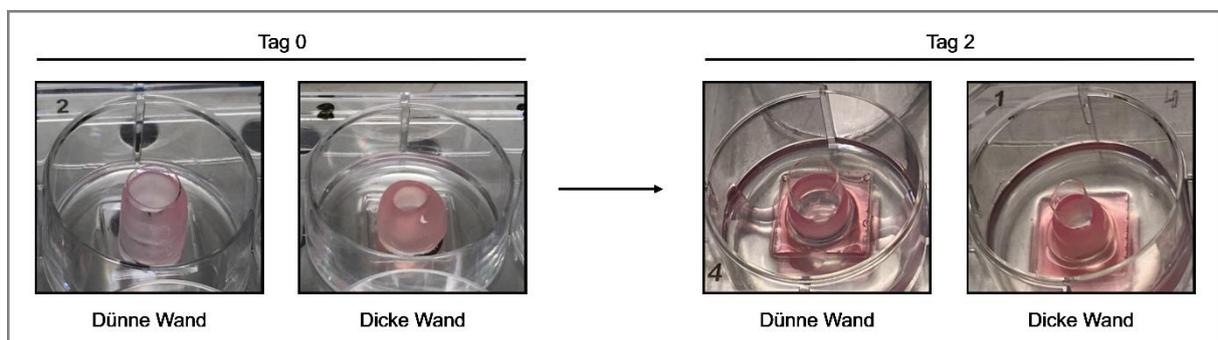


Abbildung 15: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs in einem 6-Wellformat. Links: Darstellung von EHTs mit zwei verschiedenen Wandstärken (dünne und dicke Wand) kurz nach dem Guss, Tag 0. Rechts: Darstellung der EHTs an Tag 2 der Kultivierung.

Beide EHT-Formate waren in der Länge geschrumpft und zeigten vermehrt eine Ringform auf, die bis zum Ende der Kultivierungszeit erhalten blieb. Zwischen dem sechsten und achten Kultivierungstag konnten erste mikroskopische Kontraktionen beobachtet werden, die vor allem zirkulär um den Silikonschlauch erfolgten (die Silikonmembran wurde hierbei nicht bewegt). Makroskopische Kontraktionen konnten in diesem Aufbau zu keinem Zeitpunkt erfasst werden. Nach 21 Tagen in Kultur zeigten sich im Wandquerschnitt für beide Formate histologisch zellreiche Präparate (**Abb.16**).

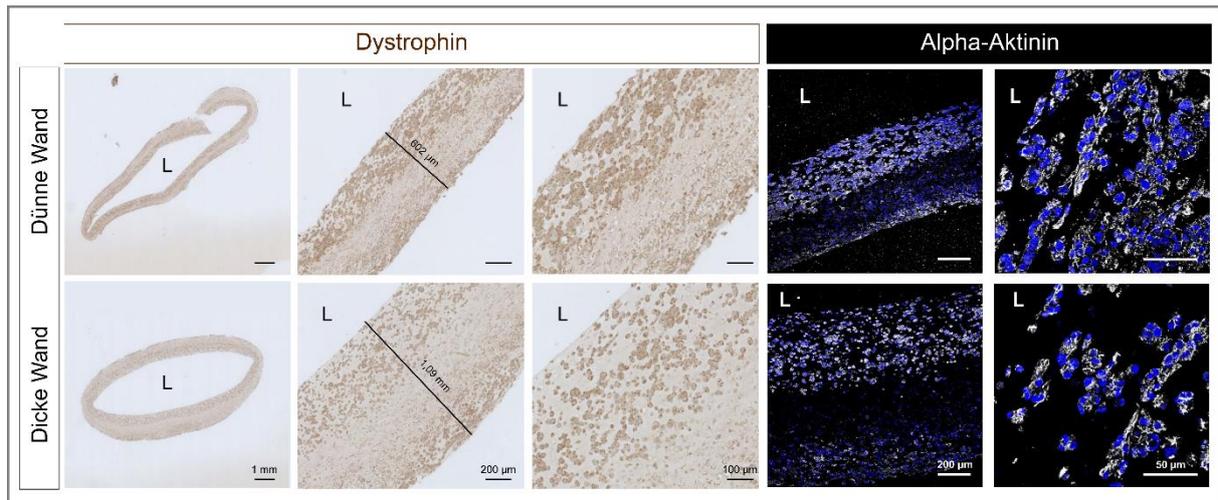


Abbildung 16: Histologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat kultiviert wurden; verschiedene Wandstärken. Die tubuläre Wand ist im Querschnitt abgebildet. Obere Bilderserie: Dünne Wand, untere Bilderserie: Dicke Wand. Links: KMs (braun) wurden mit einer Dystrophin-Färbung markiert. Rechts: KMs (weiß) wurden mit einer Alpha-Aktinin-Färbung dargestellt, Nuclei (blau) mit DAPI. Von links nach rechts: Jeweils zunehmende Vergrößerung ausgehend von einer Übersicht. L: Lumen des EHTs.

KMs waren vor allem entlang des äußeren und inneren Wandabschnitts in hoher Anzahl vertreten. Zentral ließen sich dahingegen nur wenige einzelne Zellen visualisieren. Die zwei unterschiedlichen Wandstärken waren auch nach Ende der Kultivierung weiterhin zu unterscheiden (dünne WS: zirka 600 µm vs. dicke WS: zirka 1000 µm). KMs waren im Querschnitt der Wand vor allem als runde schmale Zellen dargestellt. In den Konstrukten mit einer größeren Wandstärke war die zellreiche Zone mit KMs größer als in EHTs mit einer geringeren Wandstärke. Die Dichte an KMs in diesem Bereich war jedoch geringer als in EHTs mit einer dünneren Wand (**Abb.16**). Funktionell konnten absolute Kraftwerte der EHTs im Organbad bestimmt werden. Die Basalkraft der EHTs mit einer dünneren Wand (\emptyset Ausgangskraft *engl.* *Baseline* (BL): $0,22 \pm 0,04$ mN) lag in einem ähnlichen Bereich wie die von EHTs mit einer dickeren Wand (\emptyset BL: $0,65 \pm 0,27$ mN). Beide EHT-Formate zeigten eine positiv inotrope Reaktion auf die Gabe von Isoprenalin (**Abb.17**). Die mittlere effektive Konzentration (EC50) für Isoprenalin war für beide EHT-Formate (dünnwandige EHTs: \emptyset EC50 = 2,24 nmol/L; dickwandige EHTs: \emptyset EC50 = 2,38 nmol/L; n = 2) gleich.

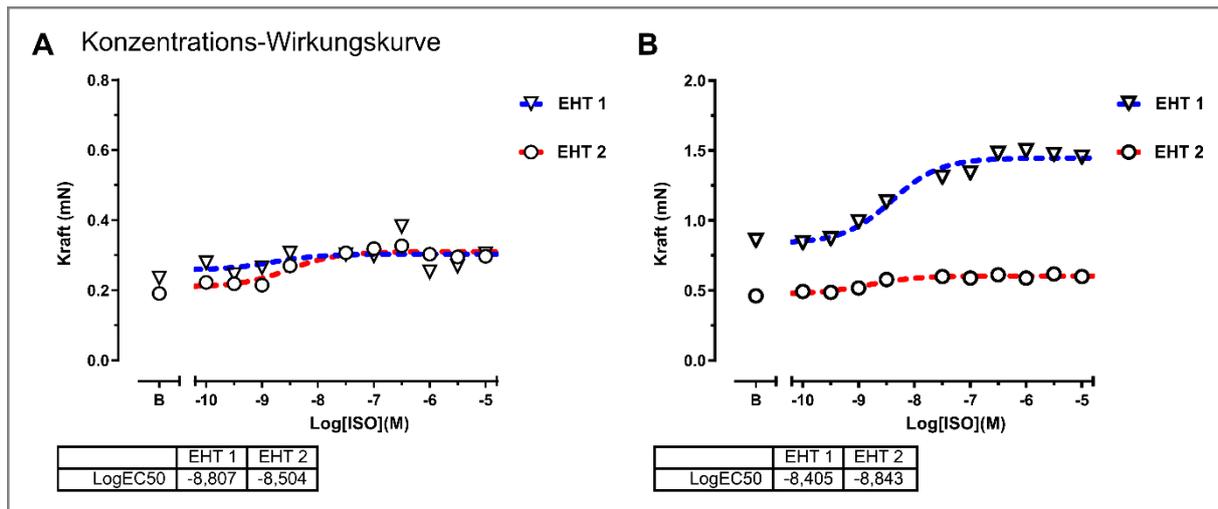


Abbildung 17: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat kultiviert wurden. A: Kraftmessung von EHTs mit einer dünneren Wand. B: Kraftmessung von EHTs mit einer dickeren Wand. Isoprenalin wurde während der Kraftmessung in steigender Konzentration appliziert, logarithmische Skala; EC50: mittlere effektive Konzentration von Isoprenalin; M = mol/L.

Da tubuläre EHTs, die unter dynamischen Bedingungen kultiviert wurden, nicht formstabil blieben, wurde in einem weiteren Ansatz versucht, die EHTs unter statischen Bedingungen zu kultivieren. Grundlegend war die Hypothese, dass die EHT-Matrix unter statischen Bedingungen weniger von mechanischen Kräften beeinflusst wird und somit formstabil bleiben könnte. Für dieses Experiment wurden zunächst nur EHTs mit einer geringen Wandstärke für 21 Tage unter statischen Bedingungen kultiviert. Morphologisch und funktionell zeigten sich leichte Unterschiede im Vergleich zu EHTs, die unter dynamischen Bedingungen kultiviert wurden. Während der Kultivierung kam es ebenfalls zu einer Längenreduktion, die aber schwächer ausfiel als unter dynamischen Bedingungen. Die Form war aber weiterhin eine Ringform und keine tubuläre Form (**Abb.18**).

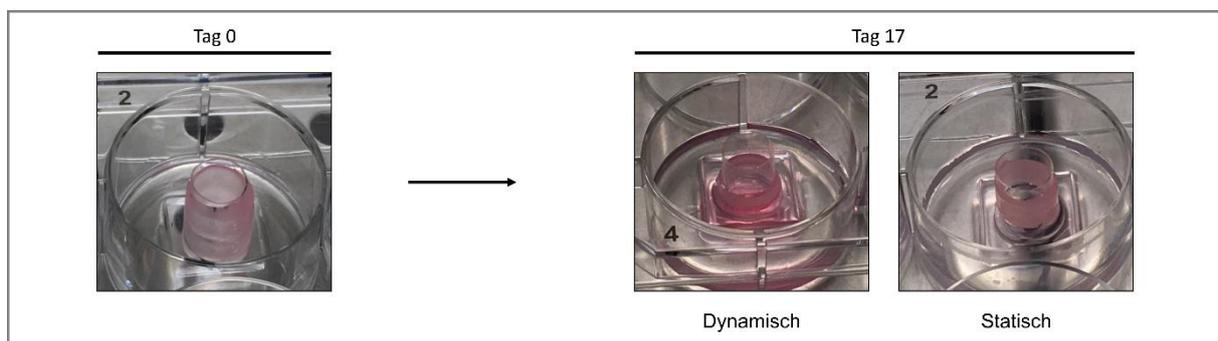


Abbildung 18: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat unter dynamischen und statischen Bedingungen kultiviert wurden. Links: EHT kurz nach dem Guss, Tag 0. Rechts: EHTs, die unter dynamischen und statischen Bedingungen kultiviert wurden, nach 17 Tagen in Kultur.

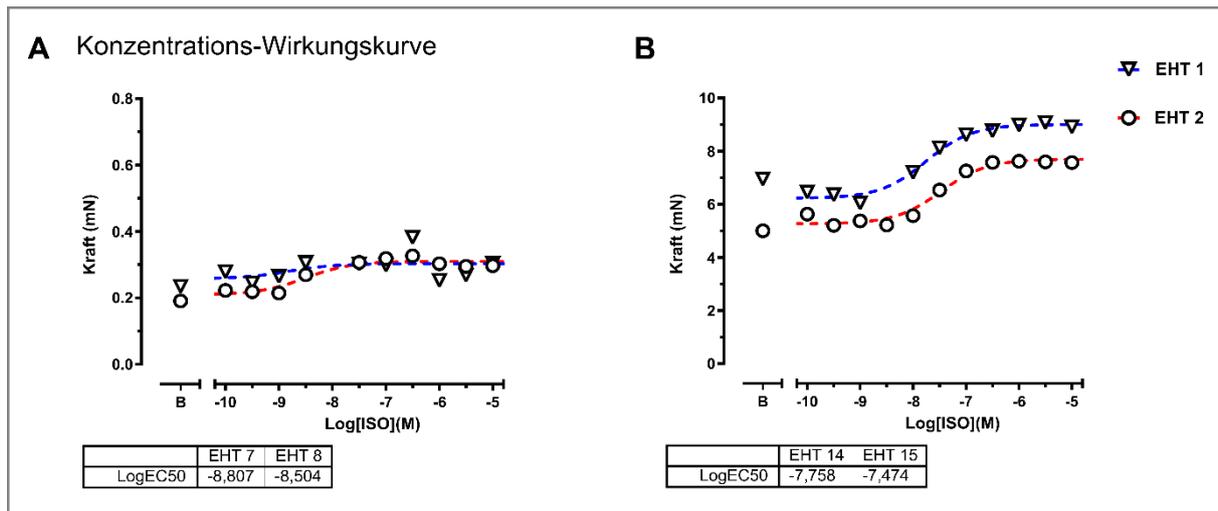


Abbildung 20: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat unter dynamischen und statischen Bedingungen kultiviert wurden. A: Kraftmessung von EHTs unter dynamischen Bedingungen. B: Kraftmessung von EHTs unter statischen Bedingungen. Isoprenalin (M) wurde während der Kraftmessung in steigender Konzentration appliziert, logarithmische Skala. EC50: mittlere effektive Konzentration von Isoprenalin.

Zusammenfassend zeigten sich funktionell und morphologisch ähnliche Ergebnisse für EHTs mit unterschiedlichen Wandstärken. Die KMs waren in beiden Formaten vor allem randständig in hoher Anzahl vorhanden. EHTs, die unter kontinuierlichen Kippbewegungen kultiviert wurden, zeigten weniger zirkulär ausgerichtete KMs entlang des Lumens und konnten weniger Kraft generieren als EHTs, die unter statischen Bedingungen kultiviert wurden. In allen Ansätzen schrumpften die EHTs nach 21 Tagen in Kultur von einer tubulären Struktur zu einem Ring-Format. Da das Ziel dieser Arbeit war, ein tubuläres Konstrukt herzustellen, wurden daher keine weiteren Auswertungen und Versuche in diesem Kulturformat durchgeführt.

5.1.2 Stapel-EHTs

In einer weiterführenden Versuchsreihe wurde untersucht, ob EHTs, die unter den zuvor genannten Bedingungen vorkultiviert wurden, miteinander fusionieren können. Ziel dieses Versuchsaufbaus war es, aus mehreren Ringen eine tubuläre Form herzustellen. Hierfür wurden die EHTs bis zum Beginn der mikroskopischen Kontraktion vorkultiviert (Kultivierungstag 6 - 8), anschließend einzeln abgelöst und übereinander auf eine längere Silikonsäule (L: 2 cm) übertragen. Für den Versuch wurden maximal 3 EHTs übereinandergestapelt kultiviert. EHTs (n = 6) konnten in einem 6-Wellformat bis zum Auftreten von mikroskopischen Kontraktionen vorkultiviert werden (siehe Methoden, Kapitel 4.4.1). Weiterhin konnten EHTs, wie zuvor beschrieben, übereinandergestapelt werden. Problematisch bei dem Stapelschritt war die uneinheitliche Überlappung der EHTs, die zuvor ungleichmäßig in der Höhe geschrumpft waren (**Abb. 21**).

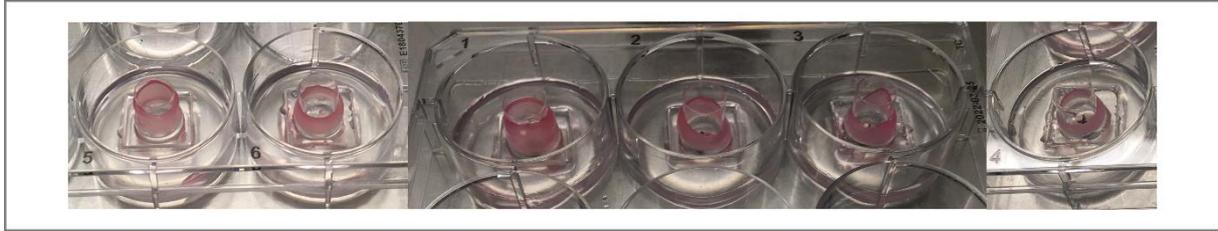


Abbildung 21: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat für das Stapeln von EHTs vorkultiviert wurden. Nach 10 Tagen in Kultur sind die EHTs in der Höhe uneinheitlich geschrumpft.

Morphologisch zeigte sich nach 21 Tagen in Kultur eine inhomogene Struktur der gestapelten EHTs ($n = 2$) (Abb. 22).

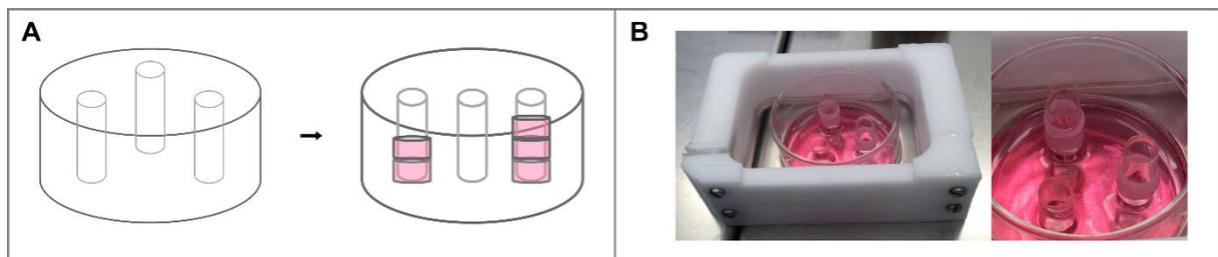


Abbildung 22: Stapelschritt von EHTs, die in einem 6-Wellformat kultiviert wurden. A: Schematische Darstellung des Stapelschritts. B: Morphologische Darstellung von gestapelten EHTs während der Kultivierung.

Einzelne Bereiche waren fusioniert, andere Bereiche waren an der Übergangszone getrennt. Die EHTs waren zudem erneut in der Höhe geschrumpft, sodass weiterhin eher ein Ringformat entstand. Funktionell zeigte sich nach dem Stapelschritt zunächst eine Stagnation der zuvor mikroskopisch registrierten Kontraktion. Nach zwei Tagen schlugen die gestapelten EHTs arrhythmisch und asynchron. Dieses Muster konnte bis zum Ende der Kultivierungszeit beobachtet werden. Da die Konstrukte weder einem tubulären Format ähnelten noch eine einheitliche Funktion zeigten, wurden keine weiteren Versuche und Funktionsanalysen in diesem Kulturformat durchgeführt.

5.2 Tubuläre EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem

Erste Versuche, tubuläre EHTs herzustellen, basierten auf der Kultivierung in einer vertikalen Ausrichtung um eine Silikonsäule. Da dieser Ansatz erfolglos blieb, wurde im zweiten Teil der Arbeit ein pulsatilem Perfusionssystem entwickelt, um tubuläre EHTs in einer horizontalen Ausrichtung kultivieren zu können. Grundlegend hierfür war die Erkenntnis, dass tubuläre EHTs in einem vertikal ausgerichteten Format während der Kultur in der Länge schrumpften. Zudem war eine weitere Idee, während der Kultur eine periodische Pulswelle auf das EHT einwirken zu lassen, um *in vivo* Bedingungen zu imitieren. Hierfür musste ein System entwickelt werden, welches periodisch Druck aufbauen kann, ohne dabei die Gewebektivität

und -integrität zu zerstören. Weiterhin musste das EHT während der Kultivierung mit Nährstoffen versorgt sein. Dafür wurde ein Perfusionssystem entwickelt, das aus folgenden Einheiten bestand: **i.** einer Kultivierungskammer, **ii.** einem verbindenden Silikonschlauchsystem, **iii.** einer steuerbaren peristaltischen Pumpeinheit, **iv.)** einem Medium-Reservoir (**Abb. 23**).

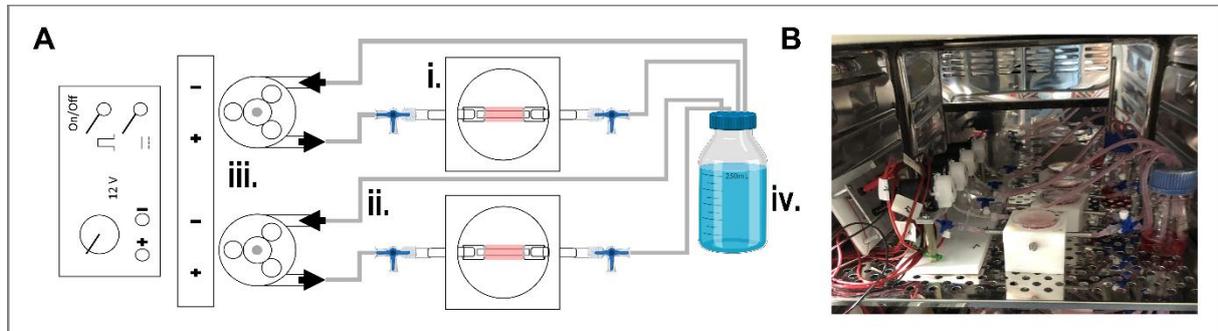


Abbildung 23: Pulsatiles Perfusionssystem. A: Schematische Darstellung des pulsatilem Perfusionssystems. B: Pulsatiles Pumpsystem im Inkubator. *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Für die Kultivierung wurde das EHT in horizontaler Position um einen dünnwandigen Schlauch aus Silikon (Perfusionsschlauch) in der Kultivierungskammer kultiviert (**Abb. 24 A**).

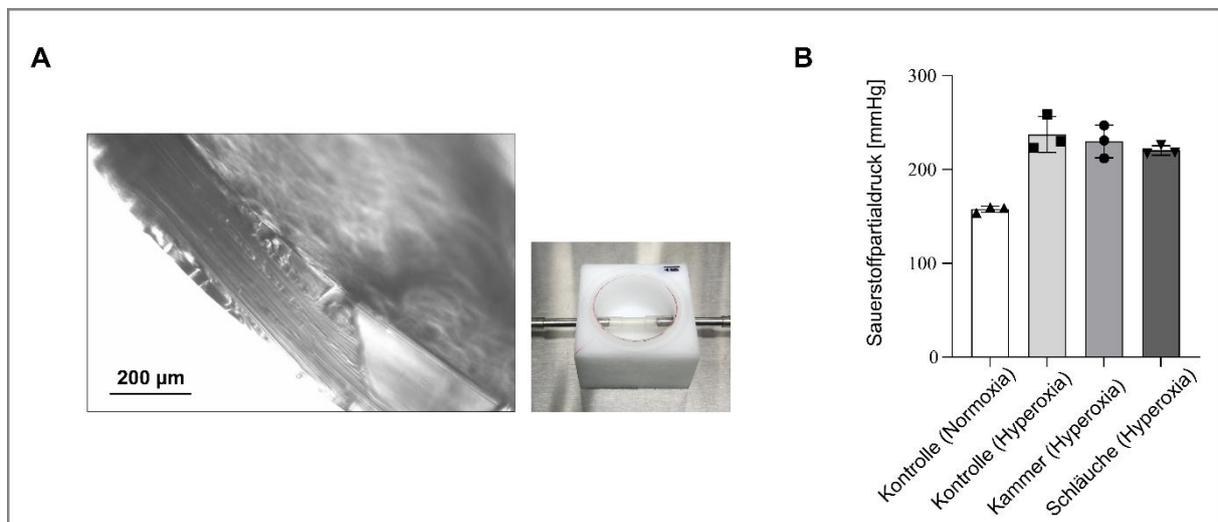


Abbildung 24: Perfusionssystem aus Silikon. A: Links: Mikroskopische Darstellung der Wand des dünnwandigen Perfusionsschlauchs. Rechts: Perfusionsschlauch befestigt in der Kultivierungskammer. B: Sauerstoffpartialdruckmessung aus verschiedenen Kompartimenten (Kammer, Schläuche) des Perfusionssystems, Kultivierung erfolgte unter Hyperoxia (40 % O₂) (n = 3). Als Kontrolle dienten Proben von Kulturmedium, die im 6-Well unter Normoxia (21 % O₂) und Hyperoxia kultiviert wurden. *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Kultivierungsmedium wurde durch die peristaltischen Pumpen aus dem Reservoir durch das Schlauchsystem in die Kultivierungskammer und zurück in das Reservoir gepumpt. Mit diesem System konnten unterschiedliche Flussraten (0 - 150 ml/min) und Impulsfrequenzen (10-100 Impulse/min) generiert werden. Für die Experimente dieser Arbeit wurde eine pulsatile

Flussrate von 10 ml/min mit einer Frequenz von 84 Impulsen/min festgelegt. Das EHT war während der Messung über den dünnwandigen (OD: 6 mm, WT: 200 μm) Perfusionsschlauch von dem Direktfluss abgeschirmt. Über die Silikonmembran des Silikon Schlauchs wurde während der Experimente unter den zuvor genannten Flussbedingungen ein periodisch wiederkehrender systolischer Druck von zirka 20 mmHg auf das EHT übergeleitet. Eine Versorgung mit Nährstoffen erfolgte über das Medium in der Kultivierungskammer. Zudem konnte anhand von Blutgasanalysen in allen Kompartimenten des Kultivierungssystems (Kammer, Schlauchsystem, Medium-Reservoir) ein ausreichender Sauerstoffpartialdruck ($p\text{O}_2$) gemessen werden (**Abb. 24 B**). Da die Verbindung des Perfusionsschlauchs mit den Pumpen und dem Medium Reservoir ein geschlossenes System war, weist dies auf eine Diffusion von Gasen über die Silikonmembran des Schlauchsystems hin. Sauerstoff konnte hauptsächlich über die Silikonmembran des verbindenden Schlauchsystems in das Medium gelangen.

5.2.1 Tubuläre EHTs aus gewickelten Patch-EHTs

Erste Versuche in einem pulsatilem Perfusionssystem beruhten darauf, Patch-EHTs an dem Perfusionsschlauch in der Kultivierungskammer zu befestigen und unter o.g. Bedingungen zu kultivieren. Grundlegend hierfür war die Hypothese, dass eine stabilere Struktur eine Formveränderung während der Kultur verhindern könnte. Hierfür wurden Patch-EHTs ($n = 3$), mit drei unterschiedlichen Dosen an KMs ($8.5 \times 10^6/\text{ml}$, $11.5 \times 10^6/\text{ml}$, $14.5 \times 10^6/\text{ml}$) und einer erhöhten Konzentration an Fibrinogen (10 mg/ml) bis zur makroskopisch sichtbaren Kontraktion auf 6-Wellplatten vorkultiviert (**Abb. 25 A**).

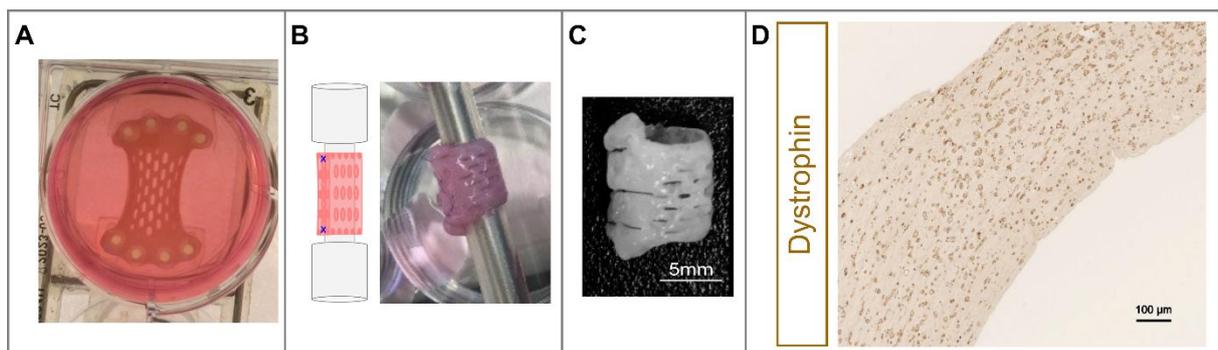


Abbildung 25: Herstellung von tubulären EHTs aus Patch-EHTs. A: Patch-EHT in Kultur am Tag der Verwendung für das pulsatile Perfusionssystem. B: Darstellung eines Patch-EHT, welches um den Perfusionsschlauch vernäht wurde. C: Patch-EHT nach Ablösung aus dem pulsatilem Perfusionssystem und Fixierung. D: Immunhistochemische Färbung für Dystrophin (KMs braun), Wandquerschnitt.

Anschließend wurden die EHTs um den Perfusionsschlauch vernäht und weiterführend in dem pulsatilem Perfusionssystem kultiviert. Bei allen drei EHT-Formaten konnten trotz der erhöhten Fibrinogen-Konzentration nach acht bis zehn Tagen makroskopische Kontraktionen

beobachtet werden. Von den drei EHTs zeigte sich bei dem EHT mit $14.5 \times 10^6/\text{ml}$, im Gegensatz zu den EHTs mit einer geringeren KM-Dichte, die deutlichste Kontraktion. Technisch gelang es, die EHTs um den Perfusionsschlauch zu wickeln und sie zu vernähen (**Abb. 25 B**). Morphologisch zeigte sich nach 21 Tagen in Kultur ein homogenes Bild. Die Form der Patch-EHTs war unverändert (**Abb. 25 C**). Die KMs waren innerhalb des Konstrukts gleichmäßig verteilt. Es konnten sowohl längs als auch quer ausgerichtete KMs in gleichen Anteilen registriert werden (**Abb. 25 D**). Nach dem Ablösen vom Perfusionsschlauch blieben die EHTs in einem stabilen tubulären Format. Funktionell konnten jedoch nach der Übertragung auf den Perfusionsschlauch zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung Kontraktionen beobachtet werden. Daher wurden keine weiteren Versuche oder Auswertungen in diesem Format durchgeführt.

5.2.2 Tubuläre EHTs im Gussformat

Für die Herstellung von tubulären EHTs im pulsatilem Perfusionssystem wurde ein auf dieses Format angepasstes Gussystem entwickelt (siehe Methoden, Kapitel 4.4.4). Hierfür wurden tubuläre EHTs in horizontaler Ausrichtung um den Perfusionsschlauch gegossen. Grundlegend hierfür war die Idee, dass ein Querformat, im Gegensatz zu einem Hochformat, während der Kultur weniger durch die Schwerkraft beeinflusst wird. Erste Versuche ($n = 3$) in diesem Modell zeigten wie in vorherigen Experimenten eine Längenreduktion des Gewebes mit einer Ablösung von den Rändern des Perfusionsschlauchs (**Abb. 26**).

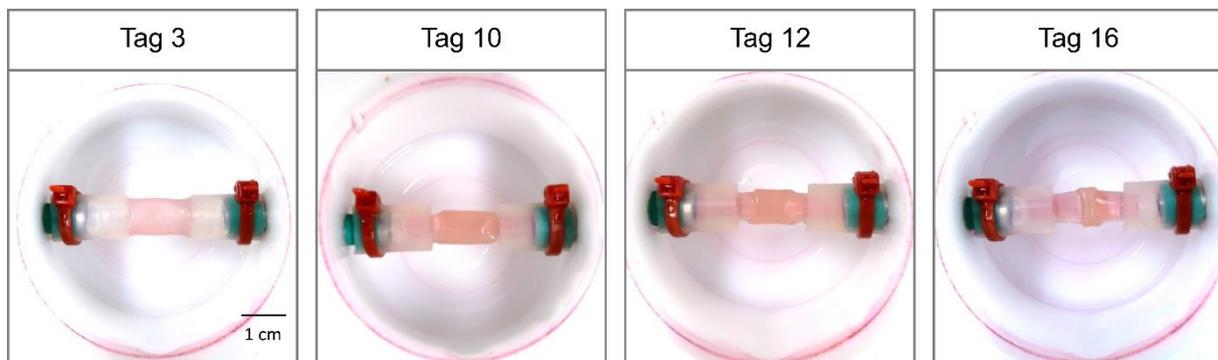


Abbildung 26: Morphologische Darstellung von ersten Versuchen mit tubulären EHTs im Gussformat. Nach 16 Tagen in Kultur hatte sich das EHT von den Rändern des Perfusionsschlauchs abgelöst und war zu einer Ringform geschrumpft.

Im Gegensatz zu vorherigen Versuchen zeigten die EHTs in diesem Format jedoch eine synchrone und rhythmische Kontraktion ab Tag 7 - 9, die ab Tag 8 - 10 auch makroskopisch sichtbar war. Diese blieb bis zum Ende der Kulturzeit erhalten. Im Folgenden wurden für den Perfusionsschlauch vier verschiedene Formate (siehe Methoden, Kapitel 4.4.6) getestet, um eine optimale Trägermembran für die EHTs zu finden. Diese sollte die EHTs an den Längsenden fixieren und ein Schrumpfen verhindern. Die unterschiedlichen Formate waren

i. randständige Silikonstifte, ii. eine Beschichtung mit einem Fibrinogen-Gemisch, iii. Noppenfortsätze und iv. eine Beschichtung mit Klettverschluss. Die Herstellung der verschiedenen Perfusionsschlauchformate konnte technisch umgesetzt werden (**Abb. 27**).

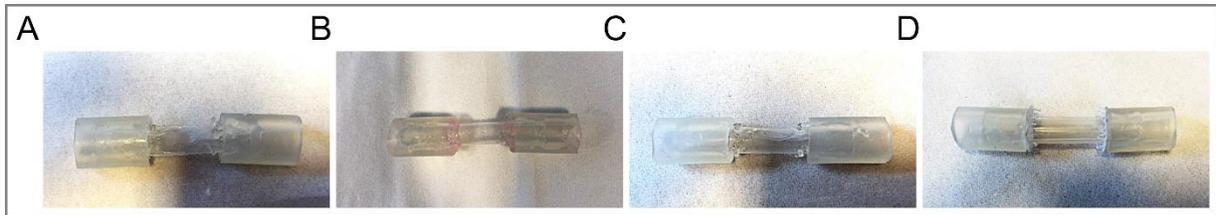


Abbildung 27: Darstellung von vier verschiedenen Silikon-schlauchmodellen. A: Silikonstifte, B: Fibrinogen, C: Silikonknoppen, D: Klettverschluss.

Zunächst wurden die Formate mit Silikonstiften und Fibrinogen getestet. EHTs, die um einen Perfusionsschlauch mit randständigen Silikonstiften gegossen wurden, lösten sich ebenfalls während der Kultur von den Rändern des Schlauchs. EHTs, die mit einer Schicht Fibrinogen an den Rändern des Perfusionsschlauchs befestigt wurden blieben formstabil, zeigten jedoch keine makroskopisch sichtbare Kontraktion nach 21 Tagen in Kultur (**Abb. 28**).

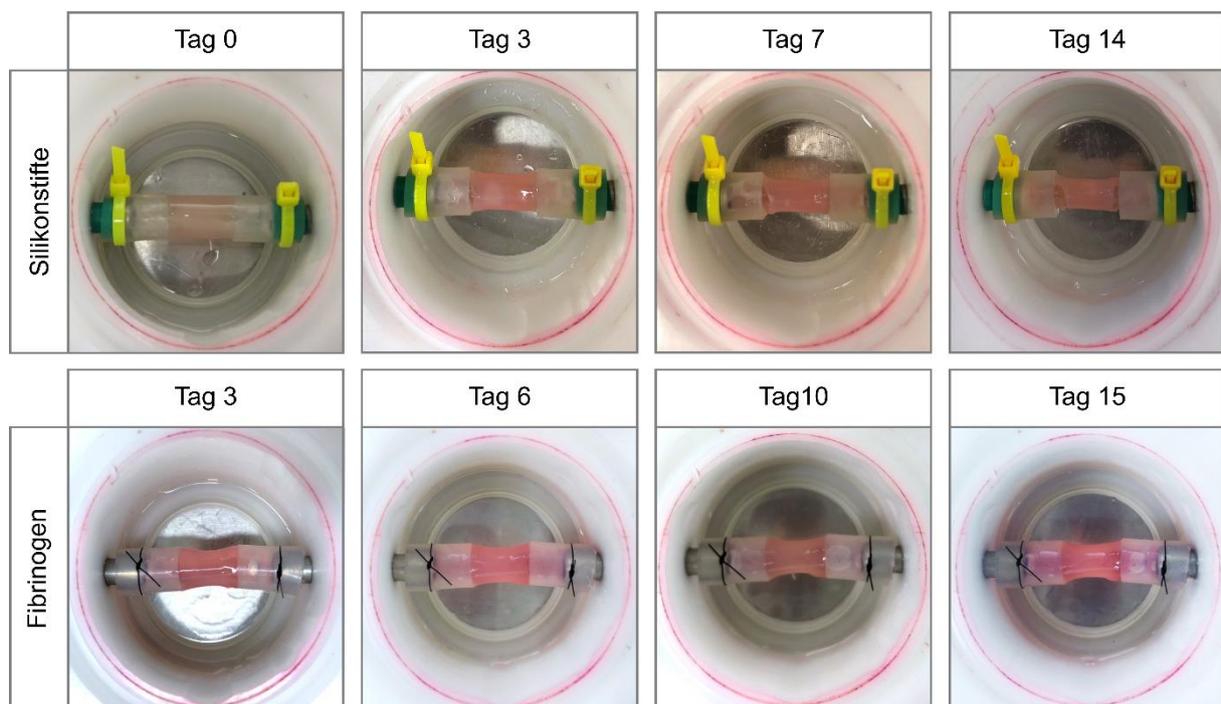


Abbildung 28: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs, die mit verschiedenen Perfusionsschlauch-Modellen kultiviert wurden. Obere Bilderserie: Tubuläres EHT, das mit randständigen Silikonstiften kultiviert wurde. Untere Bilderserie: Tubuläres EHT, das mit einem randständigen Fibrinogen-Gemisch kultiviert wurde.

Mikroskopisch konnten ab Tag 8 Kontraktionen beobachtet werden, die sich jedoch arrhythmisch und mit einer hohen Frequenz zeigten. In einem weiteren Versuch wurde das Modell mit randständigem Klettverschluss getestet, um das EHT an den Rändern des

Perfusionsschlauchs zu fixieren. In diesem Aufbau blieben die EHTs bis zum Ende der Kultivierungszeit in einer tubulären Form, ohne sich von den Rändern des Perfusionsschlauchs zu lösen (**Abb. 29**).

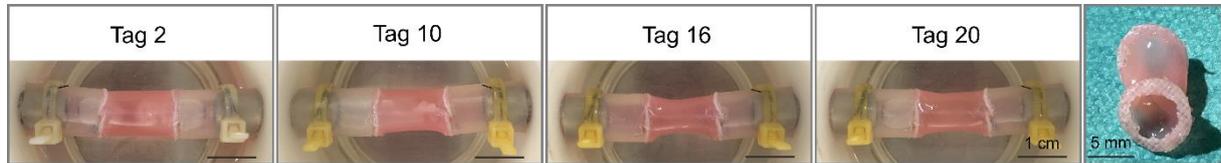


Abbildung 29: Morphologische Darstellung eines EHTs, das in einem pulsatilem Perfusionssystem kultiviert wurde. Als Perfusionsschlauch wurde ein Modell mit randständigem Klettverschluss verwendet. *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Zudem zeigten sich ab Tag 6 - 10 erste synchronisierte mikroskopische Kontraktionen, die ab Tag 8 - 14 auch makroskopisch beobachtet werden konnten. Das letzte Perfusionsschlauch-Modell mit Noppenfortsätzen wurde nicht weiter getestet, da das Modell mit Klettverschluss eine geeignete Trägermembran für die Herstellung von tubulären EHTs darstellte.

5.2.2.1 Morphologische Analyse

Tubuläre EHTs (ID: 6 mm, WS: 1 mm, L: 1,5 cm, KMs: $1,8 \times 10^7/\text{ml}$) konnten in einem pulsatilem Perfusionssystem mit dem zuvor genannten Aufbau formstabil hergestellt werden. Für weiterführende Versuche in diesem Modell wurden Perfusionsschläuche mit randständigem Klettverschluss als Trägermembran für tubuläre EHTs gewählt (**Abb. 30 A**).

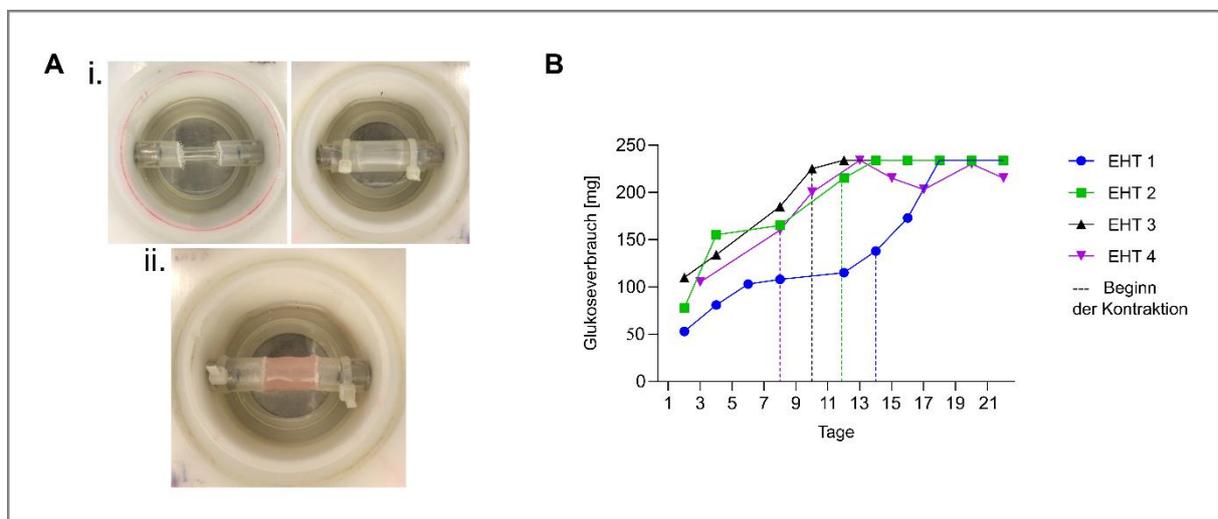


Abbildung 30: Tubuläre EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem. A: i. Gussformat für tubuläre EHTs in einem pulsatilem Perfusionssystem mit Klettverschluss-beschichtetem Perfusionsschlauch. ii. EHT nach Guss. B: Glukose-Verbrauch von tubulären EHTs ($n = 4$) während der Kultivierung (23 Tage). *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Zudem wurde erstmals eine größere Versuchsreihe mit EHTs ($n = 4$) gestartet. Während einer Kultivierungszeit von 21 Tagen organisierten sich die KMs als Gewebeverband mit moderater

Verdichtung um den Perfusionsschlauch (**Abb. 29**). Der Glukose-Verbrauch stieg nach Beginn der Kultivierung kontinuierlich an (**Abb. 30 B**). Nach 23 Tagen in Kultur wurden die EHTs histologisch untersucht, um die Ausrichtung und Reife der Zellen in dem Konstrukt beurteilen zu können (**Abb. 31**).

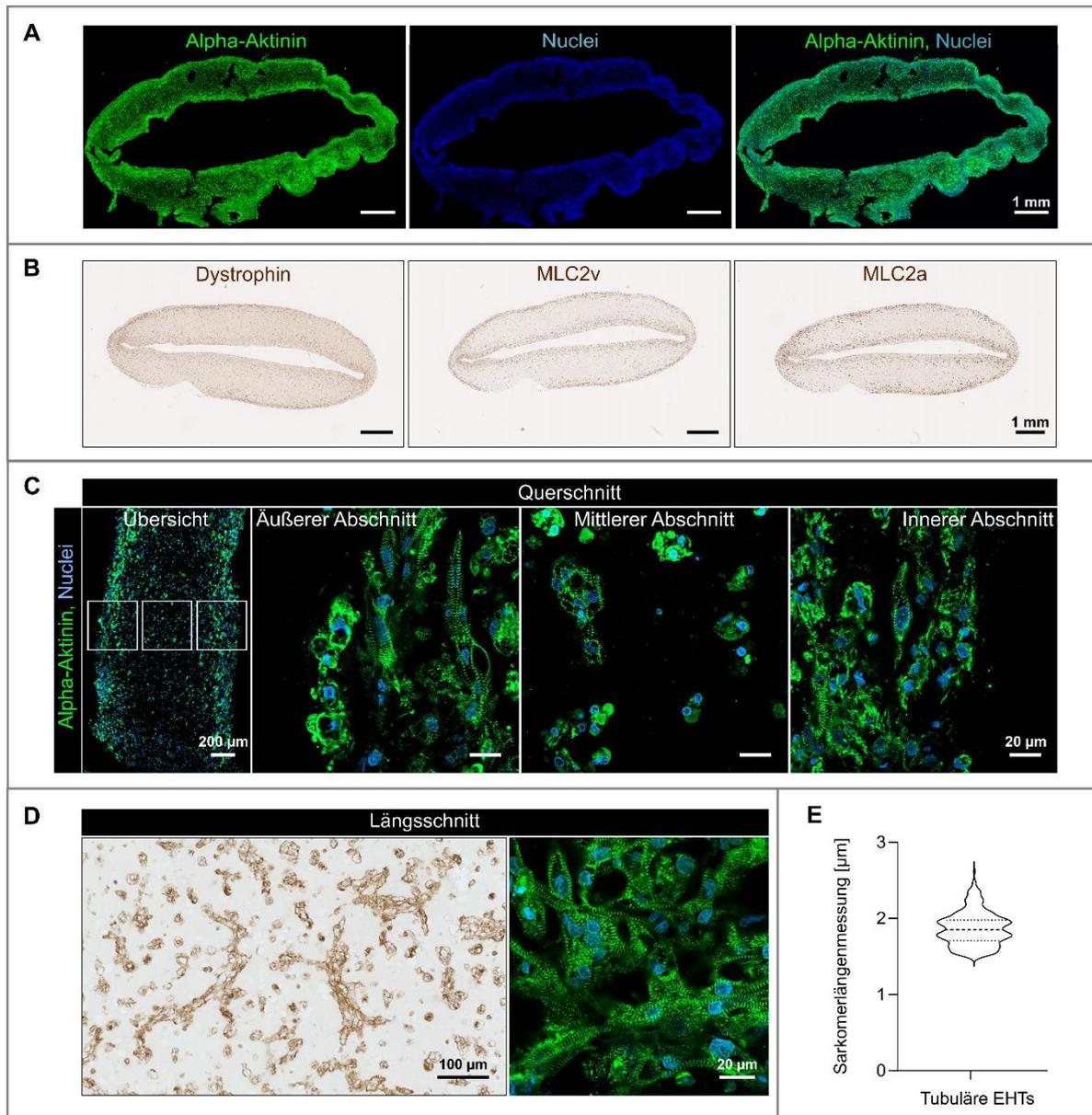


Abbildung 31: Histologische Darstellung von KMs in tubulären EHTs. A: Querschnitt-Übersichtsaufnahme eines tubulären EHTs. KMs wurden mit einer Alpha-Aktinin-Färbung (grün) dargestellt. Zellkerne wurden mit DAPI markiert (blau). B: Querschnitt-Übersichtsaufnahme eines tubulären EHT. Von links nach rechts: KMs wurden mit einer Färbung für Dystrophin, MLC2v und MLC2a dargestellt. C: Von links nach rechts: Querschnittsaufnahme eines tubulären EHT. Höhere Vergrößerung mit der Fokussierung auf drei Abschnitte aus der tubulären Wand. KMs wurden mit einer Alpha-Aktinin Färbung (grün) markiert, Zellkerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. D: Längsschnitt des tubulären EHT. Links: KMs wurden mit einer Färbung für Dystrophin (braun) abgebildet. Rechts: Konfokale Aufnahme von KMs die mit einer Alpha-Aktinin-Färbung (grün) markiert wurden. E: Darstellung der Sarkomerlängenmessung in tubulären EHTs (n = 3 EHTs, > 50 Sarkomere pro EHT). *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

KMs waren im tubulären Querschnitt vermehrt entlang des inneren und äußeren Abschnitts lokalisiert. Im Zentrum des Wandquerschnitts waren nur einzelne, vor allem rundliche, unreife Zellen zu finden. In den Randbereichen waren die KMs vor allem im Querschnitt abgebildet, also longitudinal entlang der tubulären Wand ausgerichtet. KMs exprimierten sowohl die atriale als auch die ventrikuläre Isoform des Proteins MLC2 (*engl. Myosin Light Chain-2*). Insgesamt zeigte der größere Anteil der Zellen einen rundlichen, unreifen Phänotyp. Einige KMs waren zirkulär ausgerichtet und wiesen Reifezeichen, wie einen länglichen Zellkern, auf. Die durchschnittliche Länge der Sarkomere betrug $1,9 \mu\text{m} \pm 0,22$.

5.2.2.2 Kontraktilitätsanalyse

Nach 23 Tagen wurden tubuläre EHTs, die in einem pulsatilen Perfusionssystem kultiviert wurden, in einem video-optischen System untersucht ($n = 2$). Während der Messung blieben die EHTs stabil und zeigten auch außerhalb des Perfusionssystems regelmäßige und rhythmische Spontankontraktionen (**Abb. 32**).

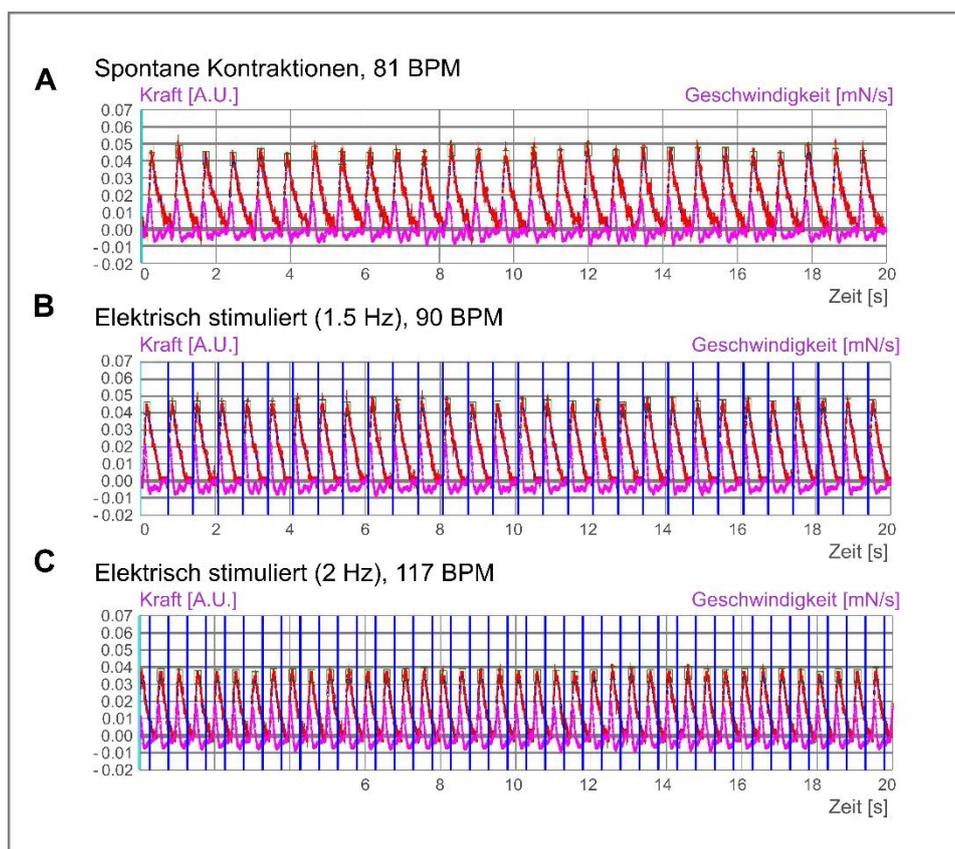


Abbildung 32: Frequenzanalyse von tubulären EHTs. Originalmessung von Kontraktionen eines tubulären EHTs über einen Zeitraum von 20 Sekunden. A: Darstellung der Frequenz von Spontankontraktionen eines tubulären EHTs. B: Darstellung der Frequenz unter elektrischer Stimulation mit 1,5 Hertz (Hz). C: Darstellung der Frequenz unter elektrischer Stimulation mit 2 Hz. Blaue Linien kennzeichnen die einzelnen elektrischen Impulse. *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Die Kontraktilität der EHTs wurde während der spontanen Kontraktionen, sowie während elektrischer Stimulation mit verschiedenen Frequenzen untersucht (**Abb. 32, Abb.33**).

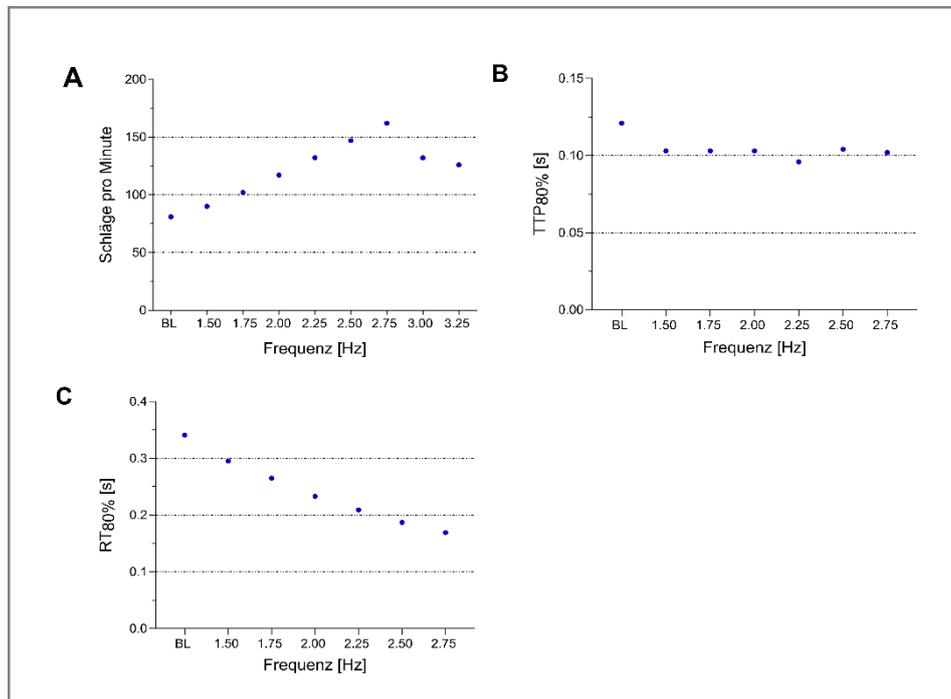


Abbildung 33: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs mit einem video-optischen Messsystem. Stimulations-Frequenz-Analyse von tubulären EHTs ($n = 1$). A: Kontraktionsausschläge pro Minute; B: Kontraktionszeit (TTP80%); C: Relaxationszeit (RT80%). *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Die tubulären EHTs folgten einer elektrischen Stimulation bis zu 2,75 Hertz (Hz) (**Abb. 33 A**). Die Kontraktionszeit (80% der Zeit bis zum Ausschlaghöhepunkt; *engl. time to peak* (TTP)) veränderte sich hierbei nicht mit steigenden Frequenzen (**Abb. 33 B**). Die Relaxationszeit (80 % der Relaxationszeit; *engl. relaxation time* (RT) ausgehend vom Ausschlaghöhepunkt) zeigte einen physiologischen Abfall mit steigender Frequenz (300 ms bei 1,5 Hz bis 170 ms bei 2,75 Hz) (**Abb. 33 C**). Um auch absolute Kraftwerte ableiten zu können, wurden Kraftmessungen im Organbad durchgeführt. Diese erfolgten wie zuvor für EHTs, die in einem 6-Wellformat kultiviert wurden. Dies war technisch schwierig und von insgesamt vier EHTs konnten nur von einem EHT Werte gemessen werden (**Abb. 34**, EHT 1). Die Basalkraft befand sich hierbei in einem sehr niedrigen Bereich (BL: 0,21 mN; $n = 1$). Das EHT zeigte eine verstärkte Kraftentwicklung unter Isoprenalin (max. 0,48 mN unter 1 μ M Isoprenalin; EC50 54 nmol/L), jedoch weiterhin in einem sehr niedrigen Bereich. Aufgrund der mangelnden Ergebnisse und Umsetzbarkeit für EHTs in diesem Format wurde diese Auswertungsmethode für die Studie nicht weiterverwendet.

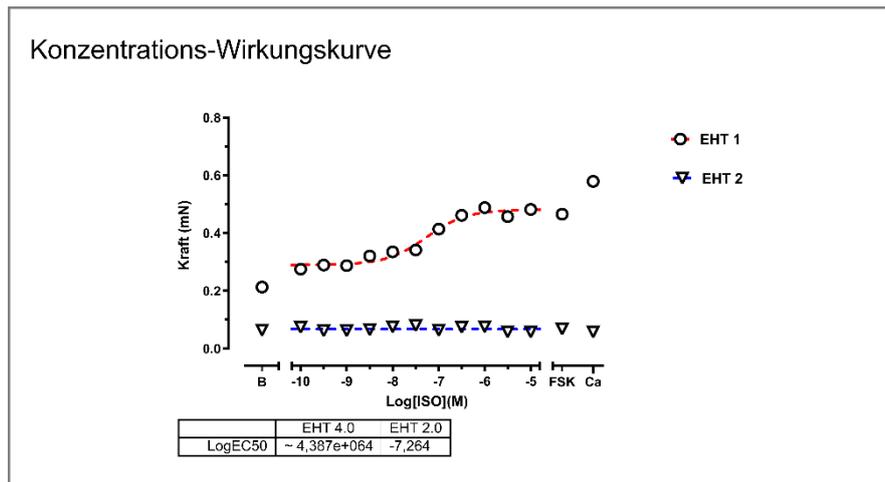


Abbildung 34: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs, die in einem pulsatilem Perfusionssystem kultiviert wurden. EHT 2 konnte in diesem Format nicht zuverlässig analysiert werden. EHT 1 zeigte eine positiv inotrope Reaktion auf Isoprenalin.

5.2.2.3 Druckanalyse

Während der Kultivierung konnte nach Beginn der makroskopischen Kontraktion beobachtet werden, dass das Gewebe aktiv Kräfte entwickeln konnte. Diese führten zu einer leichten Kompression der Silikonmembran des Perfusionsschlauchs. Nach 23 Tagen in Kultur wurden Messungen durchgeführt, um zu testen, ob das Gewebe aktiv Druck gegen eine Wassersäule aufbringen kann. Hierbei konnte eine regelmäßige pulsatile Druckkurve ($n = 3$) abgeleitet werden (**Abb. 35 A**).

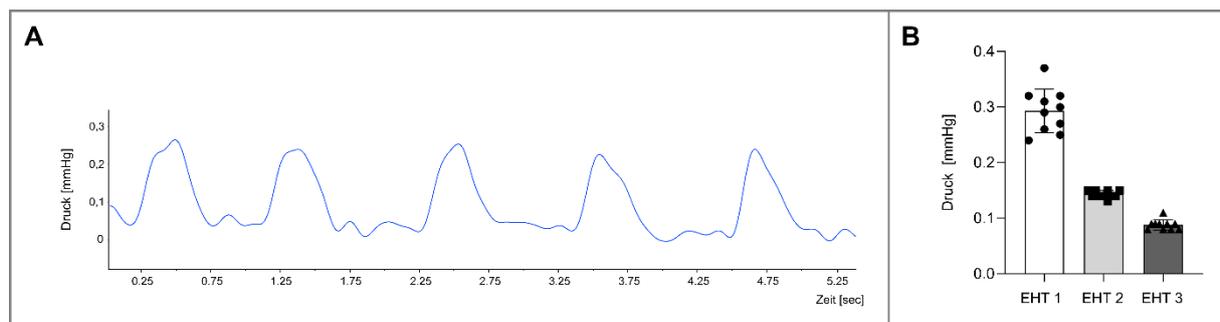


Abbildung 35: Druckmessung von tubulären EHTs innerhalb des Perfusionsschlauchs. A: Gemessene Druckkurve von einem tubulären EHT, repräsentative Darstellung. B: Quantifizierung des Maximaldrucks von drei tubulären EHTs (Der Durchschnittswert für jedes EHT wurde aus mindestens 10 Einzelwerten bestimmt), ($n = 3$). *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Die durchschnittliche spontane Schlagfrequenz betrug 77 ± 5 Schläge pro Minute. Der maximal gemessene systolische Druck, der innerhalb des Perfusionsschlauchs gemessen wurde, variierte zwischen den drei untersuchten EHTs. Dieser wurde in einem Bereich zwischen 0,09 und 0,29 mmHg mit einem Durchschnittswert von 0,2 mmHg gemessen (**Abb. 35 B**).

Um herauszufinden, ob das Material des Perfusionsschlauchs während der Messung Druck abfängt und somit den Realdruck der EHTs verfälscht, wurden simultane Druckmessungen innerhalb und außerhalb des Perfusionsschlauchs durchgeführt, während von außen aktiv Druck auf den Perfusionsschlauch ausgeübt wurde. Der hierbei von außen applizierte Druck befand sich ungefähr in dem Bereich, den die EHTs zuvor aufgebracht hatten (< 1 mmHg). Während der Druckapplikation konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Messungen (innen und außen) festgestellt werden (im Durchschnitt 0,09 mmHg), sodass davon auszugehen ist, dass die im Schlauch gemessenen Werte zwischen 0,09 und 0,29 mmHg annähernd dem Realdruck des EHTs entsprachen (**Abb. 36**).

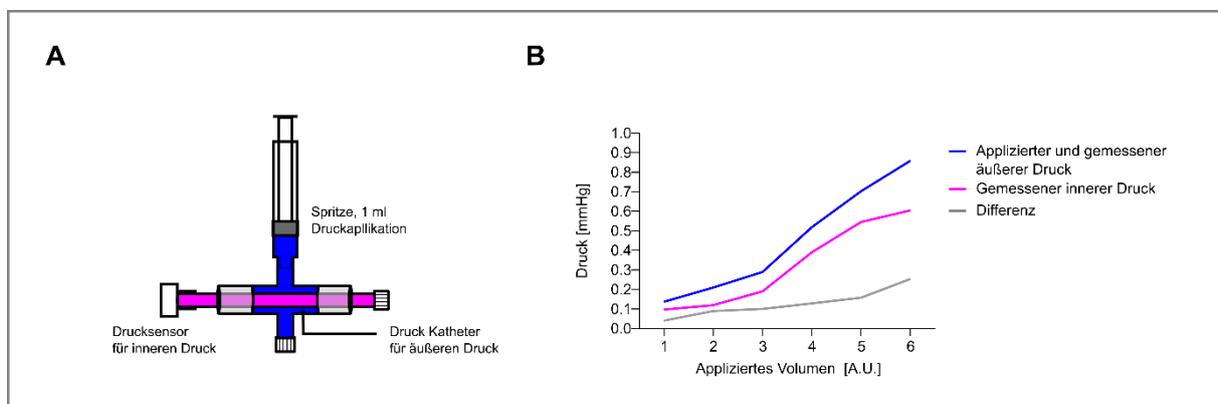


Abbildung 36: System zur Messung der Compliance des Perfusionsschlauchs. A: Von extern wurde Druck mit einer Spritze durch Volumenapplikation induziert. Die Spritze stand mit einer flüssigkeitsgefüllten Kammer um den Perfusionsschlauch in Verbindung (blau). Externer Druck wurde mit einem Katheter gemessen. Interner Druck wurde innerhalb des Perfusionsschlauchs (pink) mit einem Drucksensor gemessen. B: *Compliance*-Analyse des Perfusionsschlauchs. Der pinke Graph repräsentiert den Druck, der innerhalb des Perfusionsschlauchs gemessen wurde. Der blaue Graph demonstriert den applizierten Druck, der extern gemessen wurde. Der graue Graph zeigt die Druckdifferenz zwischen den beiden Messungen. *Modifiziert nach Köhne et al. 2022.*

Nach dem Ablösen aus dem pulsatilem Perfusionssystem wurde ein EHT zudem Berstdruck ausgesetzt, um die Wandstabilität zu testen. Das EHT konnte hierbei einem Berstdruck von mindestens 25 - 30 mmHg (höhere Kräfte konnten in dem System nicht zuverlässig generiert werden) widerstehen, ohne zu zerreißen (**Abb. 37**).

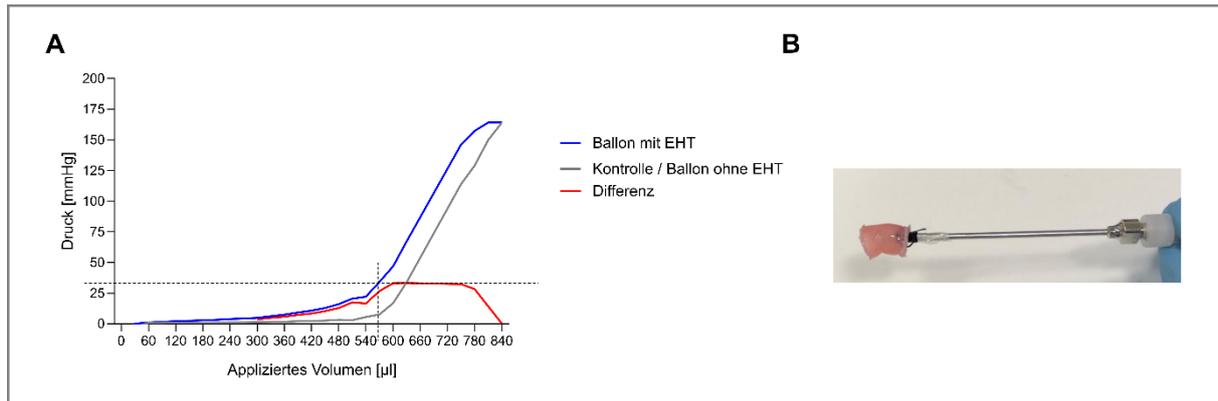


Abbildung 37: Berstdruckmessung eines tubulären EHTs. A: Der Graph zeigt die Druckentwicklung innerhalb eines EHTs durch die *intraluminale* Applikation von Flüssigkeit in einem Ballon-Katheter im Vergleich zur Kontrolle (Katheter ohne EHT), $n = 1$. Der Überlappungsbereich der gestrichelten Linien zeigt den Abfall der *Compliance* des Ballon-Katheters. Die Differenz zwischen der Messung für den Katheter mit EHT und dem Katheter ohne EHT ist in rot dargestellt. B: Ballon-Katheter mit tubulärem EHT.

6 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurde nach einem geeigneten Versuchsaufbau gesucht, um tunnelförmiges Herzmuskelgewebe herstellen zu können. Hierfür wurden verschiedene Kulturbedingungen untersucht. Ziel war es hierbei i) ein Kulturformat zu schaffen, um tubuläre EHTs mit einer stabilen Struktur zu generieren und ii) Methoden zu entwickeln, um dieses morphologisch und funktionell untersuchen zu können. Die Versuche dieser Studie sollen ein erster Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines funktionellen tubulären EHTs sein, das aktiv Blut pumpen kann. Die *Fontan*-Operation ist ein palliativer Eingriff, der in der Regel in mehreren Schritten vor dem zweiten Lebensjahr durchgeführt wird. Dieser dient bei Kindern, die nur eine funktionelle Herzkammer haben, wie bspw. HLHS-Patienten, dazu, den alleinigen Systemventrikel zu entlasten und zwei voneinander getrennte Kreislaufsysteme (Lungen- und Körperkreislauf) herzustellen. Das sauerstoffreiche Blut aus der Lungenzirkulation wird nach der Operation aus dem singulären Ventrikel über eine *Neo-aorta* in den Körperkreislauf befördert. Zudem wird die obere und untere Hohlvene vom rechten Ventrikel abgetrennt und direkt mit der *A. pulmonalis* verbunden (*totale cavopulmonale Anastomose*). Somit wird in der *Fontan*-Zirkulation das venöse Blut aus dem Körperkreislauf über einen künstlichen Bypass (tunnelförmige Kunststoffprothese) an einer aktiv pumpenden Herzkammer vorbeigeleitet und passiv in die Lungenarterien befördert. Durch einen fehlenden aktiven, gerichteten Fluss staut sich das Blut zurück, sodass der zentralvenöse Druck pathologisch erhöht ist und die Auswurfleistung des Herzens erniedrigt ist. Das übergeordnete Ziel dieses Projekts ist der translationale Ansatz, den künstlichen Bypass durch ein vitales und funktionelles Konstrukt aus tunnelförmigem EHT zu ersetzen oder zu ergänzen. Dieses Konstrukt soll einen gerichteten und pulsatilen Fluss in die Lunge unterstützen und somit den pathologisch erhöhten Druck im zentralvenösen System senken. Die Entwicklung eines solchen Konstrukts für die klinische Anwendung steht jedoch noch vor großen Herausforderungen und soll im Folgenden im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit kritisch erörtert werden.

6.1 Funktionalität – Was sollte ein *Fontan*-Tunnel aus EHT leisten?

Ein tubuläres Konstrukt mit klinisch relevanter Funktionalität müsste einen Druck von mindestens 5 - 10 mmHg aufbringen können und einem Berstdruck von ~ 20 mmHg in der *Fontan*-Zirkulation standhalten können. Theoretische Berechnungen von Flussdynamiken in der *Fontan*-Zirkulation konnten zeigen, dass schon eine Reduktion des Drucks im zentralvenösen System von 5 mmHg und ein Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks um 5 mmHg die Situation der Patienten erheblich verbessern könnte (De Leval 2005). Im besten

Fall sollte das Konstrukt Blut aktiv und gerichtet mit einem pulsatilen Fluss in die Pulmonalarterien leiten können (Gewillig et al. 2010). Im ersten Teil dieser Studie konnten tubuläre EHTs in einem 6-Wellformat hergestellt werden. Diese zeigten während der Kultivierung um Silikonsäulen mikroskopische Kontraktionen. Nach der Ablösung von den Silikonsäulen waren diese auch makroskopisch zu sehen. Die im Organbad gemessene Kraft betrug von EHTs, die unter statischen Bedingungen kultiviert worden waren, $6 \text{ mN} \pm 1,4 \text{ mN}$. Gewebe aus dem menschlichen Vorhof oder Ventrikel konnten ähnliche Kraftwerte (um 6 mN) generieren (Wettwer et al. 2004; Christ et al. 2014). In einer großen verbildeten Kontraktilitätsanalyse wurden streifenförmige EHTs mit humanen atrialen Trabekeln verglichen. Die EHTs wurden hierbei in einem video-optischen System untersucht, während die Trabekel im Organbad getestet wurden. Die Trabekel wurden während der Messung elektrisch stimuliert (1 Hz). Im Durchschnitt lagen die basalen Kraftwerte von 52 Trabekeln aus zehn verschiedenen Patienten bei zirka 6 mN , die von spontan kontrahierenden Streifen-EHTs bei zirka $0,19 \text{ mN}$ (Mannhardt et al. 2017). In dieser Arbeit konnten tubuläre EHTs, die im 6-Wellformat unter dynamischen Bedingungen auf einem Schüttler kultiviert wurden, im Organbad nur sehr geringe Basalkräfte aufbringen ($< 1 \text{ mN}$). Diese waren somit im Vergleich zu EHTs, die unter statischen Bedingungen kultiviert wurden, sehr viel geringer. Beide Formate zeigten eine physiologische positiv inotrope Reaktion auf Isoprenalin. Allerdings konnte generell in diesem vertikal ausgerichteten Aufbau um Silikonsäulen keine Formstabilität erreicht werden. Die Konstrukte schrumpften während der Kultivierung von einer tubulären zu einer Ringform. Weitere Konstrukte, wie gewickelte Patch-EHTs oder gestapelte EHTs zeigten entweder keine oder eine unzureichende Funktionalität (keine oder uneinheitliche Kontraktion). Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten tubuläre EHTs in einem pulsatilen Perfusionssystem hergestellt werden. Diese blieben während der Kultivierung formstabil (tubuläre Form, L: zirka $1,5 \text{ cm}$) und konnten aktiv Druck gegen eine Wassersäule aufbauen (*intraluminal* gemessener Druck: \emptyset $0,2 \text{ mmHg}$, max. $0,3 \text{ mmHg}$). Limitationen der Messmethode waren: i) Die Messung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, sodass keine optimale Versorgung mit Gasen bestand (Laurila et al. 2016). ii) Im Zuge dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass ein kleiner Anteil des Drucks (zirka $0,1 \text{ mmHg}$) während der Messung abgefangen wird. Der Realdruck war daher vermutlich geringfügig höher (zirka $0,3 - 0,4 \text{ mmHg}$) als der gemessene Druck. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen anderer Studien, die tubuläre EHT-Konstrukte *in vitro* herstellten und untersuchten. Die von den EHTs generierten Druckwerte waren sowohl in dieser Arbeit, als auch in vergleichbaren Studien weit von einer klinischen Relevanz entfernt ($< 1 \text{ mmHg}$) (Tsuruyama et al. 2019; Park et al. 2020). Um Druck generieren zu können, muss Kraft senkrecht auf eine Fläche einwirken (Demtröder 2008). Für eine Druckentwicklung ist also nicht nur entscheidend, dass das Gewebe Kräfte

generieren kann, sondern dass diese Kraft auch zielgerichtet wirkt. Zu tubulären EHTs, die in einem pulsatilem Perfusionssystem generiert wurden, konnten bisher keine absoluten Kraftwerte gemessen werden. Dennoch konnten hydrostatische Druckwerte bestimmt werden, die darauf schließen lassen, dass das Gewebe gezielt Kräfte aufbringen kann. Für weitere Studien müsste diese richtungsspezifische Kraft noch weiter optimiert werden, um klinisch relevante Druckwerte generieren zu können.

Um zu untersuchen, ob die EHTs erhöhte Druckwerte in der *Fontan*-Zirkulation zumindest theoretisch aushalten können, wurde ein tubuläres EHT einem Berstdruck ausgesetzt. Hierfür wurde ein ansteigender Druck von *luminal* auf das Gewebe ausgeübt. Die *Compliance* des für dieses Experiment verwendeten Ballonkatheters ließ nur Druckapplikationen bis zirka 35 mmHg zuverlässig zu. Dieser Druckwert liegt über dem physiologisch erhöhten venösen Druck in der *Fontan*-Zirkulation und konnte von dem EHT während der Messung abgefangen werden ohne zu zerreißen (Gewillig et al. 2010). Möglicherweise könnte das EHT sogar höhere Druckwerte aushalten. Dies war mit dem aktuellen Druckmesssystem nicht zu untersuchen. Zudem müssten für weitere systematische Analysen von tubulären EHTs mehrere Konstrukte untersucht werden. Andere Arbeitsgruppen, die tubuläres künstliches Herzmuskelgewebe *in vitro* herstellten, beschränkten ihre Analysen auf Druck- und Kraftmessungen, ohne das Gewebe einem Berstdruck auszusetzen (Tsuruyama et al. 2019; Park et al. 2020). Allerdings konnte in mehreren *in vivo*-Ansätzen bereits gezeigt werden, dass EHT-Gewebe, welches um Gefäßtransplantate gewickelt oder vernäht wurde, höhere Druckwerte aushalten konnte und vital blieb (Sekine et al. 2006; Biermann et al. 2016; Seta et al. 2017). Bisher ist jedoch nicht bekannt, wie sich das Gewebe ohne eine stabilisierende Trägermembran (wie ein Gefäß) *in vivo* verhalten würde.

Die im zweiten Teil dieser Arbeit hergestellten tubulären EHTs zeigten makroskopisch regelmäßige Spontankontraktionen während der Kultivierung (ab Tag 8 - 14). Auch nach dem Ablösen aus dem pulsatilem Perfusionssystem konnten im Medium weiterhin Spontankontraktionen beobachtet werden. Die Kontraktionsrichtung war dabei vor allem längs entlang der Wand ausgerichtet. In der Organbadanalyse konnten keine zuverlässigen Kraftmessungen durchgeführt werden. Das Format zeigte sich aus folgenden Gründen ungeeignet: i) Die Aufhängung in horizontaler Ausrichtung zwischen zwei Drähten war für die Dimensionen des Gewebes nicht geeignet (das Gewebe war zu lang). ii) Die Kontraktionsrichtung war vor allem längs, und nicht nach innen gerichtet, sodass die verwendete Aufhängung nicht ideal war, um maximale Kraftwerte zu erfassen (die Aufhängung erfasst vor allem eine nach innen gerichtete Kontraktion). Dennoch konnte das Gewebe hinsichtlich einer physiologischen Kontraktilität untersucht werden. Hierfür wurde ein für

Streifen-EHTs etabliertes video-optisches Messsystem verwendet. Die EHTs zeigten während der Analyse, nach dem Ablösen aus dem Perfusionssystem, eine makroskopische Kontraktion mit regelmäßigen Kontraktionsausschlägen ($77 \pm 5/\text{min}$). Zudem konnten die EHTs elektrisch stimuliert werden. Auch wenn die 3D-Kultur die Reife der Zellen fördert, weisen humane EHTs deutliche elektrophysiologische Reifeunterschiede zu nativem adulten Herzgewebe auf, welche sich in der Frequenz, Kraftentwicklung und Kontraktionskinetik abzeichnen. So erreichen sie bspw. deutlich geringere Kraftwerte und die Reaktion auf bestimmte positiv inotrop (kraftsteigernd) wirkende Medikamente wie Isoprenalin fällt geringer aus als im adulten Herzgewebe (Hirt et al. 2014a; Mannhardt et al. 2016). Für eine potenzielle Anwendung in der *Fontan*-Zirkulation muss das tubuläre Gewebe aktiv Kraft generieren können und stimulierbar (regulierbar) sein. Um dies zu testen, ist eine Analyse der Kontraktionskinetik sinnvoll. Im physiologischen adulten Herz kommt es zu einer Krafterhöhung mit steigender Herzfrequenz, bis ein Maximalwert erreicht wird (positive Kraft-Frequenz-Antwort) (Mannhardt et al. 2016). Zudem folgt das Herz bis zu einer Stimulationsfrequenz von 6 Hz mit einer Kontraktion auf jeden Impuls (Nunes et al. 2013). Für eine Implantation in die *Fontan*-Zirkulation müsste das tubuläre EHT steigenden Stimulationsfrequenzen folgen können, um einen Blutfluss auch bei Anstrengung aufrechterhalten zu können. Das im zweiten Teil dieser Arbeit generierte tubuläre Gewebe konnte elektrisch stimuliert werden und folgte den Impulsen bis 2,75 Hz (165 Schläge/min). Dies könnte für eine potenzielle Implantation und Testung am Tiermodell oder später auch am Menschen vorteilhaft sein, um die Kontraktionen des Herzens mit dem Konstrukt zu koppeln. Dennoch war die Stimulationsfrequenz-Antwort für tubuläre EHTs (bis 2,75 Hz) niedriger als für die bereits etablierten Streifen-EHTs (bis 6 Hz), welche physiologische Werte erreichten (Nunes et al. 2013; Hirt et al. 2014b). Im Vergleich zu anderen Arbeiten mit tubulärem Herzgewebe (max. bis 2 Hz) fiel sie jedoch höher aus (Kubo et al. 2007; Tsuruyama et al. 2019; Park et al. 2020). Die Kontraktionszeit blieb bei steigender Stimulationsfrequenz gleich und die Relaxationszeit verkürzte sich. Eine Beschleunigung der Relaxation mit steigender Frequenz (*engl. frequency dependent acceleration of relaxation, FDAR*) ist im adulten Herzen physiologisch und dient einer schnelleren diastolischen Füllung mit steigender Frequenz. Dies konnte zuvor auch bei Streifen-EHTs beobachtet werden (Mannhardt et al. 2016). Die Ergebnisse im zweiten Teil dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das tubuläre Konstrukt einer steigenden Herzfrequenz bis 165 Schlägen/min folgen könnte und sich währenddessen auch mit steigender Frequenz die Relaxation beschleunigt. Es konnte jedoch nicht untersucht werden, ob sich mit steigender Frequenz auch die Kontraktionskraft erhöht, um den Körper in der verkürzten Zeit mit dem benötigten Blutvolumen zu versorgen. Hierfür wäre es sinnvoll, die Kontraktilitätsanalyse so zu modifizieren, dass in zukünftigen Studien auch absolute Kraftwerte während der Messung bestimmt werden können

und zudem mehrere Konstrukte parallel gemessen werden können. Zudem konnte die Kontraktilität nicht hinsichtlich der Reaktion auf bspw. positiv inotrop wirkende Substanzen untersucht werden.

6.2 Instabilität – Die Hürde für komplexe 3D-Konstrukte

Bisher war es eine große Herausforderung, EHTs mit einer komplexen Geometrie herzustellen. Dies bezieht sich vor allem auf funktionelles Gewebe mit einer stabilen Wandstruktur, dass sich für eine Implantation und *in vivo*-Testung am Tiermodell eignet. Dies liegt vor allem daran, dass EHT-Gewebe während der *in vitro*-Kultivierung über Diffusion mit Nährstoffen und Gasen versorgt wird. Um die Vitalität und Funktionalität der KMs in dem Konstrukt zu erhalten, ist die Wandstärke somit limitiert (Brown et al. 2006). Die Herstellung einer komplexen Geometrie ist mittlerweile vor allem durch das 3D-Drucken von Zellen in Biomaterialien möglich geworden (Noor et al. 2019; Kupfer et al. 2020). Die Konstrukte zeigen jedoch in der Regel eine unzureichende Funktionalität oder eignen sich aufgrund einer zu dünnen Wandstruktur nicht für eine Implantation.

Auch bei der Verwendung von Hydrogelen als Trägermatrix für KMs ist die Gewebeanstabilität bisher eine große Limitation (Li et al. 2018). Vorteile gegenüber anderen Methoden, bei denen bspw. dezellularisiertes Gewebe (Ott et al. 2008) oder vorgefertigte Trägersubstanzen (Macqueen et al. 2018) mit Zellen besiedelt werden, sind die Integrität und Vitalität der Zellen im Gewebeverband. In dieser Arbeit wurde ein Fibrinogen-basiertes Hydrogel als Trägermatrix für KMs gewählt. Fibrinogen hat im Gegensatz zu anderen Hydrogelen folgende Vorteile: **i.** Es polymerisiert schnell, sodass eine gleichmäßige Zellverteilung gewährleistet wird, **ii.** es ist formstabiler als andere Hydrogele, **iii.** für die Herstellung von EHTs werden keine weiteren Zellen mesenchymalen Ursprungs benötigt und **iv.** es wird nach der Transplantation schnell abgebaut (Jockenhoevel et al. 2001; Weinberger et al. 2016).

In den Versuchen dieser Arbeit wurden zunächst EHTs in einem vertikal ausgerichteten Format untersucht. In diesem Format zeigte sich das Gewebe instabil und schrumpfte bereits zu Beginn der Kultivierung von einer tubulären zu einer Ringform. Dieser Effekt war noch stärker, wenn das Gewebe unter dynamischen Bedingungen auf einem Schüttler kultiviert wurde. In weiterführenden Experimenten wurde versucht, die geschrumpften Ring-EHTs nach einer Prækultivierung übereinanderzustapeln. Die Idee beruhte auf früheren Studien mit EHTs, die zeigen konnten, dass mehrere vorkultivierte EHT-Ringe durch Fusion zu EHTs mit verschiedenen Geometrien kombiniert werden konnten. Beispielsweise konnten sechs aufgeschnittene EHT-Ringe miteinander fusionieren und ein einheitlich kontrahierendes Netzwerk bilden (Naito et al. 2006). In den Versuchen dieser Arbeit konnten, die in dem

vertikalen Setting kultivierten EHTs nicht einheitlich miteinander fusionieren. Zudem konnte keine gleichförmige und rhythmische Kontraktion beobachtet werden. Die arrhythmische Kontraktion wurde als Folge der ausbleibenden strukturellen Fusionierung interpretiert. Bei ausbleibender bzw. unvollständiger Fusion wurden die einzelnen EHT-Ringe möglicherweise weiterhin durch die jeweiligen Schrittmacherzentren der einzelnen Ring-EHTs erregt, sodass es zu arrhythmischen und asynchronen Kontraktionen kam. Während adulte ausgereifte ventrikuläre KMs in der Regel nur durch eine benachbarte Zelle depolarisiert werden können, kontrahieren unreife iPSC-abgeleitete KMs spontan. Das liegt vor allem daran, dass sie Ionenkanäle, die vor allem auf Schrittmacherzellen vorkommen, exprimieren. Zudem weisen sie eine hohe spontane Durchlässigkeit für Kalzium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum auf (Carmeliet 2019). Diese Eigenschaften geben ihnen Ähnlichkeiten zu Schrittmacherzellen, die im physiologischen adulten Herzen vor allem im Sinusknoten lokalisiert sind und den Takt des Herzens bestimmen. Die größte Limitation ergab sich jedoch aus der weiterhin instabilen Form und Größe der EHTs nach 21 Tagen in Kultur. Für zusammenhängende Konstrukte mit einem angestrebten Maßstab von zirka 1,5 cm Länge zeigte sich diese Methode nicht praktikabel.

Weiterführend wurde untersucht, ob vorkultivierte Patch-EHTs um einen Perfusionsschlauch aus Silikon vernäht und unter pulsatilem Perfusion kultiviert werden können. Grundlegend hierfür war die Annahme, dass die bereits zusammenhängende Struktur der Patch-EHTs eine tubuläre Stabilität unterstützen könnte. Die Konstrukte wurden bis zur makroskopischen Kontraktion vorkultiviert und anschließend vernäht. Nach der Überführung in das neue Format konnte jedoch keine Kontraktion beobachtet werden. Hierfür könnte die fehlende Spannung der nun nicht mehr zwischen Silikonposthalterungen aufgespannten KMs verantwortlich sein. Durch die fehlende Funktionalität wurden diese Versuche nicht weiterverfolgt.

Im weiteren Verlauf wurde ein Gussystem entwickelt, um tubuläre EHTs in horizontaler Ausrichtung um einen Perfusionsschlauch aus Silikon zu gießen und unter pulsatilem Perfusion zu kultivieren. Die Idee beruhte darauf, dass eine horizontale Ausrichtung im Gegensatz zu dem vertikalen Aufbau möglicherweise weniger durch die Schwerkraft beeinflusst wird und somit ein Schrumpfen in der Länge einschränkt. In diesem Format zeigte sich erstmals eine makroskopische Kontraktion während der Kultivierung. Bei tubulären EHTs, die in vertikaler Ausrichtung um Silikonsäulen kultiviert wurden, konnte eine makroskopische Kontraktion dahingegen erst nach der Ablösung von den Silikonsäulen (nach Ende der Kultivierung) beobachtet werden. Die Form der EHTs war in diesem neuen Kulturformat jedoch weiterhin instabil. Die Längenreduktion zeigte sich hierbei später als in dem vertikal ausgerichteten

Format (zirka ab Tag 10). Das Gewebe kollabierte zunehmend, sobald sich die Ränder des EHTs von den Silikonadaptern des Perfusionsschlauchs gelöst hatten.

In ersten Versuchen zu EHTs in einer Streifenform wurden KMs in einer Hydrogelmatrix zwischen zwei mit Klettverschluss behafteten Glassäulen aufgespannt (Eschenhagen et al. 1997; Fink et al. 2000). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in einem weiteren Schritt untersucht, ob Klettverschluss an den Rändern des Perfusionsschlauchs das Gewebe während der Kultivierung stabilisieren kann. Zwei andere Ansätze zur Verankerung des Gewebes waren die Stabilisierung durch eine Schicht aus Fibrinogen und Silikonstifte an den Rändern des Perfusionsschlauchs. Durch die Verwendung von Klettverschluss konnte in dieser Arbeit tubuläres Gewebe mit einer stabilen Form hergestellt werden (zirka 1,5 cm Länge). Andere Ansätze mit Fibrinogen oder Silikonstiften als Randverstärkung zeigten sich entweder nicht praktikabel oder funktionell ineffizient.

Die im letzten Teil dieser Arbeit hergestellten tubulären EHTs hatten zudem im Vergleich zu anderen Studien (WS < 500 µm, ID: zirka 2 mm) (Lee et al. 2019; Tsuruyama et al. 2019) eine relativ hohe Stabilität und Größe (WS: 1 cm, ID: 0,6 cm). KMs waren vor allem entlang des inneren und äußeren Wandabschnitts lokalisiert, mit nur wenigen unreif erscheinenden Zellen (rundlich und nicht ausgerichtet) im Zentrum, wie es bereits aus vorherigen Arbeiten zu kleineren und größeren EHT-Konstrukten bekannt ist (Eschenhagen et al. 1997; Fink et al. 2000; Hirt et al. 2014a; Weinberger et al. 2016). In allen Kulturmodellen, die in dieser Arbeit getestet wurden, gab es keine Versorgung mit Medium von *intraluminaler* Seite. Die Zellen konnten also nur von außen mit Nährstoffen versorgt werden. Gase wie bspw. Sauerstoff konnten jedoch auch *intraluminal* über die Silikonmembran an das Gewebe gelangen. In einer Publikation mit ringförmigen EHTs wurde argumentiert, dass EHTs kleine Konstrukte sind, die eine Diffusion nicht behindern. Deshalb wurde vermutet, dass die geringe Zelldichte im Zentrum wahrscheinlich auf eine fehlende Spannung in diesem Bereich bei ungleichmäßiger Verteilung während der Kultivierung zurückzuführen ist (Naito et al. 2006). In einer Studie mit Streifen-EHTs zeigte sich in elektrisch stimulierten EHTs eine höhere Zelldichte im Zentrum, als in EHTs, die ohne elektrische Stimulation kultiviert wurden (Hirt et al. 2014a). Auch dieses Erkenntnis spricht gegen die Theorie, dass fehlende Nährstoffe die Ursache für eine geringe Zelldichte im Zentrum sind. In Patch-EHTs führte eine integrierte Netzstruktur zu einer gleichmäßigeren Verteilung und Ausrichtung von KMs. Zudem konnte die dynamische Kultivierung auf einem Schüttler diesen Effekt verstärken (Querdel et al. 2021). Allerdings lässt sich nicht sagen, ob die bessere Verteilung der Zellen durch optimierte Spannungslinien bedingt war, da durch die integrierten Löcher auch Nährstoffe besser an das Gewebe gelangen konnten. In den Versuchen dieser Arbeit war die Wandstärke der EHTs vergleichsweise hoch.

Dennoch müssen Nährstoffe zu den KMs entlang des inneren Wandabschnitts gelangt sein. Da kein Medium mit dem inneren Wandabschnitt in Kontakt kam, konnten die Nährstoffe die Zellen wahrscheinlich über Diffusion erreichen. Die höhere KM-Dichte und Ausrichtung entlang des inneren und äußeren Wandabschnitts ist daher möglicherweise durch dort wirkende Spannungslinien bedingt. Zentral wirkten dahingegen vermutlich weniger Kräfte auf das Gewebe.

6.3 Welche Kulturbedingungen sind am besten für Funktionalität und Reife geeignet?

Für die Kultivierung von tubulären EHTs wurden verschiedene Kulturbedingungen getestet. In allen Formaten diente eine dünnwandige Membran aus Silikon (WS <500 µm) als Trägerstruktur der EHTs (in vertikaler Ausrichtung um Silikonsäulen oder in horizontaler Ausrichtung um einen Perfusionsschlauch aus Silikon). Grundlage hierfür waren nicht publizierte Vorversuche, die zeigen konnten, dass eine dünne Membran aus Silikon im Gegensatz zu einer dickeren Wandstärke die Reife von KMs in einem zirkulären Format förderte. Das im ersten Teil der Arbeit entwickelte Kulturformat um Silikonsäulen zeigte sich, wie bereits in den vorherigen Kapiteln erwähnt, für die Herstellung von tubulären EHTs nicht praktikabel. Daher wird in diesem Kapitel vor allem die Kultivierung in einem pulsatilem Perfusionsmodell diskutiert, welches sich für die Herstellung von tubulären EHTs eignete.

6.3.1 Kultivierung von tubulären EHTs unter pulsatiler Perfusion

In Zuge dieser Arbeit konnte ein pulsatilem Perfusionssystem für die Kultivierung von tubulären EHTs entwickelt werden. Über eine Steuereinheit konnten unterschiedliche Flussraten und Frequenzen eingestellt werden. Durch die Verwendung von peristaltischen Mikropumpen konnte in diesem System die Flussrate reguliert werden (0 - 150 ml/min). Zudem konnte durch einen integrierten Schalter eine periodisch wiederkehrende Druckamplitude (pulsatiler Fluss) eingestellt werden. In anderen Studien gab es Hinweise darauf, dass eine Gewebepfusion die Zellvitalität und -reife steigert und somit möglicherweise die Kontraktionskraft der EHTs erhöhen könnte. Beispielsweise war die Vitalität in einem perfundierten tubulären Konstrukt aus Myoblasten im Vergleich zu einer Kultivierung ohne Perfusionsfluss erhöht (Lee et al. 2019). Weiterhin zeigten EHTs unter perfundierten Bedingungen über integrierte Mikrokanäle eine höhere Vitalität und Reife (Carrier et al. 2002; Vollert et al. 2014). Auch kontraktile tubuläre EHTs konnten bereits unter einem Perfusionsfluss *in vitro* hergestellt werden (Tsuruyama et al. 2019). Für die Experimente dieser Arbeit wurde zunächst eine Flussrate von 10 ml/min mit einer Frequenz von 83 Impulsen/min gewählt. Der über die Silikonmembran auf das EHT einwirkende periodisch wiederkehrende max. systolische Druck betrug zirka 20 mmHg. Aus

vorherigen Arbeiten mit EHTs war bekannt, dass Zellen, welche in direktem Kontakt mit einem Perfusionsfluss waren, nur bei einer sehr niedrigen Flussrate (<1 ml/min) vital blieben. Ein hohe Schubspannung wirkt sich dahingegen negativ auf die Reife und Vitalität der KMs aus, auch wenn höhere Flussraten das Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen erhöhten (Vollert et al. 2014). Die meisten Ansätze, um *in vitro* künstliches Muskelgewebe unter Perfusion zu kultivieren, beruhen daher auf der Applikation von sehr niedrigen Flussraten (Carrier et al. 2002; Lee et al. 2019; Tsuruyama et al. 2019). In dieser Arbeit war die Einstellung von einer vergleichsweise hohen Flussrate (10 ml/min) in dem Perfusionssystem möglich. Durch eine zwischengeschaltete Membran aus Silikon (Perfusionsschlauch) war das Gewebe von einem direkten Flusskontakt getrennt, sodass die auf das Gewebe einwirkende Schubspannung reduziert wurde.

Weiterhin wurde im Gegensatz zu anderen Studien kein kontinuierlicher, sondern ein pulsatiler Fluss getestet. Dies erscheint intuitiv, da ein hämodynamischer Blutfluss auch während der Herzentwicklung im Embryonalstadium entscheidend zu sein scheint (Lindsey et al. 2014). Durch eine wiederkehrende Druckamplitude könnte, die auf das EHT einwirkende periodische Spannung möglicherweise die Ausrichtung von KMs entlang von Kraftlinien und somit die Reife und Kontraktionskraft fördern. Spannung entsteht, wenn Kraft auf eine Fläche wirkt und ist in der Strukturmechanik ein Maß für die mechanische Beanspruchung in einem Material (Demtröder 2008). Die Ausreifung von KMs unter Spannung ist bereits durch vorherige Untersuchungen erforscht und mittlerweile für EHTs mit einem einfachen Format wie einer Streifenform gut etabliert (Fink et al. 2000; Hirt et al. 2014; Ruan et al. 2016). Die meisten Ansätze beziehen sich hierbei auf eine kontinuierlich applizierte Spannung und nicht auf eine periodisch wiederkehrende Konditionierung des Gewebes. Für einfaches streifenförmiges Gewebe konnte bspw. gezeigt werden, dass eine zyklisch wiederkehrende Spannung im Gegensatz zu einer statisch andauernden Spannung die Ausrichtung und Ausreifung der KMs in EHTs fördert (Tulloch et al. 2011). Ob eine periodisch wiederkehrende Dehnung durch einen pulsatilen Fluss vorteilhaft für die Ausreifung von KMs in einem tubulären Konstrukt ist, bleibt jedoch unklar. Zudem fehlt in der hier vorgestellten Arbeit eine definierte Kontrollgruppe unter statischen Bedingungen (ohne Fluss), um Vorteile eines pulsatilen Flussmodus nachweisen zu können. Die Entwicklung des Formats erfolgte in erster Linie, um in einem ersten Schritt tubuläre EHTs mit stabiler Form herstellen zu können. In weiteren Studien könnten die Vor- oder Nachteile eines pulsatilen Flusses auf die Reife und Funktionalität von KMs in einer Hydrogelmatrix weiter untersucht werden. Das in dieser Arbeit etablierte System ermöglicht das Testen von verschiedenen Flussraten (0 - 150 ml/min) und Pulsfrequenzen (10 - 100 Impulse/min). Weiterhin könnten EHTs sowohl unter laminaren Flussbedingungen als auch ohne Perfusion unter statischen Bedingungen untersucht werden.

6.3.2 Perfusionsschlauch – Trägermembran für die Kultivierung von EHT

Tubuläre EHTs wurden in dieser Arbeit um eine dünnwandige Silikonmembran kultiviert. Diese diente dazu, das EHT von einem direkten Kontakt mit dem Perfusionsfluss abzuschirmen. Weiterhin diente der Perfusionsschlauch auch als Trägermembran für die Kultivierung der EHTs. Daher könnte die Struktur des Perfusionsschlauchs Einfluss auf das Format, sowie die Vitalität und Reife der KMs während der Kultivierung haben. Hierfür können folgende Gründe genannt werden: Durch eine geeignete Struktur könnte i) eine Versorgung mit Nährstoffen und Gasen über die Membran möglich sein, ii) die Ausrichtung der KMs entlang von Spannungslinien gefördert werden, iii) eine periodische Druckübertragung auf KMs möglich werden, ohne diese zu schädigen und iv) ein stabiles EHT-Format generiert werden, ohne dass das Gewebe während der Kultivierung kollabiert. Der in dieser Studie verwendete Perfusionsschlauch konnte einige dieser Eigenschaften erfüllen. Zum einen konnte Sauerstoff über die Membran diffundieren. Zum anderen konnte nach einer Verankerung des EHTs mithilfe von randständigem Klettverschluss ein stabiles tubuläres Format generiert werden. Weiterhin wird durch die Verankerung zwischen Klettverschlussringen womöglich eine auf das EHT einwirkende Spannung induziert, die eine Ausrichtung und Ausreifung von KMs fördert. Über die Silikonmembran des Silikonschlauchs konnte ein peristaltischer Maximaldruck von zirka 20 mmHg auf das Lumen des EHTs übertragen werden. Eine Versorgung mit Nährstoffen war über den Perfusionsschlauch jedoch nicht möglich. Zudem bietet Silikon als künstliches Material keine natürliche Faserstruktur, die ein Ausrichten und Reifen der KMs zusätzlich fördern könnte. In anderen Ansätzen wurden bspw. Biomaterialien aus dezellularisierten Gefäßen oder 3D-gedrucktem Kollagen als Trägermaterial verwendet (Lee et al. 2019; Park et al. 2020). Diese konnten die Gewebestabilität auf natürliche Weise fördern. Über Mikroporen, die während des Druckens in das Kollagen miteingearbeitet wurde, konnten sogar Nährstoffe über die Membran diffundieren (Lee et al. 2019). Für zukünftige Studien könnten somit auch verschiedene Materialien als Trägermembran für das EHT während der Kultivierung untersucht werden.

6.3.3 Zelluläre Ausrichtung entlang von Kraftlinien

Sowohl in tubulären EHTs, die in vertikaler Ausrichtung ohne Perfusion, als auch in EHTs, die in horizontaler Ausrichtung unter Perfusion kultiviert wurden, waren die KMs vor allem entlang des inneren und äußeren Wandabschnitts lokalisiert. Im Zentrum der Wand zeigten sich nur vereinzelte KMs, die vor allem rundlich und unreif erschienen. In EHTs, die in vertikaler Ausrichtung unter statischen Bedingungen kultiviert wurden, zeigten sich vor allem randständig mehr ausgerichteteten KMs. In EHTs, die in demselben Format unter dynamischen

Bedingungen kultiviert wurden, konnte dies nicht beobachtet werden. Ursächlich ist möglicherweise der frühzeitige Stabilitäts- und somit Spannungsverlust, der bei EHTs, die unter dynamischen Bedingungen kultiviert wurden, stärker ausgeprägt war. Da in beiden Formaten keine stabilen tubulären EHTs generiert werden konnten, wurde dieser Ansatz, wie bereits oben erwähnt, nicht weiterverfolgt.

In tubulären EHTs, die in einem pulsatilem Perfusionssystem kultiviert wurden, waren die meisten KMs längs entlang der Wand des EHTs ausgerichtet. Färbungen für die atriale und ventrikuläre Isoform des Proteins *Myosin regulatory light chain 2* (MLC2a and MLC2v) zeigten, dass eine größere Anzahl der KMs (zirka 60 %) die atriale Isoform exprimierten und somit unreif waren. Trotzdem exprimierten beinahe 50 % der Zellen die ventrikuläre Isoform, was auf eine zunehmende Ausreifung während der Kultur hindeutet (Gottshall et al. 1997; Lian et al. 2012). iPSC-abgeleitete KMs in der 2D-Kultur (Zeitpunkt der EHT Herstellung; 20 Tage nach Induktion der Differenzierung) sind größtenteils MLC2a-positiv und beginnen erst im Verlauf der Reifung, MLC2v zu exprimieren (Lian et al. 2012). Weitere Hinweise für eine unvollständige Ausreifung der KMs in dieser Arbeit waren wenige morphologisch abgrenzbare verlängerte Zellkerne und eine im Durchschnitt niedrigere Länge der Sarkomere (Durchschnitt: 1,9 μm) im Vergleich zu reifem adultem Herzmuskelgewebe (Bird et al. 2003). Für die Herzentwicklung spielen mechanische Kräfte eine wichtige Rolle (Vandenburgh et al. 1995; Lindsey et al. 2014). Auch im adulten Herzen wirken mechanische Kräfte während einer Herzaktion auf die KMs ein. Diese beinhalten eine Dehnung während die Herzkammern gefüllt werden (Vorlast) und eine Spannung, gegen die das Herz anschließend kontrahieren muss (Nachlast), um genügend Volumen zu fördern (Boron and Boulpaep 2000). In ersten Versuchen mit EHTs wurde das Gewebe zwischen unflexiblen Glasröhren, die mit Klettverschluss beklebt waren, verankert (Eschenhagen et al. 1997). Unter diesen Bedingungen begannen die KMs in einem 3D-Gewebeverband synchronisiert isometrisch zu kontrahieren. Wie in dieser Arbeit waren die KMs vor allem vermehrt an den Rändern des EHTs lokalisiert. Zudem waren sie in diesen Bereichen verstärkt ausgerichtet und ausgereifter. Zentral zeigte sich wie in den Konstrukten dieser Arbeit eine deutlich niedrigere Konzentration an KMs mit uneinheitlicher Struktur und Orientierung. In einer weiterführenden Studie zu diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass EHTs, die unter einer zyklisch angewandten Dehnung (Vorlast durch Dehnung um 20 % der Ausgangslänge) kultiviert werden, besser ausreifen (Fink et al. 2000). Die Zelldichte in den randständigen Bereichen und auch im zellarmen Zentrum vergrößerte sich. Zudem waren die Zellen größer, vermehrt ausgerichtet und wiesen einen höheren Anteil an Myofilamenten und Mitochondrien auf. Eine auxotonische Spannung zwischen einer flexiblen Verankerung konnte diesen Effekt noch verstärken (Naito et al. 2006). Heutzutage werden standardisierte Streifen-EHTs daher zwischen flexiblen

Silikonstifthalterungen kultiviert (Hansen et al. 2010; Mannhardt et al. 2016). Es ist bekannt, dass Spannung durch eine mechanische Belastung den Phänotyp des Herzens auf zellulärer Ebene (Hypertrophie) beeinflussen und im Übermaß zu einer pathologischer Ausprägung führen kann (Hasenfuss and Just 1994; Katz 2002). In Arbeiten mit EHT führte eine definierte Dehnung zwar zu einer Zellvergrößerung durch Hypertrophie, jedoch nicht mit pathologischer Ausprägung, und wirkte sich positiv auf den Gewebeverband aus (Fink et al. 2000). Es folgten zahlreiche Studien mit EHTs, in denen sich eine Spannung durch Vor- und Nachlast positiv auf die Funktion und Reife von EHTs auswirkte (Hansen et al. 2010; Mannhardt 2016; Bliley et al. 2021). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Muskelzellen bei einer kontinuierlich auf sie einwirkenden statischen Spannung parallel zu der Belastungsrichtung ausrichten (Eschenhagen et al. 1997; Matsuda et al. 2004). Bei einer dauerhaft auf sie einwirkenden zyklischen Dehnung mit anschließender Relaxation richteten sich die Zellen dahingegen senkrecht zur Krafrichtung aus (Vandenburgh et al. 1995; Nguyen et al. 2013). Von diesen Ergebnissen ausgehend hätte man vermuten können, dass sich die KMs in dieser Arbeit unter pulsatilem Perfusion durch die periodische radiale Dehnung (die über die Silikonmembran des Perfusionsschlauchs auf die KMs übergeleitet wurde) hauptsächlich zirkulär in dem Konstrukt anordnen. Die KMs waren jedoch nur vereinzelt in den randständigen Bereichen zirkulär angeordnet. Die meisten KMs waren entweder unreif und unstrukturiert oder longitudinal entlang der tubulären Wand ausgerichtet. Die vor allem longitudinale Ausrichtung der KMs könnte durch verschiedene Dinge erklärt werden. Möglicherweise war die Dehnung, die durch den Perfluionsfluss auf tubuläre EHTs übertragen wurde, nicht stark genug. Zuvor konnte gezeigt werden, dass eine Dehnung sich nur dann vorteilhaft auf die Reife der Zellen auswirkt, wenn sie stark genug ist. So hatte eine Dehnung von EHT-Gewebe um 3 % im Gegensatz zu einer Dehnung von 20 % (von der Ausgangsgröße) keine relevante Auswirkung auf die KMs während der Kultivierung (Fink et al. 2000). Dies könnte darauf hindeuten, dass die in dieser Arbeit durch den Perfluionsfluss auf die tubulären EHTs übertragene Dehnung zu schwach gewesen ist, um die Ausrichtung und Ausreifung der KMs maßgebend zu beeinflussen. Die EHTs waren in dem pulsatilem Perfusionssystem während der Kultivierung zwischen Klettverschlussringen an den Rändern des Perfusionsschlauchs verankert. Hierbei wirkte womöglich eine statische Spannung auf die KMs, sodass sie sich einige Zellen parallel zu der Spannungsrichtung und somit longitudinal entlang der Krafflinien ausrichteten. Um die gezielte Ausrichtung von KMs zu fördern, könnte in weiteren Studien untersucht werden, ob das tubuläre Gewebe während der Kultivierung in dem pulsatilem Perfusionssystem gedehnt wird und wie stark die Dehnung ist. Anhand dieses Wertes könnte der Druck in dem System ggf. erhöht werden, um eine stärkere Dehnung zu erreichen. Weiterhin könnten an den Enden des Perfusionsschlauchs möglicherweise flexible Elemente integriert werden, um eine

auxotonische Spannung zu erhöhen. Hierfür müsste das Kulturformat entsprechend angepasst werden. Diese Modifikationen könnten ggf. eine Ausreifung, Ausrichtung und gleichmäßigere Dichte und Verteilung der KMs in dem Konstrukt erhöhen.

6.4 Limitationen – Ausblick für zukünftige Studien

Im letzten Teil dieser Arbeit konnten tubuläre EHTs mit einer stabilen Struktur (L: 1,5 cm, WS: zirka 1 mm, ID: 0,6 cm) hergestellt werden. Diese konnten Druck gegen eine Wassersäule aufbringen (\varnothing 0,2 mmHg, max. 0,3 mmHg), der sich jedoch in einem klinisch irrelevanten Bereich befand. Für zukünftige Studien müsste die Ausrichtung und Reife von KMs in tubulären EHTs weiter verbessert werden. Durch eine Optimierung der Reife und Ausrichtung von KMs könnte die Kontraktionskraft der Konstrukte erhöht werden.

6.4.1 Multizelluläre EHTs

Eine Limitation der in der vorliegenden Arbeit angefertigten EHTs war die begrenzte Wandstärke und ungleichmäßige Verteilung von KMs in den EHTs. Durch eine Verbesserung des Zugangswegs für Nährstoffe zu den Zellen (vor allem im Zentrum der Wand) könnten vermutlich mehr KMs nach dem Guss (während der Kultivierung) oder nach der Implantation (für die Testung am Tiermodell) der EHTs überleben und somit gleichmäßiger verteilt bleiben. Für weitere Studien könnte die Inkorporation von kleinen Poren oder eines tubulären Netzwerks in die Wand der EHTs oder des Perfusionsschlauchs etabliert werden. Eine Gruppe um Feinberg et al. konnte bspw. poröse Biomaterialien als Trägersubstanz für KMs in einer Hydrogelmatrix anfertigen und testen (Lee et al. 2019). Die Mikroporen und eine Inkorporation von vaskulären Wachstumsfaktoren wie VEGF (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor*) in die EHT-Matrix konnten eine Vaskularisation der Konstrukte nach der Implantation fördern. In einem weiteren Ansatz wurden endothelialisierte Kanäle in EHTs eingebracht, um das Gewebe während der Kultur perfundieren zu können. Dies führte zu einer höheren Vitalität und Ausreifung der KMs (Vollert et al. 2014). In den Experimenten dieser Arbeit wurden neben iPSC-abgeleiteten KMs keine weiteren Zellen in die Hydrogelmatrix integriert. Durch die Ko-Kultur mit Endothelzellen (EZs) könnten primitive Gefäße gebildet werden, die möglicherweise die Reifung von KMs unterstützen (Tulloch et al. 2011; Dunn et al. 2019). Bisher zeigte sich dieser Ansatz bei der *in vitro*-Kultur von EHT jedoch nur begrenzt von Vorteil. Unter statischen Bedingungen bildeten sich vor allem unreife, unzusammenhängende Gebilde ohne Lumen. Wenn das Gewebe während der Kultivierung dagegen durch ein Gefäßbett perfundiert wurde, bildeten sich zusammenhängende Gefäßstrukturen mit einem Lumen. Zudem konnten sich die Strukturen mit den Gefäßen des Empfängerorganismus nach einer Transplantation verbinden (Sekine et al. 2013). Diese Ansätze sind jedoch im Allgemeinen sehr komplex und müssten auf ein reproduzierbares und verlässliches Format angepasst werden. Leichter umzusetzen

wäre die Inkorporation von Fibroblasten (FBs), um die Wandstabilität und eine vermehrte Ausreifung der KMs in den EHTs ggf. zu erhöhen. Es gibt bereits mehrere Studien, die eine Ko-Kultur von KMs mit Fibroblasten untersucht haben. Die meisten Ansätze beziehen sich dabei auf die Verwendung von primären Zellen (Lee et al. 2019; Tsuruyama et al. 2019; Park et al. 2020). Eine Ko-Kultur mit FBs könnte die elektrophysiologischen Eigenschaften und die Kontraktionskraft von EHTs möglicherweise fördern (Li et al. 2017; Zhang et al. 2019). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Schicht aus FBs komplexe EHTs in der Form zusätzlich stabilisieren konnte (Lee et al. 2019; Tsuruyama et al. 2019). Dies könnte auch für zukünftige Studien in dem hier untersuchten Format von Vorteil sein. Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Verwendung von primären FBs die elektrophysiologische und mechanische Funktion von KMs während der Ko-Kultivierung negativ beeinflussen kann. Dies liegt vor allem daran, dass FBs das Potenzial haben, eine interstitielle Fibrose auszulösen (Li et al. 2017). Bei einer Ko-Kultur mit FBs sollte also ein geeignetes Verhältnis von FBs zu KMs gewählt werden, um diesen Effekt zu minimieren. Zudem sollten ggf. iPSC-abgeleitete FBs verwendet werden. Die Herstellung von multizellulären EHTs müsste jedoch für einen *in vivo*-Ansatz überdacht werden. In einer Transplantationsstudie mit Patch-EHTs konnte festgestellt werden, dass es nach einer Implantation vor allem innerhalb der ersten zwei Wochen zu einer Umstrukturierung der Matrix kommt. Dabei starben viele KMs zunächst ab und verloren an Struktur und Reife. Nach den ersten zwei Wochen konnten wieder vermehrt proliferierende Zellen beobachtet werden (Querdel et al. 2021). EZs konnten nach der Implantation von multizellulären streifenförmigen EHTs nicht überleben (Weinberger et al. 2016). Durch das vermehrte Absterben von Nicht-KMs eignet sich der Ansatz mit multizellulären EHTs wahrscheinlich eher für eine Stabilisierung während der Kultivierung als für die eigentliche Implantation. Durch eine stabile Struktur könnte das Konstrukt womöglich besser vernäht werden und initial stabil bleiben.

6.4.2 Elektrische Stimulation

Eine weitere Idee, um das im zweiten Teil dieser Arbeit beschriebene Kultivierungsformat zu verbessern, wäre eine kontinuierliche elektrische Aktivierung der KMs während der Kultivierung. Dieser Ansatz könnte das Ausreifen von den Zellen im Konstrukt fördern. Eine elektrische Stimulation führte in anderen Studien mit EHTs zu einer erhöhten Anzahl vitaler Zellen mit einer erhöhten Ausreifung und verstärkten Kraftentwicklung im Gegensatz zu EHTs, die nicht elektrisch stimuliert wurden (Hirt et al. 2014a; Ronaldson-Bouchard et al. 2018). Die Umsetzung für das in dieser Arbeit vorgestellte Format wäre jedoch eine Herausforderung. Hierfür müssten Elektroden dauerhaft in die Kultivierungskammer eingebaut werden, ohne das Gussystem der EHTs und deren Ablösung nach der Kultur zu behindern. Weiterhin müsste

die für die Stimulation notwendige Elektrik in die Kammer eingebracht werden, ohne eine Kontamination oder den Verlust von Medium aus der Kammer zu riskieren.

6.4.3 Integration von EHT-Klappen für einen gerichteten Fluss

Eine weitere Möglichkeit, die Kraft zu erhöhen und das Konstrukt an eine hämodynamische Zirkulation anzupassen, wäre die Integration von Klappen. Zudem könnte der pathologisch erhöhte Druck in der *Fontan*-Zirkulation durch die Integration von Klappen effizienter gesenkt werden. Während der physiologischen Herzaktion sind die Herzklappen dafür verantwortlich, durch druckabhängige Öffnung und Schließung den Rückstrom von Blut zu verhindern (Ventilfunktion, Öffnung nur in eine Richtung). So gewährleisten sie eine adäquate Füllung und Leerung der Herzkammern. In der *Fontan*-Zirkulation herrscht ein erhöhter zentralvenöser Druck. Um den Druck in der unteren Hohlvene zu senken, würde man mit einem Objekt, das aktiv Druck aufbauen kann (also eine Blutsäule komprimiert), zwei Klappen benötigen. Eine Klappe müsste hinter der Kompressionszone lokalisiert sein, um einen retrograden Fluss nach der Relaxation (Dekompression) des Objekts zu verhindern. Eine weitere Klappe müsste vor der Kompressionszone positioniert sein, um einen retrograden Fluss während der Kontraktion (Kompression) zu verhindern (Valdovinos et al. 2014). Das im zweiten Teil dieser Arbeit entwickelte tunnelförmige EHT könnte möglicherweise um Klappen ergänzt werden. Für eine potenzielle Anwendung in der *Fontan*-Zirkulation könnten bspw. trikuspidale Klappen (Taschenklappen) am Anfang oder am Ende der tunnelförmigen EHT-Prothese eingebaut werden. Dies könnte den Rückstau in das zentralvenöse System, zusätzlich zu einer aktiven Kontraktion, weiter vermindern. Zudem könnte auch während der *in vitro*-Kultivierung eine Integration von Klappen sinnvoll sein. Hierdurch könnte eine Dehnung durch den Perfusionsfluss (Füllung) ggf. verstärkt werden und somit Vorlast und Nachlast erhöhen. Dies könnte eine weitere Ausreifung der Zellen in dem Konstrukt fördern und somit auch die Kraftentwicklung erhöhen. Künstliche trikuspidale Herzklappen konnten bereits aus verschiedenen Biomaterialien mithilfe der 3D-Drucktechnik (Duan et al. 2013; Lee et al. 2019) oder einer dezellularisierten Matrix (Motta et al. 2019) hergestellt werden. Bisher ist jedoch die Funktionalität der Konstrukte noch eine Herausforderung. Im Gegensatz zu nativen Klappen weisen diese oft eine mittelschwere Stenose mit hämodynamisch unzureichender Öffnungsfläche auf. Dadurch könnte ein Rückstau in das venöse System in der *Fontan*-Zirkulation ggf. noch verstärkt werden (Blutfluss wird durch die Klappenstenose verhindert). Für die Anwendung von Klappen müsste somit zunächst ein geeignetes Konstrukt entwickelt oder gefunden werden.

6.5 Wie würde ein geeignetes Tiermodell für eine Transplantation aussehen?

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte ein im Vergleich zu anderen Arbeiten stabiles tubuläres Konstrukt hergestellt werden. Dieses könnte potenziell in zukünftigen Studien am Tiermodell getestet werden. Hierfür müsste zunächst ein geeignetes Tiermodell gefunden werden. Bisher gibt es nur wenige Modelle, die eine *Fontan*-Zirkulation ansatzweise imitieren können. Die meisten Modelle wurden für das Testen von mechanischer Unterstützung durch VADs implementiert (siehe Einleitung, Kapitel 2.3.3). Ein grundlegendes Problem ist es, einen vollständigen Bypass (operative Überbrückung) mit Aussparung des rechten Ventrikels herzustellen. 1966 wurde der erste komplette Bypass des rechten Ventrikels am Tiermodell getestet. Hierbei wurde der rechte Vorhof direkt mit der Pulmonalarterie verbunden (Haller et al. 1966). Im Verlauf wurde davon abgesehen, den rechten Vorhof miteinzubeziehen. Dies beruhte zum einen darauf, dass die Kontraktion des Vorhofs nicht benötigt wurde, um den Fluss in die Pulmonalarterien aufrechtzuerhalten (Matsuda et al. 1981). Zum anderen war es nachteilig, das venöse System des Koronarsinus zu hohen Drücken auszusetzen (Miura et al. 1995). Seitdem basieren die meisten Simulationen einer *Fontan*-Zirkulation daher darauf, eine totale cavopulmonale Anastomose (TCPC) herzustellen (De Leval et al. 1988). Über die letzten Jahrzehnte wurden verschiedenste Ansätze an Tiermodellen getestet, um eine Zirkulation mit modifizierter TCPC, mit oder ohne kardiopulmonalen Bypass, herzustellen (Kaku et al. 1990; Macé et al. 2000; Henaine et al. 2013b; Wang et al. 2014; Van Puyvelde et al. 2019). Eine der größten Limitationen ist, dass die Tiere ausgehend von einer physiologischen Ausgangssituation akut operiert werden. Dies erlaubt keine Untersuchung am chronischen Modell, wie es in Kindern mit einer *Fontan*-Zirkulation der Fall ist. Zudem steigt durch einen akuten Ausschluss des rechten Ventrikels bei zuvor physiologischer Zirkulation der zentralvenöse Druck spontan stark an und das Angebot an venösem Blut in der Lunge reicht nicht mehr aus. Dadurch kommt es schnell zu einer ventrikulären Dysfunktion mit einer erhöhten Mortalität bei einem instabilen Kreislauf der Tiere (Haneda et al. 1993; Kanakis et al. 2011; Wang et al. 2014). Aktuelle Tiermodelle beruhen daher meistens auf einem inkompletten Bypass des rechten Ventrikels (Szabó et al. 2003; Kanakis et al. 2011; Wang et al. 2014). Ein gutes postoperatives Management könnte die Mortalität der Tiere nach Herstellung einer TCPC ggf. reduzieren. In einer Studie wurde bspw. eine TCPC in Schafen hergestellt. Hierfür wurde die untere Hohlvene vor dem Eintritt in den rechten Ventrikel abgebunden. Die untere Hohlvene wurde dann über eine tunnelförmige Kunststoffprothese direkt mit dem Stamm (*Truncus*) der *A. pulmonalis* verbunden. Die obere Hohlvene wurde vom rechten Ventrikel abgetrennt und ebenfalls direkt mit der *A. pulmonalis* verbunden (**Abb.38 A**). In dieser Studie

wurde argumentiert, dass ein hohes Überleben der Tiere nach Herstellung der TCPC mit einer intensiven Überwachung der metabolischen Parameter während der ersten 12 h postoperativ zusammenhängen könnte (Van Puyvelde et al. 2019).

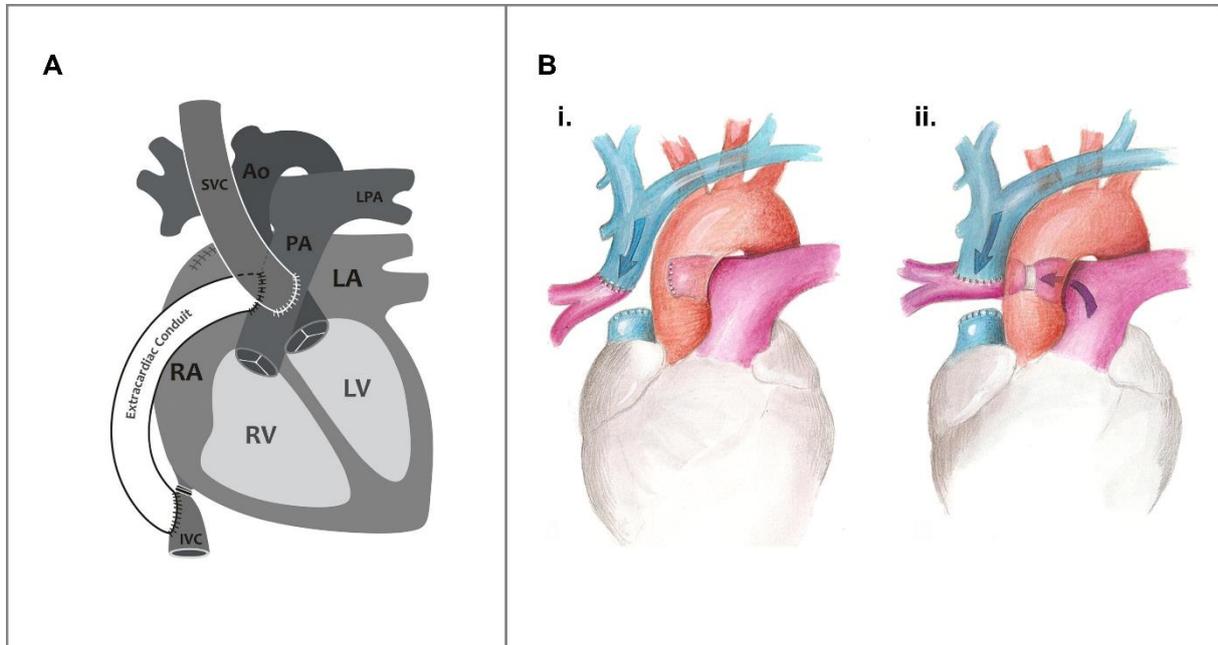


Abbildung 38: Tiermodelle zur Simulation einer Fontan-Zirkulation. A: Schematische Darstellung einer TCPC in Schafen. RA: Rechter Vorhof, RV: Rechter Ventrikel, LV: Linker Ventrikel, LA: Linker Vorhof, LPA: Linke Pulmonalarterie, PA: Pulmonalarterie, Ao: Aorta, SVC: V. cava superior (obere Hohlvene), IVC: V. cava inferior (untere Hohlvene), *Extracardiac Conduit*: Tunnelförmige Kunststoffprothese. B: Bidirektionale Glenn-Anastomose (obere Hohlvene (blau) wurde direkt mit der rechten Pulmonalarterie (pink) verbunden) in Schweinen mit zwei verschiedenen Versuchsgruppen, i. Kompletterschluss der rechten Pulmonalarterie und ii. Banding (inkompletter Verschluss) der rechten Pulmonalarterie. *Modifiziert nach Henaine et al. 2013b; Van Puyvelde et al. 2019.*

Eine Limitation dieses Modells war, dass der venöse Abfluss aus den Koronarvenen im Gegensatz zum venösen Rückstrom aus dem Körperkreislauf weiterhin über den rechten Ventrikel in die Lunge befördert wurde. Unter physiologischen Bedingungen wird der venöse Abfluss des Herzens hauptsächlich über den *Sinus coronarius* in den rechten Vorhof drainiert. In *Fontan*-Patienten kann nach der Herstellung der TCPC kein Blut aus der rechten Kammer in die Pulmonalarterie gelangen, da diese mit einer *Neoaorta* verbunden ist. In dem Tiermodell ist die Pulmonalarterie weiterhin an den rechten Ventrikel angeschlossen, sodass das venöse Blut des Herzens im Gegensatz zu dem venösen Rückstrom aus dem Körperkreislauf über den Ventrikel in die Pulmonalarterie gelangen kann. Dies führte zu einer Dekomprimierung (durch Volumenentlastung) des rechten Ventrikels, welche bei Kindern mit einem HLHS nach der *Fontan*-Zirkulation nicht existent ist. Hier wird der venöse Abfluss des Herzens in den alleinigen und bereits überlasteten Systemventrikel (umfunktionierter rechter Ventrikel) geleitet und kann die Lungenzirkulation für eine Reoxygenierung erst nach Durchlauf des Körperkreislaufs erreichen. Zudem liegt bei den Patienten eine Pathophysiologie mit chronischer Ausprägung

vor. Die Operation an den Schafen wurde akut und in einem Schritt durchgeführt. Weiterhin wurde die Hohlvene nicht mit der rechten, sondern mit dem Hauptstamm der *A. pulmonalis* verbunden (**Abb. 38 A**). Andere Tiermodelle zielen nicht darauf ab, eine komplette TCPC herzustellen, sondern Parameter zu untersuchen, die zu den pathologischen Folgeerscheinungen der *Fontan*-Zirkulation gehören und die Prognose der Patienten verschlechtern. In einem Ansatz mit Schweinen wurden bspw. die Auswirkungen eines fehlenden pulsatilen Flusses im Gefäßbett der Lunge untersucht (Henaine et al. 2013b). In *Fontan*-Patienten besteht durch eine fehlende vorgeschaltete Kammer kein aktiver pulsatiler Fluss in den Lungenarterien. Es wird vermutet, dass ein fehlender pulsatiler Fluss in der Lunge die Bildung von pathologischen Gefäßveränderungen, sog. pulmonal arteriovenösen Malformationen (PAVM), fördert. Diese treten in *Fontan*-Patienten mehrere Jahre nach der Operation gehäuft auf. Die Theorie hierbei ist, dass ein pulsatiler Fluss, sowie Faktoren aus der Leber, die Bildung von pathologischen Gefäßverbindungen verhindern oder minimieren (Marianeschi et al. 1998). In der Studie wurde nur die obere Hohlvene mit der rechten Pulmonalarterie verbunden (bidirektionale Glenn-Anastomose). Die untere Hohlvene wurde unverändert gelassen (**Abb. 38 B**). Zudem wurde die Operation in zwei Abwandlungen durchgeführt: **i.** Die rechte Pulmonalarterie wurde nach dem Abgang aus dem Stamm proximal abgetrennt und verschlossen. Anschließend wurde die obere Hohlvene direkt mit der rechten Pulmonalarterie verbunden. **ii.** Die rechte Pulmonalarterie wurde nicht abgetrennt, sondern nur partiell verschlossen, sodass in der rechten Lunge ein pulsatiler Restfluss über den Ventrikel möglich war. Der linken Lunge wurde in beiden Gruppen weiterhin über den vorgeschalteten Ventrikel (pulsatil) versorgt und diente somit für jedes Tier als Kontrolle für die rechte Lunge. In beiden Gruppen entwickelten die Tiere frühzeitig eine pulmonale Hypertonie. In der Gruppe mit einem inkompletten Verschluss der rechten *A. pulmonalis* kam es im Gegensatz zu der Gruppe mit einem kompletten Verschluss nicht zu PAVMs in der rechten Lunge. Die linke Lunge war im Gegensatz zu der rechten Lunge histologisch unauffällig. Auch diese Studie weist einige Limitationen auf. Die Studie war auf einen Zeitraum von drei Monaten beschränkt. Beim Menschen dauert es dahingegen Jahre, bis es in der *Fontan*-Zirkulation zu der Ausbildung von pathologischen Gefäßveränderungen in der Lunge kommt. Auch wenn drei Monate im Vergleich zu anderen Studien mit Tiermodellen lang sind, ist dieses Modell weit von einem chronischen Modell, das die *Fontan*-Zirkulation simuliert, entfernt. Weiterhin bestand keine vollendete *Fontan*-Zirkulation mit einer TCPC. Im Gegensatz zu Großtiermodellen sind Kleintiermodelle oft nicht praktikabel für mehrfache oder komplizierte Operationsschritte. Zudem unterscheidet sich die Anatomie von Kleintieren von der Anatomie in Menschen. Beispielsweise haben Ratten eine bilaterale *V. cava*. In einer Zirkulation mit

unilateraler *V. cava* ist die pathologische Druckerhöhung nach der Fontan-Operation vor allem in der oberen Hohlvene wahrscheinlich höher (Starnes et al. 2002).

In der hier vorgelegten Arbeit konnten im Vergleich zu anderen Studien tubuläre Konstrukte mit einem großen Innendurchmesser (6 mm) und einer hohen Wandstärke (zirka 1 mm) hergestellt werden. Dennoch müsste das EHT für Ansätze in größeren Tiermodellen im Maßstab weiter vergrößert werden. Minischweine könnten ein zukünftiges Tiermodell darstellen. Der Durchmesser der *V. cava caudalis* von Minischweinen beträgt zirka 12 - 14 mm (Hieb et al. 2009). Für eine Implantation in oder um die *V. cava* müsste das Konstrukt in der Größe somit verdoppelt werden. Hierfür müsste das Kulturformat, inklusive Kammer und Perfusionsschlauch auf die benötigten Durchmesser angepasst werden.

6.6 Fazit der Diskussion

Das in dieser Arbeit entwickelte Format für die Herstellung eines tubulären EHTs könnte die Grundlage für die Generation eines Konstrukts mit klinisch relevanter Funktionalität darstellen. Bisher konnten von dem Konstrukt nur Kräfte in einem niedrigen Bereich aufgebracht werden. Ein Großteil der KMs in den EHTs war unreif und ohne einheitliche Orientierung. Durch die Entwicklung eines optimierten Kulturformats könnte die Reife und Ausrichtung der KMs und somit auch die Kontraktionskraft gefördert werden. Am ehesten würde sich in diesem Sinne eine Ko-Kultivierung mit Fibroblasten, die Inkorporation von vaskulären Promotoren oder eine elektrische Aktivierung der KMs während der Kultivierung umsetzen lassen. Weiterhin könnten Kulturkammer und Perfusionsschlauch aus Biomaterialien hergestellt werden, bspw. durch die Verwendung der 3D-Drucktechnik. Eine Ko-Kultivierung mit Fibroblasten könnte die tubuläre Wand zusätzlich stabilisieren. Zusätzlich könnte durch eine elektrische Stimulation die Reife und Ausrichtung der KMs gefördert werden. Dieser Effekt könnte durch die Verwendung eines geeigneten Biomaterials für den Perfusionsschlauch wie bspw. Kollagen gefördert werden. Hierdurch könnten die Versorgung des EHTs mit Nährstoffen, sowie die Übertragung von mechanischen Stimuli über den Fluss verbessert werden. Zudem würde eine natürliche Faserstruktur die Stabilität und Reife der Zellen womöglich weiterhin unterstützen. Um die Auswirkung eines pulsierenden Flusses auf KMs untersuchen zu können, müssten in zukünftigen Studien Kontrollgruppen eingeführt werden, die in demselben Format unter statischen Bedingungen kultiviert werden. Für eine Testung *in vivo* müsste ein geeignetes Tiermodell und eine passende Operation für die Simulation der *Fontan*-Zirkulation gefunden werden. Durch die oft komplexen Eingriffe und die Notwendigkeit eines geschulten postoperativen Managements wird hierfür ein erfahrenes Team mit chirurgischer Vorerfahrung benötigt. Hierfür müsste das in dieser Arbeit etablierte tubuläre Konstrukt auch in der Größe angepasst werden.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, ein funktionelles und stabiles tubuläres Herzkonstrukt zu generieren. Der Hintergrund dieses Projekts bezieht sich auf Kinder mit einem angeborenen Herzfehler, dem sogenannten hypoplastischen Linksherzsyndrom (HLHS). Bei diesem fehlen wichtige Strukturen der linken Herzkammer oder sind nur hypoplastisch ausgebildet. Die am häufigsten angewandte Therapie ist ein palliativer Eingriff, genannt *Fontan*-Operation. Bei dieser wird eine univentrikuläre Zirkulation geschaffen. Das aus dem Körperkreislauf kommende verbrauchte venöse Blut wird hierbei passiv an einer aktiv pumpenden Kammer vorbeigeleitet und direkt in die Pulmonalarterien befördert. Das Verbindungsstück zwischen der Hohlvene und der Pulmonalarterie ist ein nicht kontraktile Tunnel aus Kunststoff. Durch den passiven Fluss staut sich das Blut in das zentralvenöse System zurück. Zudem ist der alleinige Systemventrikel durch das erhöhte Volumen überlastet. Die Langzeitprognose der Patienten ist durch zahlreiche Folgekomplikationen weiterhin schlecht. Ein tunnelförmiges Konstrukt aus künstlichem Herzmuskelgewebe (EHT) könnte anstelle der Kunststoffprothese aktiv Kraft aufbringen und somit die Hämodynamik der Patienten deutlich verbessern. Die Herstellung von künstlichem Herzmuskelgewebe mit einer komplexen Struktur, wie einem tubulären Konstrukt, steht jedoch noch vor großen Herausforderungen. Bisher konnten nur kleine tubuläre Konstrukte mit einer dünnen Wand und einem kleinen Innendurchmesser hergestellt werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Formate für die Kultivierung von tubulären EHTs getestet. Für die Herstellung von EHTs wurden humane induzierte pluripotente Stammzell-abgeleitete Kardiomyozyten in eine Hydrogelmatrix eingebracht. Im ersten Teil wurden tubuläre EHTs in einem vertikal ausgerichteten Format um Silikonsäulen kultiviert. In diesem Format konnte keine Formstabilität erreicht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden EHTs in einer horizontalen Ausrichtung um einen Silikonschlauch unter pulsatilem Perfusion kultiviert. In diesem Format zeigten sich die EHTs formstabil (Länge: 1,5 cm) und konnten nach 21 Tagen in Kultur Druck gegen eine Wassersäule aufbringen (zirka 0,2 mmHg, max. 0,3 mmHg). Dieser Druck befand sich in einem klinisch nicht relevanten Bereich, war aber vergleichbar mit anderen Arbeiten zu tubulären EHTs. Zudem konnten die EHTs einem Berstdruck von mindestens 25 - 30 mmHg standhalten und folgten einer elektrischen Stimulation bis 2,75 Hz. Im Vergleich zu anderen Studien zeigten die hier generierten EHTs eine stabilere Struktur und einen großen Innendurchmesser (6 mm) mit hohen Wandstärke (zirka 1 mm). Dies könnte für eine potenzielle Implantation und Testung am Tiermodell von Vorteil sein. Morphologisch war ein größerer Anteil an Zellen unreif und nicht einheitlich angeordnet. Für zukünftige Studien müsste die Kontraktionskraft der EHTs weiter erhöht

werden, um einen Blutfluss zielgerichtet befördern zu können. Hierfür müssten vor allem die Reife und Ausrichtung der Zellen im Kulturformat optimiert werden.

8 Abstract

The aim of this work was to generate a functional and stable tubular heart construct. The background of this project relates to children with a congenital heart defect, called hypoplastic left heart syndrome (HLHS), in which important structures of the left ventricle are missing or hypoplastic. The most frequent therapy today is a palliative procedure called *Fontan* operation in which a univentricular circulation is created. The venous return coming from the systemic circulation is passively bypassing an actively pumping chamber and transported directly into the pulmonary arteries. The connection between the vena cava and the pulmonary artery is a non-contraction tunnel of synthetic material. Due to the passive flow, the blood backs up into the central venous system. In addition, the systemic ventricle is experiencing a volume overload. The long-term prognosis of these patients is still poor due to numerous subsequent complications. Instead of the synthetic prosthesis, a tunnel-shaped construct made of artificial heart tissue (EHT) could actively apply force and thus significantly improve the patient's hemodynamics. However, the production of artificial heart tissue with a complex structure, such as a tubular construct, still faces major challenges. Until now, only small tubular constructs with a thin wall and a small inner diameter could be produced. In the course of this work, different formats for the cultivation of EHT were tested. To produce EHT, human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes were incorporated into a hydrogel matrix and cultured under different conditions. In the first part of this work, tubular EHTs were cultured in a vertically oriented format around hollow silicone posts. In this format no dimensional stability could be achieved. In the second part of this work, EHTs were cultured in a horizontal orientation around a silicone tube under pulsatile perfusion. In this format, the EHTs were dimensionally stable (length: 1.5 cm). After 21 days in culture, they were able to generate pressure against a water column (approx. 0.2 mmHg, max. 0.3 mmHg) with active contraction. This pressure was in a clinically irrelevant range but comparable to other work on tubular EHTs. In addition, the EHTs could withstand a burst pressure of at least 30 mmHg and followed electrical stimulation up to 2.75 Hz. Furthermore, compared to other studies, a stable structure with a large inner diameter (6 mm) and a high wall thickness (zirka 1 mm) could be generated with this method. This could be advantageous for potential implantation and testing in an animal model. Morphologically, a larger proportion of cells were immature and not uniformly arranged. For future studies, contractile output of tubular EHTs needs to be increased to actively transport blood flow in a targeted manner. For this purpose, future approaches should focus on the optimization of the accomplished setting to improve maturity and alignment of cells within the EHT matrix.

9 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
%	Prozent
3D	Dreidimensional
A	Arteria, Arterie
AHF	Angeborene Herzfehler
ASD	Atriumseptumdefekt
AV	Atrioventrikular
B	Breite
BL	<i>Baseline</i> , Ausgangswert
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserum-Albumin
bspw	Beispielsweise
BTS	N-Benzyl-p-toluolsulfonamid
bzgl	Bezüglich
Ca	Kalzium
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EB	<i>Embroid body</i>
EC₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i> , künstliches Herzmuskelgewebe
Engl.	Englisch
ESC	<i>Embryonic stem cell</i> , embryonale Stammzelle
et al	et alii, und andere
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> , Fetales Kälberserum
FDAR	<i>Frequency dependent acceleration of relaxation</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factors</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
FTDA	bFGF-, TGF-β1-, Dorsomorphin- und Aktivin-A-basiertes Zellkulturmedium
g-force	<i>Gravitational force equivalent</i> , Schwerkraft-Äquivalent
ggf	Gegebenenfalls
h	Stunde(n)
H	Höhe
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
hESC	<i>Human embryonic stem cell</i> , humane embryonale Stammzelle
hiPSC	<i>Human induced pluripotent stem cell</i> , humane pluripotente Stammzelle
HLHS	<i>Hypoplastic left heart syndrome</i> , Hypoplastisches Linksherzsyndrom
HSA	<i>Human serum albumin</i> , Humanes Serumalbumin
Hz	Hertz
ID	Innendurchmesser
IF	Immunfluoreszenz
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor

iPSC	<i>Induced pluripotent stem cell</i> , induzierte pluripotente Stammzelle
KMs	Kardiomyozyten
L	Länge
max	Maximal
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
min	Minute(n)
mind	Mindestens
MKH	<i>Modified Krebs-Henseleit</i>
ml	Milliliter
MLC2a	<i>Myosin regulatory light chain 2, atrial isoform</i>
MLC2v	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular isoform</i>
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mN	Millinewton
ms	Millisekunden
MYH	<i>Myosin heavy chain</i>
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
nmol	Nanomol
O₂	Sauerstoff
o.g.	Oben genannt
Oct3/4	<i>Octamer-binding transcription factor 3/4</i>
PAVM	Pulmonale arteriovenöse Malformationen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphate-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Paraformaldehyd
PTFE	Polytetrafluorethylen
RH	<i>Relative humidity</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur (22°C)
RT	<i>Relaxation time</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SSEA3	<i>Stage-specific embryonic antigen 3</i>
sek	Sekunde(n)
sog.	So genannt
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCPC	<i>Total cavopulmonary connection</i> , Totale cavopulmonale Anastomose
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	<i>Time to peak</i>
T-Tubulus	Transversal-Tubulus
U	<i>Unit(s)</i> , Einheit(en)
V	Vena, Vene
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VAD	<i>Ventricular assist device</i> , ventrikuläres Herzunterstützungssystem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer Wachstumsfaktor
vs	Versus

WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
WNT	<i>Wingless-related integration site</i>
WS	Wandstärke

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutzirkulation im adulten gesunden menschlichen Herz.....	6
Abbildung 2: Druck-Volumen Diagramm während einer Herzaktion.....	7
Abbildung 3: Das hypoplastische Linksherzsyndrom.	9
Abbildung 4: Die Fontan-Operation am HLHS.	10
Abbildung 5: Reprogrammierung von iPSCs.....	15
Abbildung 6: Ziel des Projekts.	21
Abbildung 7: Gussystem von tubulären EHTs im 6-Wellformat.	31
Abbildung 8: Herstellung von Silikonschläuchen.....	32
Abbildung 9: Gussformat für Patch-EHTs.....	34
Abbildung 10: Kulturformat für tubuläre EHTs in einem pulsatilen Perfusionssystem.....	36
Abbildung 11: Perfusionsschlauch aus Silikon.....	38
Abbildung 12: Tubuläres EHT im Organbad.	42
Abbildung 13: Aufbau des Systems zur Testung der Compliance des Perfusionsschlauchs.	44
Abbildung 14: Aufbau des Systems zur Testung des Drucks, der durch den Pumpfluss von <i>luminal</i> auf das Gewebe wirkt.	45
Abbildung 15: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs in einem 6-Wellformat.	47
Abbildung 16: Histologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat kultiviert wurden; verschiedene Wandstärken.....	48
Abbildung 17: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat kultiviert wurden.	49
Abbildung 18: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat unter dynamischen und statischen Bedingungen kultiviert wurden.	49
Abbildung 19: Histologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat kultiviert wurden; verschiedene Kulturbedingungen.....	50
Abbildung 20: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat unter dynamischen und statischen Bedingungen kultiviert wurden.	51
Abbildung 21: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs, die im 6-Wellformat für das Stapeln von EHTs vorkultiviert wurden.	52
Abbildung 22: Stapelschritt von EHTs, die in einem 6-Wellformat kultiviert wurden.	52
Abbildung 23: Pulsatiles Perfusionssystem.	53
Abbildung 24: Perfusionssystem aus Silikon.....	53
Abbildung 25: Herstellung von tubulären EHTs aus Patch-EHTs.....	54
Abbildung 26: Morphologische Darstellung von ersten Versuchen mit tubuläre EHTs im Gussformat.....	55
Abbildung 27: Darstellung von vier verschiedenen Silikonschlauchmodellen.....	56
Abbildung 28: Morphologische Darstellung von tubulären EHTs, die mit verschiedenen Perfusionsschlauch-Modellen kultiviert wurden.	56
Abbildung 29: Morphologische Darstellung eines EHTs, das in einem pulsatilen Perfusionssystem kultiviert wurde.....	57
Abbildung 30: Tubuläre EHTs in einem pulsatilen Perfusionssystem.....	57
Abbildung 31: Histologische Darstellung von KMs in tubulären EHTs.....	58
Abbildung 32: Frequenzanalyse von tubulären EHTs.	59
Abbildung 33: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs mit einem video-optischen Messsystem.	60
Abbildung 34: Kontraktilitätsanalyse von tubulären EHTs, die in einem pulsatilen Perfusionssystem kultiviert wurden.....	61
Abbildung 35: Druckmessung von tubulären EHTs innerhalb des Perfusionsschlauchs.	61

Abbildung 36: System zur Messung der Compliance des Perfusionsschlauchs.....	62
Abbildung 37: Berstdruckmessung eines tubulären EHTs.	63
Abbildung 38: Tiermodelle zur Simulation einer Fontan-Zirkulation.	80

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hausintern hergestellte Medien.....	23
Tabelle 2: Hausintern hergestellte Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 3: PCR Mastermix für den Mykoplasma Test	27
Tabelle 4: PCR Mastermix für den Mykoplasma Test	27
Tabelle 5: Mastermix-Komponenten für tubuläre EHTs im 6-Wellformat.....	33
Tabelle 6: Mastermix-Komponenten für Patch-EHTs	35
Tabelle 7: Mastermix-Komponenten für Tubuläre EHTs in einer Perfusionskammer	35
Tabelle 8: Mastermix-Komponenten für das Thrombin-Fibrinogen-Gemisch.....	39
Tabelle 9: Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffin-Schnitten	40

12 Literaturverzeichnis

- Adachi I, Williams E, Jeewa A, et al (2016) Mechanically assisted Fontan completion: A new approach for the failing Glenn circulation due to isolated ventricular dysfunction. *J Hear Lung Transplant* 35:1380–1381. <https://doi.org/10.1016/J.HEALUN.2016.09.011>
- Albers EL, Bichell DP, McLaughlin B (2010) New approaches to neuroprotection in infant heart surgery. *Pediatr Res* 68:1–9. <https://doi.org/10.1203/PDR.0B013E3181DF5402>
- Allen KY, Downing TE, Glatz AC, et al (2017) Effect of Fontan-Associated Morbidities on Survival With Intact Fontan Circulation. *Am J Cardiol* 119:1866–1871. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2017.03.004>
- Alsoufi B, Mahle WT, Manlhiot C, et al (2016) Outcomes of heart transplantation in children with hypoplastic left heart syndrome previously palliated with the Norwood procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 151:167-175.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.09.081>
- Barron DJ, Kilby MD, Davies B, et al (2009) Hypoplastic left heart syndrome. *Lancet* 374:551–564. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60563-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60563-8)
- Batalov I, Feinberg AW (2015) Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture. *Biomark Insights* 10:71–76. <https://doi.org/10.4137/BMI.S20050>
- Bergmann O, Bhardwaj RDD, Bernard S, et al (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324:98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161:1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>
- Bhavsar SS, Kapadia JY, Chopski SG, Throckmorton AL (2009) Intravascular Mechanical Cavopulmonary Assistance for Patients With Failing Fontan Physiology. *Artif Organs* 33:977–987. <https://doi.org/10.1111/J.1525-1594.2009.00940.X>
- Biermann D, Eder A, Arndt F, et al (2016) Towards a tissue-engineered contractile fontan-conduit: The fate of cardiac myocytes in the subpulmonary circulation. *PLoS One* 11:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166963>
- Bird SD, Doevendans PA, Van Rooijen MA, et al (2003) The human adult cardiomyocyte phenotype. *Cardiovasc Res* 58:423–434. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00253-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00253-0)
- Bliley JM, Vermeer MCSC, Duffy RM, et al (2021) Dynamic loading of human engineered heart tissue enhances contractile function and drives a desmosome-linked disease phenotype. *Sci Transl Med* 13:. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd1817>
- Boron WF, Boulpaep EL (2000) *Textbook of Medical Physiology*, 10th edn. Saunders
- Breckwoldt K, Letuffe-Brenière D, Mannhardt I, et al (2017) Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. *Nat Protoc* 12:1177–1197. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.033>
- Bridges CR, Hammond RL, Dimeo F, et al (1989) Functional right-heart replacement with skeletal muscle ventricles. *Circulation* 80:III183-91
- Brown DA, Maclellan WR, Laks H, et al (2006) Analysis of Oxygen Transport in a Diffusion-Limited Model of Engineered Heart Tissue. *Biotechnol Bioeng* 97:962–75. <https://doi.org/10.1002/bit.21295>

- Carmeliet E (2019) Pacemaking in cardiac tissue. From IK2 to a coupled-clock system. *Physiol Rep* 7:. <https://doi.org/10.14814/PHY2.13862>
- Carrier RL, Rupnick M, Langer R, et al (2002) Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue Eng* 8:175–188. <https://doi.org/10.1089/107632702753724950>
- Chachques JC, Grandjean P, Serraf A, et al (1990) Atrial cardiomyoplasty after Fontan-type procedures. *Circulation* 82:IV183-9
- Chong JJH, Yang X, Don CW, et al (2014) Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts. *Nature* 510:273. <https://doi.org/10.1038/NATURE13233>
- Chopski SG, Rangus OM, Downs EA, et al (2015) Three-Dimensional Laser Flow Measurements of a Patient-Specific Fontan Physiology With Mechanical Circulatory Assistance. *Artif Organs* 39:E67–E78. <https://doi.org/10.1111/AOR.12426>
- Christ T, Rozmaritsa N, Engel A, et al (2014) Arrhythmias, elicited by catecholamines and serotonin, vanish in human chronic atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:11193–11198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324132111>
- Davies RR, Bano M, Butts RJ, et al (2019) Donor organ turn-downs and outcomes after listing for pediatric heart transplant. *J Hear Lung Transplant* 38:241–251. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2018.09.026>
- De Leval MR (1998) The Fontan Circulation: What Have We Learned? What to Expect? *Pediatr Cardiol* 19:316–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002469900315>
- De Leval MR (2005) The Fontan circulation: a challenge to William Harvey? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2:202–208. <https://doi.org/10.1038/NCPCARDIO0157>
- De Leval MR, Kilner P, Gewillig M, Bull C (1988) Total cavopulmonary connection: A logical alternative to atriopulmonary connection for complex Fontan operations: Experimental studies and early clinical experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 96:682–695. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)35174-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)35174-8)
- De los Reyes V AA (2015) Dynamics of a cardiovascular model obtaining measurable pulsatile pressure output. *UK World J Model Simul* 1:20–32
- Demtröder W (2008) *Experimentalphysik 1*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Denning C, Borgdorff V, Crutchley J, et al (2016) Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: From laboratory curiosity to industrial biomedical platform. *Biochim Biophys Acta* 1863:1728–1748. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2015.10.014>
- Di Molfetta A, Amodeo A, Fresiello L, et al (2015) Simulation of Ventricular, Cavo-Pulmonary, and Biventricular Ventricular Assist Devices in Failing Fontan. *Artif Organs* 39:550–558. <https://doi.org/10.1111/AOR.12434>
- Driscoll DJ, Offord KP, Feldt RH, et al (1992) Five- to fifteen-year follow-up after Fontan operation. *Circulation* 85:469–496. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.85.2.469>
- Duan B, Hockaday LA, Kang KH, Butcher JT (2013) 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res - Part A* 101 A:1255–1264. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34420>
- Dunn KK, Reichardt IM, Simmons AD, et al (2019) Coculture of Endothelial Cells with Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Reveals a Differentiation Stage-Specific Enhancement of Cardiomyocyte Maturation. *Biotechnol J* 14:.

- <https://doi.org/10.1002/biot.201800725>
- Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al (2017) Cardiomyocyte regeneration: A consensus statement. *Circulation* 136:680–686.
<https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.8.9240969>
- Ferrer-Barba A, Gonzalez-Rivera I, Bautista-Hernandez V (2016) Pulmonary Vasodilators in the Management of Low Cardiac Output Syndrome After Pediatric Cardiac Surgery. *Curr Vasc Pharmacol* 14:37–47. <https://doi.org/10.2174/1570161113666151014125314>
- 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.
<https://doi.org/10.1096/fasebj.14.5.669>
- Fontan F, Baudet E (1971) Surgical repair of tricuspid atresia. *Thorax* 26:240–248.
<https://doi.org/10.1136/THX.26.3.240>
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:348–362.
<https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Gelb B, Brueckner M, Chung W, et al (2013) The Congenital Heart Disease Genetic Network Study: rationale, design, and early results. *Circ Res* 112:698–706.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300297>
- Gewillig M (2005) The Fontan circulation. *Heart* 91:839–846.
<https://doi.org/10.1136/hrt.2004.051789>
- Gewillig M, Brown SC, Eyskens B, et al (2010) The Fontan circulation: who controls cardiac output? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 10:428–433.
<https://doi.org/10.1510/icvts.2009.218594>
- Ghorbel MT, Jia H, Swim MM, et al (2019) Reconstruction of the pulmonary artery by a novel biodegradable conduit engineered with perinatal stem cell-derived vascular smooth muscle cells enables physiological vascular growth in a large animal model of congenital heart disease. *Biomaterials* 217:119284.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119284>
- Gilboa SM et al (2010) Mortality resulting from congenital heart disease among children and adults in the United States, 1999 to 2006. *Circulation* 122:2254–2263.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.947002>
- Gottshall KR, Hunter JJ, Tanaka N, et al (1997) Ras-dependent pathways induce obstructive hypertrophy in echo-selected transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 94:4710–4715.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.94.9.4710>
- Haller JA, Adkins JC, Worthington M, Rauenhorst J (1966) Experimental studies on permanent bypass of the right heart. *Surgery* 59:1128–1132
- Haneda K, Konnai T, Sato N, et al (1993) Acute hemodynamic changes after Fontan operation: an experimental study. *Tohoku J Exp Med* 169:113–119.
<https://doi.org/10.1620/TJEM.169.113>
- Hansen A, Eder A, Bönstrup M, et al (2010) Development of a drug screening platform based

- on engineered heart tissue. *Circ Res* 107:35–44.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211458>
- Haq FU, Jalil F, Hashmi SK, et al (2011) Risk factors predisposing to congenital heart defects. *Ann Pediatr Cardiol* 4:117. <https://doi.org/10.4103/0974-2069.84641>
- Hasenfuss G, Just H (1994) Myocardial phenotype changes in heart failure: Cellular and subcellular adaptations and their functional significance. *Heart* 72:.
https://doi.org/10.1136/hrt.72.2_Suppl.S10
- Henaine R, Vergnat M, Bacha EA, et al (2013a) Effects of lack of pulsatility on pulmonary endothelial function in the Fontan circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 146:522–529.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.11.031>
- Henaine R, Vergnat M, Mercier O, et al (2013b) Hemodynamics and arteriovenous malformations in cavopulmonary anastomosis: The case for residual antegrade pulsatile flow. *J Thorac Cardiovasc Surg* 146:1359–1365.
<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.02.036>
- Hieb B, Müller C, Jung F, et al (2009) Macro- and micromorphometric studies of the vascular structures from the Göttingen® minipig. *Appl Cardiopulm Pathophysiol* 13:318–321
- Hirt MN, Boeddinghaus J, Mitchell A, et al (2014a) Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 74:151–161. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.009>
- Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T (2014b) Cardiac tissue engineering : State of the art. *Circ Res* 114:354–367. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300522>
- Hoffman JIE, Kaplan S (2002) The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 39:1890–1900. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01886-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01886-7)
- Hoffman JIE, Kaplan S, Liberthson RR (2004) Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J* 147:425–439. <https://doi.org/10.1016/J.AHJ.2003.05.003>
- Iorga B, Schwanke K, Weber N, et al (2018) Differences in contractile function of myofibrils within human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes vs. Adult ventricular myofibrils are related to distinct sarcomeric protein isoforms. *Front Physiol* 8:.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01111>
- Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, et al (2007) Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: Current knowledge - A scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young. *Circulation* 115:2995–3014. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.183216>
- Jin G, He R, Sha B, et al (2018) Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C* 92:995–1005.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.065>
- Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, et al (2001) Fibrin gel – advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardio-Thoracic Surg* 19:424–430.
[https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(01\)00624-8](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(01)00624-8)
- Kaku K, Matsuda H, Kaneko M, et al (1990) Experimental complete right heart bypass. Proposal of a new model and acute hemodynamic assessment with vasoactive drugs in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 99:161–166. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(19\)35646-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(19)35646-6)
- Kanakakis MA, Mitropoulos FA, Katsimpoulas M, et al (2011) Experimentally modified Fontan

- circulation in an adolescent pig model without the use of cardiopulmonary bypass. *Med Sci Monit* 17:BR10. <https://doi.org/10.12659/MSM.881319>
- Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, et al (2020) Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol* 17:341–359. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>
- Katz AM (2002) Maladaptive growth in the failing heart: The cardiomyopathy of overload. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 16:245–249
- Kelly RG, Buckingham ME, Moorman AF (2014) Heart Fields and Cardiac Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4:. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A015750>
- Khairy P, Fernandes SM, Mayer JE, et al (2008) Long-term survival, modes of death, and predictors of mortality in patients with Fontan surgery. *Circulation* 117:85–92. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.738559>
- Khairy P, Poirier N, Mercier LA (2007) Univentricular heart. *Circulation* 115:800–812. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.592378>
- Ko JM (2015) Genetic Syndromes associated with Congenital Heart Disease. *Korean Circ J* 45:357. <https://doi.org/10.4070/KCJ.2015.45.5.357>
- Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS, et al (2010) Fibrin-poly lactide-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials* 31:4731–4739. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.051>
- Köhne M, Behrens CS, Stüdemann T, et al (2022) A potential future Fontan modification: preliminary in vitro data of a pressure-generating tube from engineered heart tissue. *Eur J Cardiothorac Surg* 1–8. <https://doi.org/10.1093/EJCTS/EZAC111>
- Kubo H, Shimizu T, Yamato M, et al (2007) Creation of myocardial tubes using cardiomyocyte sheets and an in vitro cell sheet-wrapping device. *Biomaterials* 28:3508–3516. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.016>
- Kupfer ME, Lin W-HH, Ravikumar V, et al (2020) In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid. *Circ Res* 127:207–224. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316155>
- Lacour-Gayet FG, Lanning CJ, Stoica S, et al (2009) An Artificial Right Ventricle for Failing Fontan: In Vitro and Computational Study. *Ann Thorac Surg* 88:170–176. <https://doi.org/10.1016/J.ATHORACSUR.2009.03.091>
- Laflamme MA, Murry CE (2011) Heart regeneration. *Nat* 2011 4737347 473:326–335. <https://doi.org/10.1038/nature10147>
- Laurila E, Ahola A, Hyttinen J, Aalto-Setälä K (2016) Methods for in vitro functional analysis of iPSC derived cardiomyocytes - Special focus on analyzing the mechanical beating behavior. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1863:1864–1872
- Lee A, Hudson AR, Shiowski DJ, et al (2019) 3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart. *Science (80-)* 365:482–487. <https://doi.org/10.1126/science.aav9051>
- Lemoine MD, Mannhardt I, Breckwoldt K, et al (2017) Human iPSC-derived cardiomyocytes cultured in 3D engineered heart tissue show physiological upstroke velocity and sodium current density. *Sci Rep* 7:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05600-w>
- Li F, Wang X, Capasso JM, Gerdes AM (1996) Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol* 28:1737–

1746. <https://doi.org/10.1006/JMCC.1996.0163>
- Li X, Sun Q, Li Q, et al (2018) Functional hydrogels with tunable structures and properties for tissue engineering applications. *Front. Chem.* 6:499
- Li Y, Asfour H, Bursac N (2017) Age-dependent functional crosstalk between cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in a 3D engineered cardiac tissue. *Acta Biomater* 55:120–130. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.027>
- Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al (2012) Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci* 109:E1848–E1857. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1200250109>
- Lieu DK, Liu J, Siu CW, et al (2009) Absence of Transverse Tubules Contributes to Non-Uniform Ca²⁺ Wavefronts in Mouse and Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cells Dev* 18:1493. <https://doi.org/10.1089/SCD.2009.0052>
- Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, et al (2018) Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 314:H812–H838. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00335.2017>
- Lindsey SE, Butcher JT, Yalcin HC (2014) Mechanical regulation of cardiac development. *Front. Physiol.* 5:1–15
- Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA (2013) Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22:1991–2002. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0490>
- Lynge TH, Jeppesen AG, Winkel BG, et al (2018) Nationwide Study of Sudden Cardiac Death in People with Congenital Heart Defects Aged 0 to 35 Years. *Circ Arrhythmia Electrophysiol* 11:1–11. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.117.005757>
- Macé L, Dervanian P, Bourriez A, et al (2000) Changes in venous return parameters associated with univentricular Fontan circulations. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 279:. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.279.5.h2335>
- Macqueen LA, Sheehy SP, Chantre CO, et al (2018) A tissue-engineered scale model of the heart ventricle. *Nat Biomed Eng* 2:930–941. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0271-5>
- Mahle WT, Newburger JW, Matherne GP, et al (2009) Role of pulse oximetry in examining newborns for congenital heart disease: a scientific statement from the AHA and AAP. *Pediatrics* 124:823–836. <https://doi.org/10.1542/PEDS.2009-1397>
- Mai CT, Isenburg JL, Canfield MA, et al (2019) National population-based estimates for major birth defects, 2010-2014. *Birth defects Res* 111:1420–1435. <https://doi.org/10.1002/BDR2.1589>
- Mannhardt I (2016) Human Engineered Heart Tissue: Analysis of Contractile Force. *Stem Cell Reports* 6:914–925. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.013>
- Mannhardt I, Breckwoldt K, Letuffe-Brenière D, et al (2016) Human Engineered Heart Tissue: Analysis of Contractile Force. *Stem Cell Reports* 7:29–42. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.011>
- Mannhardt I, Eder A, Dumotier B, et al (2017) Blinded contractility analysis in hiPSC-cardiomyocytes in engineered heart tissue format: Comparison with human atrial trabeculae. *Toxicol Sci* 158:164–175. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx081>
- Mannhardt I, Saleem U, Mosqueira D, et al (2020) Comparison of 10 Control hPSC Lines for Drug Screening in an Engineered Heart Tissue Format. *Stem cell reports* 15:983–998.

<https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2020.09.002>

- Marelli AJ, Mackie AS, Ionescu-Iltu R, et al (2007) Congenital heart disease in the general population: changing prevalence and age distribution. *Circulation* 115:163–172. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.627224>
- Marianeschi SM, McElhinney DB, Reddy VM (1998) Pulmonary arteriovenous malformations in and out of the setting of congenital heart disease. In: *Annals of Thoracic Surgery*. Elsevier, pp 688–691
- Matsuda H, Kawashima Y, Takano H, et al (1981) Experimental evaluation of atrial function in right atrium - pulmonary artery conduit operation for tricuspid atresia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 81:762–767. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(19\)39459-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(19)39459-0)
- Matsuda T, Takahashi K, Nariai T, et al (2004) N-cadherin-mediated cell adhesion determines the plasticity for cell alignment in response to mechanical stretch in cultured cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 326:228–232. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.019>
- Mavroudis C, Baker C (2013) *Pediatric cardiac surgery*, 4th edn. Wiley Blackwell
- Menon S, Chennapragada M, Ugaki S, et al (2017) The Lymphatic Circulation in Adaptations to the Fontan Circulation. *Pediatr Cardiol* 38:886–892. <https://doi.org/10.1007/s00246-017-1576-y>
- Miura T, Hiramatsu T, Forbess JM, Mayer JE (1995) Effects of elevated coronary sinus pressure on coronary blood flow and left ventricular function: Implications after the Fontan operation. *Circulation* 92:. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.9.298>
- Mollova M, Bersell K, Walsh S, et al (2013) Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:1446–1451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214608110>
- Monnet E, Orton EC, Jacobs G, Metelman L (1998) Fluoroscopic Determination of Latissimus Dorsi Muscle Shortening Fraction after Dynamic Cardiomyoplasty. *Pacing Clin Electrophysiol* 21:1741–1746. <https://doi.org/10.1111/J.1540-8159.1998.TB00273.X>
- Moretti A, Bellin M, Welling A, et al (2010) Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *N Engl J Med* 363:1397–1409. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0908679>
- Motta SE, Lintas V, Fioretta ES, et al (2019) Human cell-derived tissue-engineered heart valve with integrated Valsalva sinuses: towards native-like transcatheter pulmonary valve replacements. *npj Regen Med* 4:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41536-019-0077-4>
- Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile Properties of Small Arterial Resistance Vessels in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Circ Res* 41:19–26. <https://doi.org/10.1161/01.res.41.1.19>
- Naito H, Melnychenko I, Didié M, et al (2006) Optimizing Engineered Heart Tissue for Therapeutic Applications as Surrogate Heart Muscle. *Circulation* 114:72–78. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001560>
- Newburger, J. W., Sleeper LA et al (2018) Transplant-Free Survival and Interventions at 6 Years in the Single Ventricle Reconstruction Trial. *Circulation* 137:2246–2253. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029375>
- Nguyen MD, Tinney JP, Yuan F, et al (2013) Cardiac cell culture model as a left ventricle mimic for cardiac tissue generation. *Anal Chem* 85:8773–8779.

<https://doi.org/10.1021/ac401910d>

- Nieminen HP, Jokinen E V., Sairanen HI (2007) Causes of Late Deaths After Pediatric Cardiac Surgery: A Population-Based Study. *J Am Coll Cardiol* 50:1263–1271. <https://doi.org/10.1016/J.JACC.2007.05.040>
- Noor N, Shapira A, Edri R, et al (2019) 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Adv Sci* 6:1–10. <https://doi.org/10.1002/advs.201900344>
- Nordmeyer S, Rohder M, Nordmeyer J, et al (2017) Systemic right ventricular morphology in the early postoperative course after extracardiac Fontan operation: Is there still a need for special care? *Eur J Cardio-thoracic Surg* 51:483–489. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezw374>
- Nunes SS, Miklas JW, Liu J, et al (2013) Biowire: A platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 10:781–787. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2524>
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, et al (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* Vol 14:. <https://doi.org/10.1038/nm1684>
- Pace ND, Oster ME, Forestieri NE, et al (2018) Sociodemographic Factors and Survival of Infants With Congenital Heart Defects. *Pediatrics* 142:. <https://doi.org/10.1542/PEDS.2018-0302>
- Park J, Anderson CW, Sewanan LR, et al (2020) Modular design of a tissue engineered pulsatile conduit using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Acta Biomater* 102:220–230. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.10.019>
- Porter GA, Hom JR, Hoffman DL, et al (2011) Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. *Prog Pediatr Cardiol* 31:75. <https://doi.org/10.1016/J.PPEDCARD.2011.02.002>
- Prêtre R, Häussler A, Bettex D, Genoni M (2008) Right-Sided Univentricular Cardiac Assistance in a Failing Fontan Circulation. *Ann Thorac Surg* 86:1018–1020. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.03.003>
- Prondzynski M, Lemoine MD, Zech AT, et al (2019) Disease modeling of a mutation in α -actinin 2 guides clinical therapy in hypertrophic cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* 11:e11115. <https://doi.org/10.15252/emmm.201911115>
- Querdel E, Reinsch M, Castro L, et al (2021) Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner. *Circulation* 143:1991–2006. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047904>
- Redington AN (2014) Low cardiac output due to acute right ventricular dysfunction and cardiopulmonary interactions in congenital heart disease (2013 Grover conference series). *Pulm Circ* 4:191–199. <https://doi.org/10.1086/675982>
- Rodefeld MD, Boyd JH, Myers CD, et al (2003) Cavopulmonary assist: circulatory support for the univentricular fontan circulation. *Ann Thorac Surg* 76:1911–1916. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(03\)01014-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(03)01014-2)
- Rodefeld MD, Coats B, Fisher T, et al (2010) Cavopulmonary assist for the univentricular Fontan circulation: von Kármán viscous impeller pump. *J Thorac Cardiovasc Surg* 140:529–536. <https://doi.org/10.1016/J.JTCVS.2010.04.037>
- Romagnuolo R, Masoudpour H, Porta-Sánchez A, et al (2019) Human Embryonic Stem Cell-

- Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem Cell Reports* 12:967–981
- Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, et al (2018) Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 556:239–243. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0016-3>
- Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, et al (2001) Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med* 345:1435–1443. <https://doi.org/10.1056/NEJM0A012175>
- Rossano JW, Goldberg DJ, Fuller S, et al (2014) Successful Use of the Total Artificial Heart in the Failing Fontan Circulation. *Ann Thorac Surg* 97:1438–1440. <https://doi.org/10.1016/J.ATHORACSUR.2013.06.120>
- Ruan JL, Tulloch NL, Razumova M V., et al (2016) Mechanical Stress Conditioning and Electrical Stimulation Promote Contractility and Force Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Human Cardiac Tissue. *Circulation* 134:1557–1567. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014998>
- Saleem U, Meer BJV, Katili PA, et al (2020) Blinded, Multicenter Evaluation of Drug-induced Changes in Contractility Using Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes. *Toxicol Sci* 176:103–123. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfaa058>
- Samanek M (1992) Children with Congenital Heart Disease: Probability of Natural Survival. *Pediatr Cardiol* 13:152–158. <https://doi.org/10.1007/BF00793947>
- Schaaf S, Eder A, Vollert I, et al (2014) Generation of strip-format fibrin-based engineered heart tissue (EHT). *Methods Mol Biol* 1181:121–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1047-2_11
- Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K, et al (2013) In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun* 4:1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms2406>
- Sekine H, Shimizu T, Yang J, et al (2006) Pulsatile myocardial tubes fabricated with cell sheet engineering. *Circulation* 114:87–93. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000273>
- Seldinger SI (1953) Catheter replacement of the needle in percutaneous arteriography. *Acta radiol* 39:368–376. <https://doi.org/10.2214/ajr.142.1.5>
- Seta H, Matsuura K, Sekine H, et al (2017) Tubular Cardiac Tissues Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Generate Pulse Pressure in Vivo. *Sci Rep* 7:. <https://doi.org/10.1038/srep45499>
- Shiba Y, Fernandes S, Zhu W-Z, et al (2012) Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489:322–325. <https://doi.org/10.1038/nature11317>
- Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, et al (2016) Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538:388–391. <https://doi.org/10.1038/nature19815>
- Siedner S, Krüger M, Schroeter M, et al (2003) Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. *J Physiol* 548:493–505. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.036509>
- Sifrim A, Hitz MP, Wilsdon A, et al (2016) Distinct genetic architectures for syndromic and

- nonsyndromic congenital heart defects identified by exome sequencing. *Nat Genet* 48:1060–1065. <https://doi.org/10.1038/NG.3627>
- Sizarov A, Ya J, De Boer BA, et al (2011) Formation of the building plan of the human heart: Morphogenesis, growth, and differentiation. *Circulation* 123:1125–1135. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.980607>
- Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, et al (2009) Advanced Heart Failure Treated with Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Abstract. *N Engl J Med* 17:2241–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909938>
- Snir M, Kehat I, Gepstein A, et al (2003) Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:. <https://doi.org/10.1152/AJPHEART.00020.2003>
- Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R (2019) *Physiologie: Das Lehrbuch*, 7th edn. Urban & Fischer (Elsevier)
- Starnes SL, Duncan BW, Fraga CH, et al (2002) Rat model of pulmonary arteriovenous malformations after right superior cavopulmonary anastomosis. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 283:2151–2156. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00368.2002>
- Sutherland FJ, Shattock MJ, Baker KE, Hearse DJ (2003) Mouse isolated perfused heart: Characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:867–878. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03925.x>
- Szabó G, Buhmann V, Graf A, et al (2003) Ventricular energetics after the Fontan operation: contractility-afterload mismatch. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125:1061–1069. <https://doi.org/10.1067/MTC.2003.405>
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131:861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Tonge PD, Corso AJ, Monetti C, et al (2014) Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature* 516:192–197. <https://doi.org/10.1038/NATURE14047>
- Tsuruyama S, Matsuura K, Sakaguchi K, Shimizu T (2019) Pulsatile tubular cardiac tissues fabricated by wrapping human iPS cells-derived cardiomyocyte sheets. *Regen Ther* 11:297–305. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.09.001>
- Tulloch NL, Muskheli V, Razumova M V., et al (2011) Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture. *Circ Res* 109:47–59. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.237206>
- Valdovinos J, Shkolyar E, Carman GP, Levi DS (2014) In Vitro Evaluation of an External Compression Device for Fontan Mechanical Assistance. *Artif Organs* 38:199–207. https://doi.org/inflatable_balloon_cuff
- Valeske K, Yerebakan C, Mueller M, Akintuerk H (2014) Urgent implantation of the Berlin Heart Excor biventricular assist device as a total artificial heart in a patient with single ventricle circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147:1712–1714. <https://doi.org/10.1016/J.JTCVS.2014.01.012>
- Van Puyvelde J, Rega F, Minami T, et al (2019) Creation of the Fontan circulation in sheep: a survival model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivz022>

- Vandenburgh HH, Solerssi R, Shansky J, et al (1995) Response of neonatal rat cardiomyocytes to repetitive mechanical stimulation in vitro. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Ann N Y Acad Sci, pp 19–29
- Vollert I, Seiffert M, Bachmair J, et al (2014) In vitro perfusion of engineered heart tissue through endothelialized channels. *Tissue Eng - Part A* 20:854–863. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0214>
- Von Bornstädt D, Wang H, Paulsen MJ, et al (2018) Rapid Self-Assembly of Bioengineered Cardiovascular Bypass Grafts From Scaffold-Stabilized, Tubular Bilevel Cell Sheets. *Circulation* 138:2130–2144. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035231>
- Voss B, Sack FU, Saggau W, et al (2002) Atrial cardiomyoplasty in an experimental “Fontan circulation.” *Eur J Cardio-Thoracic Surg* 21:780–786. <https://doi.org/10.1007/s00398-003-0388-y>
- Wang D, Plunkett M, Gao G, et al (2014) A practical and less invasive total cavopulmonary connection sheep model. *ASAIO J* 60:178–182. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000040>
- Wang L, Wu Y, Hu T, et al (2017) Electrospun conductive nanofibrous scaffolds for engineering cardiac tissue and 3D bioactuators. *Acta Biomater* 59:68–81. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.036>
- Waqas M, Cowger JA (2016) Role of Durable Mechanical Circulatory Support for the Management of Advanced Heart Failure. *Heart Fail Clin* 12:399–409. <https://doi.org/10.1016/J.HFC.2016.03.012>
- 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. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8781>
- Weinstein S, Bello R, Pizarro C, et al (2014) The use of the Berlin Heart EXCOR in patients with functional single ventricle. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147:697–705. <https://doi.org/10.1016/J.JTCVS.2013.10.030>
- Wettwer E, Hála O, Christ T, et al (2004) Role of IKur in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: Influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 110:2299–2306. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000145155.60288.71>
- Wolf F, Rojas González DM, Steinseifer U, et al (2018) VascuTrainer: A Mobile and Disposable Bioreactor System for the Conditioning of Tissue-Engineered Vascular Grafts. *Ann Biomed Eng* 46:616–626. <https://doi.org/10.1007/s10439-018-1977-y>
- Yamada A, Shiraishi Y, Miura H, et al (2015) Development of a thermodynamic control system for the Fontan circulation pulsation device using shape memory alloy fibers. *J Artif Organs* 18:199–205. <https://doi.org/10.1007/S10047-015-0827-Z/FIGURES/6>
- Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704–712. <https://doi.org/10.1038/NATURE09229>
- Yang CK, Jang WS, Choi ES, et al (2014a) The Clinical Outcomes of Damus-Kaye-Stansel Procedure According to Surgical Technique. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg* 47:344. <https://doi.org/10.5090/KJTCS.2014.47.4.344>
- Yang X, Pabon L, Murry CE (2014b) Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 114:511–523. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>

- Yiangou L, Grandy RA, Morell CM, et al (2019) Method to Synchronize Cell Cycle of Human Pluripotent Stem Cells without Affecting Their Fundamental Characteristics. *Stem Cell Reports* 12:165–179. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.020>
- Yildirim Y, Naito H, Didié M, et al (2007) Development of a biological ventricular assist device: Preliminary data from a small animal model. *Circulation* 116:16–23. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.679688>
- Zhang J, Tao R, Campbell KF, et al (2019) Functional cardiac fibroblasts derived from human pluripotent stem cells via second heart field progenitors. *Nat Commun* 10:1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09831-5>
- Zhao XY, Li W, Lv Z, et al (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nat* 2009 4617260 461:86–90. <https://doi.org/10.1038/nature08267>
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, et al (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68:106–114. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000405\)68:1<106::AID-BIT13>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1<106::AID-BIT13>3.0.CO;2-3)
- Zimmermann WH, 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. <https://doi.org/10.1038/nm1394>

13 Geräte und Materialien

13.1 Geräte

Accu-jetR pro	Brand
A-D converter	ADInstruments, ML 826 Powerlab 2/26
Analytic scale Genius	Sartorius AG
Brückenverstärker	npi electronic, BA 1S/BA-01X
Blutglucosemessgerät	Bayer, Contour XT
Brückenmessverstärker	FMI GmbH, MIO 0501
Catheter FTH-1212B-4518	Transonic Scisense
CASY Cell Counter	Schärfe System
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories
Combispin FVL-2400N mit Vortex Funktion	PeqLab
EF600 Cell Freezer	Asymptote
FACS Canto II Flow Cytometer	BD Biosciences
Hybridisierungsöfen	Appligene
Inkubatoren für die Zellkultur	
CB 220	Binder
HERAcell 150i	Thermo Fisher Scientific
HERAcell 240	Thermo Fisher Scientific
MCO-19M	Sanyo
MCO-20AIC	Sanyo
Lamp KL-1500	Schott
Magnetplatte Variomag/ Cimarec Biosystem 4 Direct	Thermo Scientific
Magnetische Heizplatte IKA Combimag RET	Janke & Kunkel GmbH & Co KG
Mikroskope	
Axioskop 2 + AxioCam color camera	Zeiss
EVOS FL Cell Imaging System	Advanced Microscopy Group
LSM 800 Airyscan	Zeiss
SZ61 SZ-STB1	Olympus
Stemi SV6	Zeiss
T1-SM Nikon Eclipse TS100	Nikon
NanoZoomer	Hamamatsu
nCounter SPRINT™ Profiler	NanoString
Netzteil	peqlab, EV243
pH Meter, digital	Mettler Toledo
Pipette 10/100/1000 µL	Eppendorf, Peqlab
Pipetus	Hirschmann
Pre-amp headstage	npi electronic
Pressure Transducer	FMI GmbH, TBD-1222
Pressure-volume box	Transonic Scisense, FY097B

Radiometer	ABL90 Flex
S88X dual output square pulse stimulator	Grass
Scale EK-4000H	AND
Scale Ohaus Precision Advanced	Ohaus
Stimulator C Type 224	Hugo Sachs Elektronik
Sterile Zellkulturbänke	
BSB 41	Gelaire
HeraSafe	Heraeus
Security working hood HERAsafeR	Thermo Fisher Scientific
Video-optical force analysis system ("white box")	EHT technologies GmbH, Hamburg, A0001
Vortex Reax 2000	Heidolph
Vortex VF2	Janke & Kunkel GmbH & Co KG
Wärmeofen (60°C)	Heraeus Instruments
Wärmeschrank aus Plexiglas 37 °C	Eigenherstellung am UKE, Hamburg
Water bath	GFL
Water bath 2590	Medax
Zentrifugen	
5415 R	Eppendorf
5424 R	Eppendorf
5810 R	Eppendorf
Avanti JXN-26	Beckmann-Coulter
Labofuge 400R	Heraeus
Multifuge X3R	Heraeus
Rotanta/RP	Hettich

13.2 Software

AxioVision Rel. 4.8.2	Zeiss
BioRender	BioRender
Chart5.5.6™	AD Instruments
Excel	Microsoft
FACSDiva	BD Biosciences
FlowJo V10	BD Biosciences
ImageJ	NIH
Inkscape	Inkscape Community
Labscribe2	Transonic Scisense
nCounter CNV Collector Tool	Nanostring
NDP.view2	Hamamatsu Photonics
Prism 9.0	GraphPad Software
ZEN 2012	Zeiss

13.3 Materialien

10 mL Serologische Pipette; Wide Tip Stripette	Corning, 4492
12-Wellplatten	Thermo Fisher Scientific, 150628
15 mL Tubes	GreinerBio-one, 188271
15 mL Tubes, rote Kappe	Sarstedt, 62.554.502
2.0 mm Edelstahlnadel	Acufirm, 14080220
24-Wellplatten	Thermo Fisher Scientific, 142475
250 ml Vacuum Filter "rapid"- Filtermax	TPP, 99250
3-0 Faden PROLENE™	Ethicon, 662SLH
50 mL Tubes	GreinerBio-One, 227261
500 ml Vacuum Filter "rapid"- Filtermax	TPP, 99500
6-Wellplatten	Greiner
6-Wellplatten	Thermo Fisher Scientific, 140675
Arterieller Führungskatheter	VYGON 115.710
Aspirationspipette 2 mL	Sarstedt, 86.1252.011
Blutglukose Teststreifen	Bayer, Contour next, 84167879
Cell culture tube 12mL, round bottom (for EHT generation)	GreinerBio One, 163160,
Cryovial CryoPure tube 1.6 mL	Sarstedt, 72.379
EHT-Materialien	
EHT Elektrode aus Platin	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE
EHT-Behälter aus Teflon	Eigenherstellung für tubuläre EHTs (Stapel-EHTs) am UKE
EHT Kultivierungskammer aus Teflon (B: 7 cm, L: 7cm, H: 4.3 cm, Füllvolumen: 24 ml)	Eigenanfertigung für tubuläre EHTs Teflon: Polymer-Akzent
EHT Perfusionsschlauch aus Silikon Grundelemt: ID: 0.6 cm, L: 1.5 cm, WS: < 250 µm) Adapter: (ID: 0.6 cm, L: 1.2 cm, WS: 1 mm)	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE Adapter: Lindemann Silikon
EHT-Perfusionsschlauch Matrize aus Teflon (D: 5.5 mm, L: 4 cm)	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE Teflon: Polymer-Akzent
EHT Pacing Adapter/Kabel	EHT Technologies GmbH, P0002
EHT PDMS Netz	Eigenherstellung für Patch-EHTs am UKE
EHT PDMS Rack (6-Well)	Eigenherstellung für Patch-EHTs am UKE
EHT PTFE Spacer (6-Well)	Eigenherstellung für Patch-EHTs am UKE
EHT-Säulen aus Silikon (ID: 0.6 und 0.8 cm, L: 1 cm)	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE
EHT-Silikonschlauch mit größerem Durchmesser (ID: 8mm, L: 4 cm, WS: 1mm)	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE, Silikonschlauch: Lindemann Silikon
EHT Zylinder aus Teflon (1.5 x 1.5 x 1 cm, ID: 1.1 cm)	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE

Falcon-Röhrchen, graduated, 15 mL	Sarstedt, 62.554.502
Filtropur BT50 500ml	Sarstedt, 83.3941.101
Flow Cytometry Tubes	Sarstedt, 55.1579
Flussadapter aus Edelstahl (ID: 4 mm, WS: 1 mm, L: 50mm)	Eigenherstellung für das pulsatile Flusssystem Edelstahlrohr: Hörr
Gel casting chamber	Eigenherstellung UKE
Kabelbinder	Honeywell
Klebeband	3M Health Care
Klettverschlussringe (D: 1 cm)	O-Kinee
Petrischale aus Glas (60 x 15 mm)	Labsolute, TH. Geyer
Photo- und Videostage für das iPhone 8 aus Edelstahl	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE
Nalgene Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fischer Scientific
Neubauer Zählkammer	Karl-Hecht KG
Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflasche 175cm ²	
Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, 156340
Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflasche 75cm ²	
Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, 156499
Pipettenspitzen	Sarstedt, 70.762, 70.760.002
Pipettenspitzen mit Filter Biosphere®	Sarstedt, 70.1130.210, 70.1116.210 70.760.212, 70.762.211
Röhrchen für die Entnahme von Blutgasproben	PICO50 - 956-552 RADIOMETER MEDICAL A.P.S.
SafeSeal Tube 1.5 mL	Sarstedt, 72.706
Skalpell Klinge	Bayha GmbH
Serologische Pipette 10 mL	Sarstedt, 86.1254.001
Serologische Pipette 25 mL	Sarstedt, 86.1685.001
Serologische Pipette 2 mL	Sarstedt, 86.1252.001
Serologische Pipette 50 mL	Sarstedt, 86.1256.001
Serologische Pipette 5 mL	Sarstedt, 86.1253.001
Silikon Kleb- und Dichtstoff	Dow Corning 734
Silikonschlauch mit größerem Durchmesser (ID: 8mm, L: 40 mm, WS: 1mm)	Eigenherstellung für tubuläre EHTs am UKE, J.Lindemann GmbH
Schlauchsystem aus Silikon (ID: 3mm, WS: 1mm)	Eigenherstellung für das pulsatile Perfusionssystem am UKE Silikonschlauch: Lindemann Silikon
Small Sample Container	Siemens
Spinnerflasche, 1000 ml	Integra, 182 101
Spinnerflasche, 500 ml	Integra, 182 051
Sylgard Elastomer Kit	Dow Corning
Chirurgische Instrumente	Verschiedene Firmen
Spritze 1 ml, Omnifix-F 2024-11-01	Braun
T175 Zellkulturflaschen für eine Suspensionskultur	Sarstedt, 83.3912.502

V-förmige Sedimentationshalterungen	Eigenherstellung am UKE Hamburg
-------------------------------------	---------------------------------

13.4 Medien und Seren

DMEM	Life Technologies, A14430-01
DMEM	Biochrom, F0415
DMEM, (no Phenol Red)	Life Technologies, 21063045
DMEM/F-12 without Glutamine	Life Technologies, 21331-046
Fetal Bovine Serum superior (FBS)	Biochrom, S0615
Goat serum	Sigma-Aldrich, S26
Horse serum	Life Technologies, 26050-088
Human serum albumin (HAS)	Biological Industries, 05-720-1B
RPMI 1640	Life Technologies, 21875-034

13.5 Reagenzien

1-Thioglycerol (MTG)	Sigma-Aldrich, M6145
2-Propanol	Roth, 9866.6
2x DMEM	Gibco, 52100-021
Accutase® Cell Dissociation Reagent	Sigma-Aldrich, A6964-100mL
Agarose	Thermo Fisher Scientific, 15510-027
Aqua	B. Braun
Collagenase II	Worthington, LS004176
DAPI	Biochemica, A1001 0025
Dimethyl sulfoxide (DMSO) for cell culture	Sigma-Aldrich, D4540
DPBS	Gibco, 14190250
EDTA	Roth, X986.2
Ethanol 99%	Chemsolute, 2212.5000
Ethanol, 96%	Roth, T171.4 and Chemsolute 2209.5000
Geltrex®	Gibco, A14133-02
HBSS minus Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco, 14175-053
HEPES	Sigma-Aldrich, 9105.4
L-Glutamine	Gibco, 25030-081/ - 024
Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix (for hiPSC culture)	Corning, 354230
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	Life Technologies, 11140050
Mowiol® 4-88	Roth, 0718
MyTaq™ DNA Polymerase	Bioline, BIO-21106
Nitrogen, flüssig (N ₂)	TMG
Non-essential amino acids (NEAA)	Gibco, 11140
Nuclease-freies Wasser	ThermoFisher Scientific, R0581
Paraformaldehyd	Merck, 1.04005
PBS Tabletten	Gibco, 18912014
PCR Puffer 10x	Qiagen, 163045984
Phosphoascorbate (2-Phospho-L-ascorbic acid trisodium salt)	Sigma-Aldrich, 49752

Pluronic® F-127	Sigma-Aldrich, P2443-250G
Polyvinyl alcohol	Sigma-Aldrich, P8136
Proteinase K	Qiagen, 19133
Roti®-Histofix 4%	Roth, P087.3
Sodium chloride (NaCl) solution (0.9%)	B. Braun, 3570210
TBS	Sigma-Aldrich, T6664
TRIS-hydrochloride	Roth, 9090.2
Triton X®-100	Roth, 3051.3
Trypan blue	Sigma, T8154
Xylene	JT Baker, 8080.2500

13.6 Proteine

Activin A	R&D Systems, 338-AC
Aprotinin	Genaxxon bioscience M6361.1010
Aprotinin	Sigma-Aldrich, A1163-10G
BMP-4	R&D Systems, 314-BP
Dorsomorphin dihydrochloride	Tocris, 3093
FGF2 (human recombinant basic FGF)	Peprtech, #100-18B or Milentyi Biotec, 130-104-923
Fibrinogen	Sigma-Aldrich, F8630
Human Holo-Transferrin	Sigma-Aldrich, T0665-500MG
Human serum albumin	Biological Industries, 05-720-1B
IGF-1	Peprtech, 100-11R3
Insulin, human	Sigma-Aldrich, I9278
TGF-β1	Peprtech, 100-21C
Thrombin	Sigma, 605157 or Biopur, BP11-10-1104
Transferrin human	Sigma-Aldrich, T8158
Wheat germ agglutinin	Thermo-Fisher Scientific, W21404

13.7 Medikamente und niedermolekulare Verbindungen

BTS (N-Benzyl-p-Toluenesulfonamide)	TCI, B3082-25G
Dorsomorphin	Tocris, 3093
Penicillin/streptomycin	Gibco, 15140-122
XAV-939	Tocris, 3748
Y-27632 2 HCl	Biorbyt, orb154626 or orb60104

13.8 Liste mit Antikörpern

Antigen	Hersteller/Firma	Antigen Retrieval	Verdünnung
MLC2a	BD Pharmingen, clone S58-205, Cat. 565496	Citrate buffer	1:500
MLC2v	Proteintech, pAb, Cat.10906-1-AP	Citrate buffer	1:250
Alpha-Aktinin	Sigma-Aldrich, clone EA-53 Cat. A7811	Proteinase K	1:600
Dystrophin	Millipore, clone 1808, Cat. MAB1645	EDTA	1:150
SSEA3 (AlexaFluor® 647)	BD Pharmingen, Clone MC-63, Cat. 561145	n/a	1:50
Isotype SSEA3	BD Pharmingen, clone MOPC/21, Cat. 557714	n/a	1:50
Cardiac troponin T (APC)	Miltenyi Biotec, clone REA400, Cat. 130-120-403	n/a	1:50
Isotype cardiac troponin T	Miltenyi Biotec, clone REA293, Cat. 130-120-709	n/a	1:50
Rabbit (polyclonal) Alexa Fluor 488	Invitrogen, Cat. 710369	n/a	1:100

13 Publikationen

13.1 Publikationen

Köhne M., Behrens S. C., Stüdemann T., v. Bibra C., Querdel E., Shibamiya A., Geertz B., Olfe J., Hüners I., Jockenhövel S., Hübler M., Eschenhagen T., Sachweh S. J., Weinberger F., Biermann D. A potential future Fontan modification: preliminary in vitro data of a pressure – generating tube from engineered heart tissue, 2022 EJCTS, DOI: doi.org/10.1093/ejcts/ezac111.

Gottschalk U.#, **Köhne M.#**, Holst, T., Hüners I., v. Stumm M., Mueller G., Stark V., v. Rütth V., Kozlik-Feldmann R., Singer D., Sachweh J., Biermann D., Outcomes of Extracorporeal Membrane Oxygenation and Cardiopulmonary Bypass in Children after Drowning-Related Resuscitation. *Perfusion*, 2021, DOI:10.1177/02676591211041229

Hüners I., Boettcher M., Holst T., Groth M., Stark V., **Köhne M.**, Lennartz M., Sachweh J.S., Reinshagen K., Biermann D.. Life-Threatening Mediastinal Shift due to a Giant Bronchogenic Cyst. *Klin Padiatr.* 2020 Sep;232(5):269-271. English. doi: 10.1055/a-1159-7578.

Querdel E.#, Reinsch M.#, Castro L.#, Köse D, Bähr A., Reich S., Geertz B., Ulmer B., Schulze M., Lemoine M.D., Krause T., Lemme M., Sani J., Shibamiya A., Stüdemann T., **Köhne M.**, v. Bibra C., Hornaschewitz N., Pecha S., Nejahsie Y., Mannhardt I., Christ T., Reichenspurner H., Hansen A., Klymiuk N., Krane M., Kupatt C., Eschenhagen T., Weinberger F., Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner, *Circulation*, 143: pp. 1991-2006. 2021, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047904

V. Bibra C. #, Shibamiya A. #, Geertz B., Querdel E., **Köhne M.**, Stüdemann T., Starbatty J., Hansen A., Hieble B., Eschenhagen T., Weinberger F. Human engineered heart tissue transplantation in a guinea pig chronic injury model, *JMCC*, 2022, DOI:10.1101/2021.06.28.450176

Stüdemann T., Rössinger J., Manthey C., Geertz B., Srikantharajah R., v. Bibra C., Shibamiya A., **Köhne M.**, Wiehler A., Wiegert S. J., Eschenhagen T., Weinberger F. Contractile force of transplanted cardiomyocytes contributes to heart function after injury, *bioRxiv*, DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.11.23.469715>

13.2 Konferenzbeiträge

Biermann D.#, **Köhne M.#**, Kozlik-Feldmann R., Eschenhagen T., Weinberger F., Hazekamp M., Hübler M., Sachweh J.S., Generation of a subpulmonary neo-ventricle from engineered heart tissue to support the univentricular circulation. European Association for Cardiac-Thoracic Surgery, hybrid Annual Meeting, Barcelona. October 2021 (oral presentation)

Köhne, M., Behrens C.S., Stüdemann T., Bibra v.C., Stüdemann T., Querdel E., Eschenhagen T., Sachweh J., Weinberger F., Biermann D., 3D engineering of a tubular cardiac assist to support directed venous return after staged surgical palliation. Single ventricle investigator meeting, virtual meeting, USA. March 2021 (oral present ation)

Köhne, M., Biermann D., Reinsch M., Querdel E., Stüdemann T., Christ T., Eschenhagen T., Sachweh J., Weinberger F. Generation of a contractile human engineered heart tissue conduit to support subpulmonary flow in the Fontan circulation. 17th Dutch-German Joint Meeting of the Molecular Cardiology Working Groups, Göttingen, Germany. March 2019 (poster presentation)

Biermann D.#, **Köhne, M.#**, Götz, M., Stark, V., Kozlik-Feldmann, R., Singer, D., Gasser, S., Riso, A., Ruffer, A., Sachweh, J., Gottschalk, U, Extracorporeal Life Support in Children:

Outcome of Pediatric Drowning Victims after Cardiopulmonary Resuscitation, American Heart Association Scientific Sessions, Chicago, Illinois, November 2018 (oral presentation)

Gleichberechtigte Hauptautoren

14 Danksagung

Zuallererst möchte ich Florian Weinberger für die Ausbildung in den letzten drei Jahren danken. Für die Unterstützung, die offene Tür und das Vertrauen, mich zu betreuen.

Ein besonderer Dank geht auch an Thomas Eschenhagen in der Rolle meines Zweitgutachters. Dafür, dass er mich während meiner Doktorarbeitszeit in Hamburg mitbetreut und unterstützt hat.

Einen herzlichen Dank zudem an meine Arbeitgeber und Betreuer Jörg Sachweh und Daniel Biermann sowie an das gesamte Team der Kinderherzchirurgie. Danke, dass ich meine Arbeit durch eure Idee verwirklichen konnte.

Weiterhin möchte ich mich bei Bülent Aksehirlioglu bedanken, ohne den die Umsetzung dieses Projekts nicht möglich gewesen wäre. Danke für die technische Unterstützung, deine Freundschaft und die vielen Tage in der Werkstatt.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der AG Weinberger und dem gesamten Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die schöne und lehrreiche Zeit hier in Hamburg. Insbesondere danke ich Constantin, Lotta, Tim und Birgit für die Unterstützung, ein großartiges Büroklima und immer die Zeit für einen kleinen Spaß. Weiterhin möchte ich Anna Steenpass, Birgit Klampe, Thomas Schulze und Jutta Starbatty danken, die mir bei technischen Fragen immer zur Seite standen und jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten.

Ein großes Dankeschön geht an alle, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben. Vor allem danke Ich Ulrike, die mir in so kurzer Zeit geholfen hat.

Danke an meine Familie für die finanzielle Unterstützung im Studium. Ohne diese Grundlage hätte ich die Arbeit nicht durchführen können.

Vielen Dank an Kristin Hartmann, die geholfen hat die immunhistochemischen Färbungen für diese Arbeit bereitzustellen.

Einen großen Dank möchte ich an euch Martin und Elin aussprechen. Danke, dass ich mit euch träumen kann und ihr immer für mich da seid. Danke, dass ihr mir den Heimweg so schön macht, weil ich mich auf euch freuen kann.

15 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

16 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.

Unterschrift: