

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle Pharmakologie und
Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Die Effekte von Änderungen der Nachlast auf künstliches Herzmuskelgewebe

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Benjamin Becker
aus Hamburg

Hamburg 2022

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.09.2022

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Tanja Zeller

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

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Christian Bär

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie	1
1.2	Vor- und Nachlast als Hypertrophie-induzierende Stimuli	3
1.3	Herzinsuffizienz als Folge pathologischer Hypertrophie	4
1.4	Antagonismus physiologischer und pathologischer Hypertrophie	6
1.5	Tiermodelle kardialer Hypertrophie	7
1.6	<i>Engineered Heart Tissue</i> als Hypertrophie-modell	9
1.7	Fragestellung und Zielsetzung	12
2	MATERIALIEN UND METHODEN	13
2.1	Verwendete Materialien	13
2.2	Geräte und Hilfsmittel	13
2.3	Chemikalien und Lösungen	14
2.4	qPCR-Primerliste	16
2.5	EHT-Herstellung und -Kultur	17
2.5.1	Gewinnung von Rattenherzzellen	17
2.5.2	Differenzierung von Herzmuskelzellen aus hiPSC	17
2.5.3	Herstellung von EHTs	18
2.5.4	EHT-Kultur	19
2.6	Nachlastmodulation im EHT	21
2.6.1	Silikonhalterungen unterschiedlicher basaler Steifigkeit	21
2.6.2	Edelstahlklammern zur Nachlasterhöhung	22
2.6.3	Nachlastmodulation durch Magnetismus: Die „ <i>Piezo-Stage</i> “	23
2.6.3.1	Herstellung von Magnet-Silikonhalterungen	24
2.6.3.2	Aufbau der <i>Piezo-Stage</i>	25
2.6.3.3	Einsatz der <i>Piezo-Stage</i> zur Nachlastmodifikation	26
2.7	Video-optische Kontraktilitätsanalyse von EHTs	29
2.8	Durchflusszytometrie	31
2.8.1	Papain-assistierte Dissoziation von EHTs	31

2.8.2	Vorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie	32
2.9	Molekularbiologie	33
2.9.1	RNA-Isolation aus EHT-Proben.....	33
2.9.2	Reverse Transkription von RNA.....	34
2.9.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	34
2.10	Histologie	36
2.10.1	Entwässern, Einbetten und Schneiden von EHT-Proben.....	36
2.10.2	Entparaffinieren, Wässern und Färben von EHT-Schnitten	37
2.10.3	Auswertung der EHT-Querschnitte.....	37
2.11	Massenspektrometrie und Proteom-Analyse	39
2.12	Statistik	40
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Nachlasterhöhung in humanen EHTs der Zelllinien ERC018 und C25	41
3.2	Merkmale pathologischer kardialer Hypertrophie in ERC001-AE-EHTs.....	43
3.2.1	Effekte der AE-Intervention auf die Kontraktilität von ERC001-EHTs	43
3.2.2	Methodik: Zellgrößenbestimmungen via Durchflusszytometrie	45
3.2.3	Effekt der AE-Intervention auf Zellgrößen humaner ERC001-AE-EHTs.....	48
3.2.4	Gen-Expressionsveränderungen in ERC001-AE-EHTs	49
3.3	Kultur von EHTs an Silikonhalterungen verschiedener Steifigkeit.....	52
3.3.1	Einfluss der Steifigkeit von Silikonhalterungen auf EHT-Kontraktilität.....	52
3.3.2	Histologie und Genexpression bei verschiedenen Nachlasten kultivierter Ratten-EHTs	54
3.4	Kultur von EHTs bei fluktuierender Nachlast	56
3.5	Kultur von EHTs bei schrittweise zunehmender Nachlast.....	58
3.5.1	Effekte inkrementell erhöhter Nachlast auf Ratten-EHTs.....	58
3.5.2	Effekte inkrementell erhöhter Nachlast auf humane ERC001-EHTs	59
3.6	Direkter Einfluss von Nachlast auf EHT-Kontraktilität	62
3.6.1	Der Frank-Starling-Mechanismus als möglicher Urheber der in EHTs beobachteten Nachlast-Kraft-Beziehung	64
3.6.2	Der Anrep-Effekt als möglicher Urheber der Nachlast-Kraft-Beziehung.....	66

4	DISKUSSION	68
4.1	Pathologische kardiale Hypertrophie in humanen ERC001-EHTs	68
4.1.1	Die AE-Intervention zur Induktion pathologischer kardialer Hypertrophie	68
4.1.2	Varianz zwischen durchgeführten ERC001-AE-Experimenten	69
4.1.3	AE-ERC001-EHTs im Vergleich zu AE-EHTs anderer iPS-Zelllinien	70
4.1.4	Aspekte pathologischer kardialer Hypertrophie in ERC001-EHTs	71
4.1.4.1	Systolische Dysfunktion	71
4.1.4.2	Diastolische Dysfunktion und Fibrose.....	71
4.1.4.3	Aktivierung des fetalen Genprogramms	72
4.1.4.4	Kardiomyozyten-Hypertrophie	73
4.2	Methodik: Zellgrößenmessungen via Durchflusszytometrie.....	74
4.2.1	Vorwärtsstreuung und Zellgeometrie.....	74
4.2.2	Vorwärtsstreuung als Maß für Zellgröße.....	74
4.2.3	Validierung des durchflusszytometrischen Messansatzes	75
4.3	Versuche zur Induktion physiologischer Hypertrophie in EHTs.....	77
4.3.1	Silikonhalterungen verschiedener Steifigkeit	77
4.3.2	Intervall-Nachlast-Programm.....	77
4.3.3	Inkrementelle Nachlasterhöhung.....	78
4.3.4	Insulin/IGF-1- <i>Signalling</i> als Limitation des EHT als Modell Nachlast-induzierter physiologischer Hypertrophie	80
4.4	Kraft-Nachlast-Beziehung.....	82
4.4.1	Vergleichbarkeit der Kontraktilitäts-Analyse am EHT.....	82
4.4.2	Nachlast und Kontraktilität in anderen Messsystemen.....	83
4.4.3	Kopplung von Nachlast und Kontraktionskraft	83
4.4.4	Optimierte Kontraktilitäts-Analyse in EHTs	84
4.5	Ausblick.....	85
	ZUSAMMENFASSUNG	86
	SUMMARY	87
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
6	LITERATURVERZEICHNIS	90

7	VERÖFFENTLICHUNGEN	96
8	DANKSAGUNGEN	97
9	LEBENS LAUF	98
10	ANHANG.....	99
10.1	Versuche zu verschiedenen Medium-Kompositionen	99
10.2	Steifere Magnet-Silikonhalterungen.....	101
10.3	Versteifung der Kontroll-Silikonfüße an magnetischen Halterungen	103
10.4	Statistische Auswertung zu Abb. 3.10	104
11	EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG	110

1 EINLEITUNG

1.1 Physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie

Das menschliche Herz ist ein plastisches Organ: Es ist in der Lage, auf verschiedene äußere Stimuli mit tiefgreifenden und vielschichtigen Veränderungen des Herzmuskelgewebes zu reagieren. Ein Bestandteil dieser Plastizität ist die Zunahme der Größe des Herzens, man spricht hierbei von einer kardialen Hypertrophie (sinngemäß aus dem Griechischen übersetzt: „Überernährung“). Eine Hypertrophie entsteht generell durch ein Volumenwachstum der einzelnen Zellen eines Gewebes. Zur Hyperplasie, der Größenzunahme eines Gewebes durch Zellvermehrung, ist das Herzmuskelgewebe kaum fähig, da differenzierte Herzmuskelzellen die Fähigkeit zur Zellteilung kurz nach der Geburt verlieren.

Je nachdem, in welchem Kontext die kardiale Hypertrophie auftritt, wird sie verschiedenen Phänotypen zugeordnet. Häufige Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Bluthochdruck oder Klappenschäden können zu einer sogenannten pathologischen, also krankhaften Herzhypertrophie führen. Im deren Rahmen kommt es zum Absterben von Herzmuskelzellen, zur narbigen Veränderung von Herzmuskelgewebe und zu einer Abnahme kontraktile Funktion, sowohl auf Ebene der einzelnen Zelle als auch im Myokard insgesamt. Am Ende dieser zunehmend irreversiblen Umbauprozesse droht die Entwicklung einer Herzinsuffizienz, eines anhand klinischer Symptome definierten Krankheitsbildes, das zu den häufigsten Hospitalisierungsursachen in Deutschland zählt und mit 38700 Toten im Jahr 2019 für den größten Teil der Sterbefälle in deutschen Krankenhäusern verantwortlich war (Statistisches Bundesamt 2020).

Die physiologische als Gegenstück zur pathologischen kardialen Hypertrophie beschrieb der Arzt Salomon Henschen schon Ende des 19. Jahrhunderts, als er bei Skilanglaufwettbewerben feststellte, „dass der Preis von den grossen Herzen erobert wurde“ (Henschen 1899). Diese Form der Herzhypertrophie, die außer bei SportlerInnen auch bei Schwangeren auftritt, teilt mit der pathologischen Hypertrophie als Merkmal lediglich die Größenzunahme von Herzmuskelzellen und Herzmuskelgewebe. Die physiologische Hypertrophie des Herzens führt nämlich zu einer Verbesserung, zumindest aber nicht zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion und Blutversorgung des Herzens. Darüber hinaus geht diese Form der Hypertrophie in der Regel nicht mit einer Fibrosierung einher und ist reversibel.

Physiologische und pathologische Hypertrophie stellen zwei offensichtlich gegensätzliche ideelle Extreme möglicher Umbauprozesse des Herzens dar, allerdings bewegt sich kardiale Plastizität in der Realität oft zwischen diesen beiden Polen. So ist bis heute nicht abschließend

geklärt, ob die durch eine Stenose der Aortenklappe bzw. des Aortenlumens ausgelöste kardiale Hypertrophie durch und durch als pathologisch anzusehen ist. Meerson, der schon früh Hypertrophie am Hasen- und Hundemodell der Aortenstenose erforschte, kam zu dem Schluss, dass die von ihm beobachtete kardiale Hypertrophie eine vorübergehende kompensatorische „Phase stabiler kardialer Überfunktion“ ermögliche. Im Anschluss an diese Phase adaptiver Hypertrophie beobachtete Meerson eine zunehmende Dilatation des linken Ventrikels, einhergehend mit einer Dekompensation der kardialen Pumpfunktion analog zur Herzinsuffizienz im Menschen (Meerson 1962). Dieser von Meerson propagierten Sequenz kardialer Umbauprozesse widersprechen andere Autoren: Sie argumentieren, dass im Menschen die durch Aortenklappenstenose ausgelöste Hypertrophie schon früh die Füllung des linken Ventrikels behindere und der Übergang zur Dilatation und kardialen Dekompensation fließend und nicht schrittweise sei – von daher trüge die vermeintlich kompensatorische Hypertrophie von Anfang an „den Samen zukünftigen [Herz]versagens“ in sich (Opie et al. 2006).

Genauso wie es Zweifel an der rein maladaptiven Natur einiger Formen krankheitsinduzierter Hypertrophie gibt, gibt es auch Forschungsergebnisse, die die ausnahmslose Gutartigkeit sport- und schwangerschaftsinduzierter kardialer Hypertrophie in Frage stellen. Bei einigen Hochleistungssportlern bildet sich nach Karriereende die mutmaßlich trainingsinduzierte Hypertrophie nicht zurück (Pelliccia et al. 2002), was dem Kriterium der Reversibilität physiologischer Hypertrophie nicht entspricht. Obwohl Sport nachweislich verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung (wie z.B. den arteriellen Blutdruck) positiv beeinflusst, tritt die koronare Herzerkrankung bei langjährigen Ausdauersportlern häufiger auf als in einer in etwa gleichaltrigen Kontrollpopulation. Ebendiese langjährigen Athleten weisen auch mit einer Prävalenz von 11-17% eine Myokardfibrose auf, also einen narbigen Umbau des Herzmuskelgewebes. Auch wenn dieser bindegewebige Umbau häufig ohne funktionelle Konsequenzen bleibt (Parry-Williams und Sharma 2020), ist die Fibrose dennoch ein klassisches Merkmal pathologischer Hypertrophie.

Offensichtlich greift es dementsprechend zu kurz, wenn man versucht, komplexe biologische Prozesse wie die kardialen Adaptationen an Krankheit, Sport und Schwangerschaft lediglich in die beiden Kategorien „physiologisch“ und „pathologisch“ einzuteilen. Allerdings helfen solche Vereinfachungen, in komplexen Themengebieten wie der kardialen Plastizität nicht die Orientierung zu verlieren. Und auch wenn der initiale Charakter der kardialen Hypertrophie in Folge einer Aorten(klappen)stenose nicht abschließend geklärt ist, so ist doch eindeutig, dass die langfristig eintretenden Umbauprozesse (von Meerson als „progrediente Kardiosklerose“ bezeichnet; Meerson 1962) pathologischer Natur sind. Die allermeisten Sporttreibenden entwickeln auch keinerlei Herzfibrose oder irreversible Hypertrophie, sondern profitieren von

den Anpassungen ihres Herzens, wenn sie im Wettkampf „den Preis [...] erobern“ (Henschen 1899). Da kardiale Plastizität sich also oftmals zumindest in der Nähe des physiologischen oder pathologischen Pols abspielt, sollte für den Umfang dieser Arbeit die Nutzung eben dieser vereinfachenden Begriffe gerechtfertigt sein.

1.2 Vor- und Nachlast als Hypertrophie-induzierende Stimuli

Das schlagende menschliche Herz wird in seiner Funktion als Pumpe von verschiedenen Parametern beeinflusst, die durch den restlichen Kreislauf diktiert werden. Wenn der venöse Rückstrom von Blut zum Herzen zunimmt, wird die Muskulatur der Herzkammern vor der Kontraktion vermehrt gedehnt – diese Vordehnung wird auch Vorlast genannt, man spricht auch von einer erhöhten Volumenbelastung. Wenn der Blutdruck in der Hauptschlagader zunimmt, muss das Arbeitsmyokard einen höheren Druck aufbauen, um Blut durch die Aortenklappe in die Aorta auswerfen zu können. Dieser Zustand entspräche einer erhöhten Nachlast bzw. Druckbelastung.

Dauerhafte oder zumindest regelmäßige Erhöhung von Vor- oder Nachlast kann kardiale Plastizität im Sinne einer physiologischen oder auch pathologischen Hypertrophie auslösen - allerdings unterscheidet sich das Wachstumsmuster des Myokards je nach Stimulus. Eine erhöhte Volumenbelastung führt zu einer exzentrischen kardialen Hypertrophie, hier nimmt durch ein Längenwachstum der Herzmuskelzellen vor allem der Innendurchmesser der Herzkammern zu. Ein klassischer Stimulus einer physiologischen exzentrischen Hypertrophie ist der Ausdauersport, hier muss das Herz pro Zeit mehr Blutvolumen befördern, um den Kreislauf aufrecht zu erhalten. Eine Insuffizienz der Mitralklappe wiederum löst eine pathologische exzentrische Hypertrophie aus, da durch die „Undichtigkeit“ der Klappe ein Pendelvolumen entsteht, das von der Kammer zusätzlich zum normalen Herzzeitvolumen befördert werden muss (Opie et al. 2006).

Eine konzentrische kardiale Hypertrophie wird in der Regel ausgelöst durch eine erhöhte Druckbelastung, also durch erhöhte Nachlast. Bei der konzentrischen kardialen Hypertrophie wachsen die Kardiomyozyten vor allem im Durchmesser, dadurch nimmt im Herzen in erster Linie die Dicke der Kammerwände zu. Der Nutzen dieser Form der Hypertrophie wird generell mit dem Gesetz von Laplace begründet, welches (angewandt auf die Ventrikel als idealisierte Sphären) besagt: $Wandspannung\ der\ Ventrikel = \frac{Druck \times Radius}{2 \times Wanddicke}$. Demnach vermag eine zunehmende Wanddicke also den Effekt einer erhöhten Druckbelastung auf die Wandspannung der Ventrikel zu kompensieren. Klassische Ursachen für pathologische Druckbelastungen des Herzens sind die arterielle Hypertonie und die Aortenklappenstenose – in Industrienationen immerhin die am häufigsten bzw. dritthäufigsten auftretende

kardiovaskuläre Erkrankung (Brandt et al. 2018). Die durch arterielle Hypertonie ausgelöste hypertensive Herzkrankheit verläuft dabei ähnlich wie das *Remodelling* in Folge einer Aortenklappenstenose: Zunächst kommt es durch die Hypertrophie zu einer Abnahme des Füllungsvolumens der linken Kammer, mit fortschreitender Erkrankung folgen Kammerdilatation und Herzinsuffizienz (Prisant 2005).

Anders als Ausdauersport führt Kraftsport nicht zu einer vermehrten Volumen- sondern zu einer erhöhten Druckbelastung: Bei intensiver Benutzung der Beinpresse wurden bei Sportlern durchschnittliche systolische Blutdrücke von 320 mmHg gemessen – beinahe das Dreifache eines normalen Ruheblutdrucks (Hill und Butler 1991). Joel Morganroth stellte echokardiographisch bei Ringern und Kugelstoßern eine verdickte linke Ventrikelwand fest, während sich bei Läufern vor allem das Füllungsvolumen des Ventrikels vergrößert zeigte – er postulierte daher, dass Kraftsport durch Druckbelastung des Herzens (anders als Ausdauersport) eine physiologische konzentrische Hypertrophie induziert (Morganroth und Maron 1977). Viele der echokardiographischen Querschnittsstudien, die diese „Morganroth-Hypothese“ stützen, sind allerdings ohne Verblindung und ohne angepasste Kontrollgruppen an einer verhältnismäßig kleinen Zahl von Sportlern durchgeführt worden. Da die Echokardiographie darüber hinaus eine sehr untersucherabhängige Methode ist, ergeben sich berechnete Zweifel an Morganroths Darstellung (Naylor et al. 2008). Die Existenz der Nachlast-induzierten physiologischen Hypertrophie ist also umstritten. Unabhängig davon verdächtigen einige Forscher den Steroidmissbrauch als tatsächliche Ursache beschriebener kardialer Hypertrophie bei Gewichthebern (Urhausen et al. 2004).

1.3 Herzinsuffizienz als Folge pathologischer Hypertrophie

Die Herzinsuffizienz (als mögliche Folge pathologischer kardialer Hypertrophie) ist keine eigenständige Erkrankung im eigentlichen Sinne, sondern laut der *American Heart Association* ein „komplexes klinisches Syndrom, das durch eine funktionelle oder strukturelle Störung der Ventrikelfüllung oder des Auswurfs von Blut zustande kommt“. Insofern stellt die Herzinsuffizienz einen klinischen (End-)Zustand als gemeinsame Folge verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen dar. Die wesentlichen klinischen Kennzeichen der Herzinsuffizienz sind Luftnot, Abgeschlagenheit und Flüssigkeitsretention in Form von Knöchel- oder Lungenödemen (Yancy et al. 2013). Diese Symptome lassen sich durch den verminderten Transport von Sauerstoff in die Körperperipherie bzw. den mangelnden Abtransport von Flüssigkeit aus der Körperperipherie bei eingeschränkter Pumpfunktion des Herzens pathophysiologisch nachvollziehen. Je nachdem, bei welchem Intensitätsgrad körperlicher Belastung Symptome auftreten, wird die Herzinsuffizienz nach den Stadien der *NYHA* (*New*

York Heart Association) eingeteilt; im letzten *NYHA*-Stadium IV sind die Patienten dabei definitionsgemäß bereits in Ruhe symptomatisch.

Außer der Einteilung nach den *NYHA*-Stadien ist in der Klinik für die Wahl der richtigen Therapie auch die Einteilung der Herzinsuffizienz nach der echokardiographisch bestimmten linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) von Bedeutung. Man unterscheidet hier zwischen der Herzinsuffizienz mit reduzierter EF (HFrEF) und der Herzinsuffizienz mit erhaltener EF (HFpEF) – viele für die HFrEF zugelassenen Therapien haben bei der HFpEF keinen nachgewiesenen prognoseverbessernden Effekt. Die bildgebend bestimmten Kategorien der HFpEF und HFrEF lassen sich zwar in Einklang bringen, sind aber nicht einfach gleichzusetzen mit den pathophysiologischen Begriffen der diastolischen und systolischen Herzinsuffizienz. Bei einer HFrEF nimmt - häufig durch eine Dilatation des Ventrikels bedingt – der Anteil des enddiastolischen Volumens, der in der Systole ausgeworfen wird, ab. Man spräche in diesem Fall am ehesten von einem systolischen Herzversagen, das z.B. als Folge einer exzentrischen pathologischen Hypertrophie durch Mitralklappeninsuffizienz auftreten kann. Bei der HFpEF wiederum ist bei erhaltener Ejektionsfraktion eher die diastolische Füllung des Ventrikels behindert. Häufig wird diese diastolische kardiale Dysfunktion durch eine Form konzentrischer pathologischer Herzhypertrophie ausgelöst. Ursache kann beispielsweise erhöhte Nachlast durch arteriellen Bluthochdruck oder eine Aortenklappenstenose sein (Pfister 2019).

Der arterielle Bluthochdruck zählt dabei gemeinsam mit der ischämischen Herzkrankheit, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und der rheumatischen Herzkrankheit global zu den vier häufigsten Ursachen der Herzinsuffizienz, wobei die Herzinsuffizienz in ihrer Genese oft multifaktoriell ist (Ziaeian und Fonarow 2016). Herzkreislauferkrankungen waren im Jahr 2018 mit einem Anteil von 36,2% die häufigste Todesursache in Deutschland; immerhin 11% dieser Toten verstarben an einer Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt 2020). Die Herzinsuffizienz ist als Diagnose (die Diagnose Kindesgeburt einmal ausgenommen) für die meisten Patiententage im Krankenhaus in Deutschland verantwortlich, darüber hinaus ist die Herzinsuffizienz auch die häufigste Todesursache im Krankenhaus Verstorbenen (Statistisches Bundesamt 2020). Gemessen an der standardisierten Anzahl von Hospitalisierungen aufgrund von Herzinsuffizienz hat deren Erkrankungshäufigkeit vom Jahr 2011 auf das Jahr 2019 um 8,7% zugenommen, immer mehr Deutsche sind also mutmaßlich von der Erkrankung betroffen. Gleichzeitig ist die standardisierte Mortalitätsrate der Herzinsuffizienz um etwa 38% von 60,7 auf 37,6 Tote pro Jahr und 100000 Einwohner gesunken (Deutsche Herzstiftung e.V 2020). Es lässt sich also erfreulicherweise konstatieren, dass sich die Prognose an Herzinsuffizienz erkrankter Deutscher im letzten Jahrzehnt deutlich verbessert hat. Trotzdem sterben hierzulande mehr Menschen an Herzinsuffizienz als an den

häufigsten Krebserkrankungen: Mit 37,6 ist die standardisierte Sterberate der Herzinsuffizienz deutlich höher als die des Mamma-, Prostata und Kolonkarzinoms mit 12,5, 18,8 und 14,7 Toten respektive pro 100000 Einwohner und Jahr (Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut 2021). Nicht nur die Lebenserwartung, sondern auch die Lebensqualität von HerzinsuffizienzpatientInnen ist deutlich verringert. So wiesen an akuter Herzinsuffizienz Erkrankte in einer Studie insgesamt eine ähnliche Einschränkung der Lebensqualität auf wie Patienten, die einen Schlaganfall mit Verlust des Sprechvermögens erlitten hatten (Franzén-Dahlin et al. 2010).

Die Herzinsuffizienz als mögliche Folge pathologischer kardialer Hypertrophie stellt also für das Gesundheitssystem eine große ökonomische Belastung dar, da sie häufig zur Hospitalisierung führt. Für die Betroffenen bedeutet die Diagnose Herzinsuffizienz immer noch einen immensen Verlust an Lebenszeit und -qualität, sodass alles in allem ein Bedarf an neuen, effektiven und effizienten Therapien der Herzinsuffizienz besteht.

1.4 Antagonismus physiologischer und pathologischer Hypertrophie

Da sich physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie zumindest in einigen Aspekten gegensätzlich zueinander verhalten, können sich aus diesem Antagonismus neue, dringend benötigte Ansätze in der pharmakologischen Therapie pathologischer kardialer Umbauprozesse ergeben. Ein wichtiges Charakteristikum pathologischer kardialer Hypertrophie ist die Reaktivierung verschiedener Gene, die üblicherweise vor allem während der fetalen Entwicklung des Herzens exprimiert werden. Möglicherweise dient diese „De-Differenzierung“ der Kardiomyozyten dem Zweck, die Fähigkeit zur Zellteilung wiederzuerlangen, um so kardiale Regeneration zu ermöglichen (Jopling et al. 2010). Generell wird diese Aktivierung des „fetalen Genprogramms“ aber eher als ein funktionell nachteiliger Prozess angesehen; umso interessanter ist, dass die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) als klassische Botenstoffe physiologischen kardialen Wachstums die Expression des fetalen Genprogramms nicht nur hemmen, sondern auch über das normale Maß hinaus verringern (Shimizu und Minamino 2016). Mit T4 behandelte Ratten entwickelten nach chirurgischer Konstriktion der Aorta im Gegensatz zu Kontrolltieren keine pathologische kardiale Hypertrophie (Chang et al. 1997) – die Aktivierung von Signalwegen der physiologischen Hypertrophie vermag in diesem Modell also pathologische Umbauprozesse aufzuhalten.

Ein anderer Aspekt, in dem sich physiologische und pathologische kardiale Hypertrophie direkt gegensätzlich verhalten, ist die Neubildung von Gefäßen im Herzmuskelgewebe. Während die Angiogenese im Rahmen der physiologischen Hypertrophie dem Wachstum der

Herzmuskelzellen angemessen ist, bedingt eine zu geringe Gefäßneubildung Myokardischämie und Zelltod im Rahmen pathologischer Umbauprozesse (Oka et al. 2014). Auf zellulärer Ebene spielt bei diesem Prozess der Hypoxie-induzierbare Faktor (HiF) eine große Rolle. Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors nimmt bei zellulärem Sauerstoffmangel zu und vermittelt die Synthese verschiedener für die Angiogenese notwendiger Proteine, unter anderem des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF; Rassow 2016). In Mäusen führte eine Nachlasterhöhung durch chirurgische Verengung der Aorta zu einer verminderten Aktivität von HiF1 α , die durch eine Akkumulation des Proteins p53 bedingt war. Die konsekutiv verminderte Expression von VEGF stand in einem zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten systolischer ventrikulärer Funktionsstörungen (Sano et al. 2007) – eine eingeschränkte Angiogenese scheint also das Fortschreiten kardialer Hypertrophie zur Herzinsuffizienz zu befördern.

Ausdauersport als klassischer Auslöser physiologischer kardialer Hypertrophie hingegen fördert durch Induktion von Angiogenese und Arteriogenese (der Vergrößerung des Lumens bestehender Gefäße) die Durchblutung des Myokards (Leung et al. 2008). Dieser Vorgang kann von therapeutischem Nutzen sein: Bei KHK-Patienten führte ein vierwöchiges Fahrradergometer-Trainingsprogramm zu einer deutlichen Verbesserung der kollateralen kardialen Durchblutung (Möbius-Winkler et al. 2016). In der Therapie der Herzinsuffizienz gewinnt körperliches Training zunehmend an Bedeutung – ein positiver Effekt auf Mortalität, Hospitalisierungsrate und Lebensqualität ist nachweisbar, wobei der zugrundeliegende Mechanismus nicht eindeutig geklärt ist (Cattadori et al. 2018).

In Bezug auf die zwei hier aufgeführten (beispielhaft ausgewählten) Aspekte kardialer Plastizität vermögen Elemente der physiologischen Hypertrophie pathologische Umbauprozesse positiv zu beeinflussen. Dies illustriert, dass ein besseres Verständnis der Gegensätze von physiologischer und pathologischer Hypertrophie zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen kann.

1.5 Tiermodelle kardialer Hypertrophie

Viel von dem bereits vorhandenen Wissen über das Verhältnis von physiologischer und pathologischer Hypertrophie zueinander entstammt der Forschung an Modellen. Grundsätzlich dienen Modelle dazu, beim Menschen auftretende biologische Prozesse oder Krankheiten in einem kleineren Maßstab nachzubilden und so deren Erforschung zu vereinfachen. Eines der ältesten Modelle der Hypertrophieforschung ist die *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR), ein Laborrattentypus, der in den sechziger Jahren durch die gezielte Verpaarung von *Wistar*-Ratten mit hohen bzw. hochnormalen Blutdrücken gezüchtet wurde.

Die SHR entwickelt nach spätestens 15 Wochen Lebenszeit systolische Blutdrücke von über 190 mmHg – Kontrolltiere wiesen im Schnitt einen Blutdruck von 130 mmHG auf (Okamoto und Aoki 1963), der einem normalen menschlichen systolischen Druck entspricht. Im Laufe ihres etwa zwei Jahre langen Lebens entwickelt die SHR zunächst eine kardiale Hypertrophie, die schließlich in eine Herzinsuffizienz übergeht (Boluyt et al. 1995) – analog zu menschlichen Hypertonikern, die zunächst an der hypertensiven Herzkrankheit erkranken und schließlich eine Herzinsuffizienz entwickeln. Auch die Re-Expression des fetalen Genprogramms als Charakteristikum pathologischer kardialer Hypertrophie bildet die SHR ab (Iemitsu et al. 2001). Während die langsame Krankheitsprogression der SHR den Verlauf beim Menschen relativ gut nachbildet, ist sie im Forschungsalltag eher hinderlich: Ein Experiment von zwei Jahren Dauer ist im Grundlagenforschungsalltag kaum praktikabel.

Deutlich schneller lässt sich eine nachlastinduzierte kardiale Hypertrophie herbeiführen, wenn die Aorta im aufsteigenden Anteil chirurgisch verengt wird – gängiges Mittel ist die Verwendung eines Clips oder Bandes. In einer Arbeit wiesen so behandelte Ratten nach 6 Wochen eine deutliche Verdickung der linken Ventrikelwand auf, nach weiteren 12 Wochen folgten Dilatation und eine Abnahme der Kontraktilität des Ventrikels (Litwin et al. 1995). Noch schneller lässt sich eine Hypertrophie durch ein vergleichbares Verfahren (die *Transverse Aortic Constriction*; TAC) in Mäusen induzieren. In diesen Tieren lässt sich schon 48 Stunden nach der Intervention eine Hypertrophie beobachten (Tarnavski et al. 2004). Fraglich ist allerdings, inwieweit ein derartig rapide voranschreitendes Krankheitsbild mit der deutlich langsamer entstehenden Hypertrophie durch Aortenklappenstenose im Menschen vergleichbar ist.

In der Forschung an der physiologischen kardialen Hypertrophie ist das Ausdauertraining von Mäusen und Ratten die wichtigste Intervention. Verschiedene Methoden bieten hier unterschiedliche Vor- und Nachteile: Die freiwillige Nutzung eines Laufrades bedeutet für die Tiere am wenigsten Stress, dann sind Intensität und Dauer des Trainings allerdings nicht regulierbar. Schwimmtraining ermöglicht bei kontrollierbarer Dauer das simultane Training mehrerer Tiere, ist aber aufgrund der Angst der Tiere vor dem Ertrinken besonders belastend. Das Training mittels eines Laufbandes ist am aufwändigsten, ermöglicht aber die präzise Durchführung spezifischer Trainingsprogramme (Schwarzer 2016).

Das *High Intensity Interval Training* (HIIT) ist solch ein strukturiertes Trainingsprogramm: Anstelle eines durchgehend gleichbleibenden Trainingsreizes wechseln sich hier Perioden höherer und niedrigerer Trainingsintensität ab. Im Vergleich zum herkömmlichen Ausdauertraining moderater Intensität führt die HIIT-Intervention bei Ratten zu einer deutlicheren Zunahme der Dicke von Vorder- und Hinterwand des linken Ventrikels und bewirkt darüber hinaus eine Zunahme der Kapillardichte des Myokards. Das Schlagvolumen als Parameter kardialer Funktionsfähigkeit war bei HIIT-Ratten gegenüber untrainierten

Vergleichstieren erhöht, die histologisch bestimmte kardiale Fibrose vermindert (Verboven et al. 2019). Durch Laufen oder Schwimmen trainierte Ratten, insbesondere aber HIIT-Ratten, bilden also wesentliche Charakteristika physiologischer kardialer Hypertrophie als Modell ab.

1.6 Engineered Heart Tissue als Hypertrophie-Modell

Tiermodelle sind fester Bestandteil der Forschung an kardialer Hypertrophie. Kardiale Plastizität entsteht durch ein Zusammenspiel facettenreicher biologischer Prozesse, die sich in ihrer Komplexität am umfassendsten im Säugetier darstellen lassen. Allerdings haben Tiermodelle auch Nachteile: Weil sie vernünftigerweise gesetzlich vorgeschriebenen ethischen Standards genügen müssen, sind Tierversuche an hohe bürokratische Hürden gekoppelt und darüber hinaus kosten- und zeitaufwändig. Der Gesetzgeber fordert bei wissenschaftlichen Studien explizit (lt. §7a Abs. 2 S. 2 TierSchG), dass zu prüfen ist, „ob der verfolgte Zweck nicht durch andere Methoden oder Verfahren [als einen Tierversuch] erreicht werden kann“. Um Forschung an kardialer Hypertrophie in Zukunft ökonomischer und ethischer gestalten zu können, müssen also diese „anderen Methoden oder Verfahren“ entwickelt werden.

Dabei spielt das *Tissue Engineering* eine große Rolle. *Tissue Engineering* ist „die Anwendung technischer und naturwissenschaftlicher Methoden, um die Beziehung zwischen Struktur und Funktion in gesundem und krankhaftem Gewebe zu verstehen und darüber hinaus biologischen Gewebeersatz zu entwickeln, der Funktionsfähigkeit wiederherstellt, erhält oder verbessert“ (Skalak und Fox 1988). Das *Tissue Engineering* bezogen auf Herzmuskelgewebe verfolgt dabei verschiedene Ziele: Eine Anwendungsmöglichkeit ist die klinische Verwendung künstlichen Herzmuskelgewebes zur Reparatur kardialer Defekte (Querdel et al. 2021), darüber hinaus können neue Substanzen im *Engineered Heart Tissue* (EHT) auf ihre kardiale Toxizität geprüft werden; außerdem findet das EHT als Modell kardialer Erkrankungen Verwendung (Weinberger et al. 2017).

Die spezifische Form des EHT, die zu letzterem Zweck in der vorliegenden Arbeit Verwendung gefunden hat, geht dabei zurück auf die von Eschenhagen et al. 1997 publizierten Konstrukte: Aus Hühnerembryos gewonnene Herzmuskelzellen wurden in eine Kollagenmatrix eingegossen, die zwischen zwei Velcro-beklebten Glasröhrchen aufgespannt war – die Kardiomyozyten organisierten sich binnen kurzer Zeit zu einem koordiniert kontrahierendem Zellverband (Eschenhagen et al. 1997).

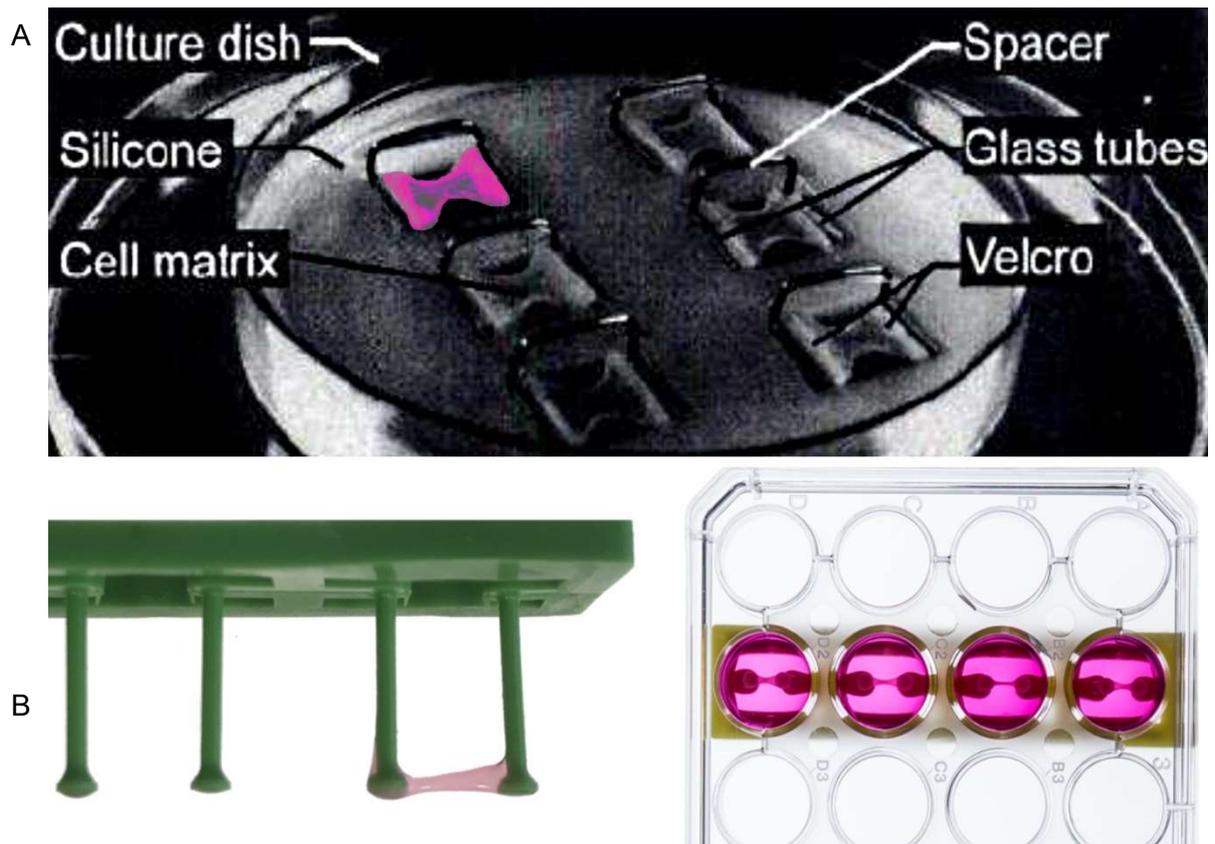


Abb. 1.1: EHT-Formate im Laufe der Zeit. (A) zeigt das erste publizierte EHT-Format; eines der sechs abgebildeten Konstrukte ist zur Veranschaulichung pink hervorgehoben (Modifiziert nach Eschenhagen et al. 1997). (B) demonstriert das für diese Arbeit verwendete EHT-Format in seitlicher Ansicht und in der 24-Well-Kulturplatte von unten fotografiert. Die grünen bzw. gelben Silikonhalterungen stellen einen elastischen Widerstand für die schlagenden Konstrukte dar, die Steifigkeit dieser Halterungen definiert die Nachlast k des EHT. Die pinke Färbung kommt durch den im Nährmedium enthaltenen Farbstoff Phenolrot zustande.

Die Technik wurde inzwischen modifiziert: Die Gelmatrix besteht nun aus deutlich schneller polymerisierendem Fibrin, als Trägermaterial wird elastisches Silikon verwendet. Die Herzzellen werden inzwischen entweder aus den Herzen neugeborener Ratten isoliert (Hansen et al. 2010) oder zunehmend durch Differenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen (hiPSC) in Kardiomyozyten (hiPSC-CM) gewonnen (Breckwoldt et al. 2017).

Um pathologische kardiale Hypertrophie im EHT zu modellieren, bietet es sich an, dessen Nachlast zu erhöhen – schließlich ist die Zunahme der Nachlast die treibende Kraft kardialer Hypertrophie in den gängigen vergleichbaren Tiermodellen, der SHR bzw. der TAC-Maus. Die Nachlast eines EHT ist dabei definiert durch die Steifigkeit k der Silikonhalterung, die es verformen muss, um kontrahieren zu können. Durch die Versteifung dieser Silikonhalterung mittels Drahtklammern gelang es Hirt et al., ein Modell pathologischer kardialer Hypertrophie zu etablieren. Die Nachlasterhöhung von 0,95 mN/mm auf 11,5 mN/mm bewirkte in den Ratten-EHTs im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Abnahme der Kontraktionskraft um 35%, die histologisch bestimmte Querschnittsfläche der Kardiomyozyten nahm gleichzeitig um 28% zu. Gene des fetalen Genprogramms waren in den EHT mit gesteigerter Nachlast (*Afterload*

Enhanced EHTs; AE-EHTs) vermehrt exprimiert, außerdem ließ sich histologisch mehr Kollagen 1 als Fibrosemarker in den AE-EHTs nachweisen (Hirt et al. 2012). Somit lassen sich die wesentlichen Charakteristika pathologischer kardialer Hypertrophie im Ratten-AE-EHT nachvollziehen.

Um die Aussagekraft des Modells AE-EHT zu erhöhen, müsste das Verfahren auf EHTs übertragbar sein, die nicht auf Rattenzellen, sondern auf humanen Kardiomyozyten basieren – schließlich würde das EHT so dem menschlichen Myokard biologisch noch ähnlicher werden. Die AE-Intervention bewirkte allerdings bei EHTs, die aus den Zelllinien C25 und ERC18 differenzierte hiPSC-CM enthielten, lediglich eine Verminderung der Kontraktionskraft. Die restlichen Parameter pathologischer Hypertrophie wie Zellgröße oder Expressionsniveau des fetalen Genprogramms blieben unbeeinflusst (Werner 2018). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Interaktion mit anderen Zelltypen für die Entstehung pathologischer Hypertrophie im EHT vonnöten ist. Das menschliche Herz besteht nämlich im Gegensatz zum EHT nur zu 30-40% aus Herzmuskelzellen (Zhou und Pu 2016), andere im Herzen häufige Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Immunzellen und glatte Muskelzellen werden gängigen humanen EHTs nicht zugesetzt. Ein Lösungsansatz wäre die Herstellung humaner EHTs, die verschiedene Zelltypen enthalten (Werner 2018).

Eine andere Erklärung für das Ausbleiben weitreichender pathologischer Veränderungen in humanen AE-EHTs ist die Hypothese, dass genetisch bedingt die hiPSC-CM der Zelllinien ERC18 und C25 nicht in der Lage sind, einen entsprechenden Phänotyp zu entwickeln. Die Charakterisierung von humanen AE-EHTs einer weiteren hiPSC-Zelllinie würde also zur Klärung der Frage nach dem Grund der ausbleibenden pathologischen Hypertrophie im humanen EHT beitragen. Aufgrund ihrer guten Differenzierbarkeit und der guten Kontraktilität der resultierenden Kardiomyozyten würde sich zu diesem Zweck die ERC001-Zelllinie anbieten.

Erwiesen ist trotzdem, dass sich durch eine enorme Nachlasterhöhung zumindest im Ratten-EHT eine Form pathologischer kardialer Hypertrophie induzieren lässt. Unklar bleibt bisher allerdings, ob sich durch anders dosierte Nachlastveränderungen eine physiologische Hypertrophie im EHT hervorrufen ließe – parallel zur physiologischen konzentrischen Hypertrophie bei Kraftsportlern bzw. entsprechend trainierten Ratten (Barauna et al. 2007, Alves et al. 2014). Die Möglichkeit, verschiedene Formen kardialer Plastizität im gleichen Format künstlichen Herzmuskelgewebes nachzubilden, würde das EHT zu einem noch aussagekräftigeren und damit wichtigeren Werkzeug in der Forschung an kardialer Hypertrophie machen.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war, durch Applikation verschiedener Nachlast-Stimuli die Tauglichkeit von künstlichem Herzmuskelgewebe als Modell physiologischer und pathologischer kardialer Hypertrophie (über bereits vorhandene Erkenntnisse hinaus) zu evaluieren. Folgende konkrete Fragestellungen ergaben sich aus dieser Zielsetzung:

- Welche der in Ratten-EHTs beschriebenen Charakteristika pathologischer kardialer Hypertrophie weisen ERC001-EHTs auf, die eine 12-fache Nachlasterhöhung durchlaufen?
- Sind so stimulierte ERC001-EHTs ein geeignetes Modell pathologischer kardialer Hypertrophie?
- Reagieren Ratten- oder hiPSCM-basierte EHTs mit der Entwicklung physiologischer kardialer Hypertrophie auf die Kultur an unterschiedlich steifen Silikonhalterungen?
- Lässt sich durch die Applikation eines dynamischen Intervall-Nachlast-Programms die Entstehung physiologischer kardialer Hypertrophie in Ratten-EHTs provozieren?
- Welche Form kardialer Plastizität lässt sich in Ratten- und hiPSC-CM-basierten EHTs beobachten, deren Nachlast schrittweise erhöht wird?
- Ist die Durchflusszytometrie ein valides Messverfahren, um (absolute) Kardiomyozyten-Größen als Hypertrophie-Parameter in EHTs zu bestimmen?
- Woher rührt die Zunahme der Kontraktionskraft, die bei steigender Nachlast beobachtet wird?

2 MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Verwendete Materialien

Material	Hersteller	Bestellnummer
Kieferorthopädischer Edelstahldraht, Länge 14 Zoll, Durchmesser 0,016 Zoll (0,406 mm)	Ormco	266-1316
„Hollow Post“-Silikonhalterungen, Maßanfertigung	Siltec GmbH	-
Zylindrischer Neodym-Magnet zur Einführung in die Füße der EHT-Kulturhalterung (d=0,5 mm; h=2,0 mm)	HKCM	9962-63571
Zylindrischer Neodym-Magnet zur Verwendung in der Piezo-Stage (d=13 mm; h=14 mm)	HKCM	9962-551842
Piezoelektrischer Motor, ausgestattet mit einem linearen optischen Encoder	Micronix USA	PPS-20-15206
Motion Controller zur Steuerung des piezoelektrischen Motors	Micronix USA	MMC-100-01000
24-Well-Zellkulturschale	Nunc	142485
Polystyren-Partikel	Spherotech	

2.2 Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Hersteller
Video-optisches Kontraktilitäts-Messsystem mit zugehöriger Software	EHT Technologies
LSRFortessa Durchflusszytometer	BDBiosciences
Qubit Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Paraffinausgiesstation EG1150H	Leica
Kühlplatte EG1150C	Leica
Rotationsmikrotom RM2125 RTS	Leica
Lichtmikroskop Axioskop 2 mit AxioCam-Kamera	Zeiss
O ₂ /CO ₂ -Inkubator	Sanyo
UltiMate 3000 UHPLC-System	Thermo Fisher Scientific
QExactive Plus Quadrupol/Orbitrap-Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific

2.3 Chemikalien und Lösungen

Chemikalie/Lösung	Hersteller	Bestellnummer
Agarose (Phosphatgepufferte Salzlösung; PBS)	Invitrogen	15510-027
Aprotinin (in <i>aqua ad iniectabilia</i>)	Genaxxon Bioscience	M6361.1010
Fibrinogen (200 mg/ml + 0,5 µg Aprotinin pro mg Fibrinogen; 0,9% NaCl)	Sigma-Aldrich	F8630-5
Thrombin (in 60% PBS)	Sigma-Aldrich	605157
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> -Puder hoher Glukoseanteil, mit L-Glutamin und Phenolrot; ohne NaHCO ₃	Gibco	52100-021
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) mit 1 g/l Glukose, 3,7 g/l NaHCO ₃ und Phenolrot; ohne L-Glutamin	Biochrom	0415
Penicillin/Streptomycin 10000 U/ml	Gibco	15140
Insulin 9,5-11,5 mg/mL	Sigma-Aldrich	I9278
Triiodthyronin (T3; 2% 1 mol NaOH, 98% DMEM)	European Comission Joint Research Center	-
Hydrocortison	Sigma-Aldrich	H0888
Y-27632 (10 mM in H ₂ O)	Biorbyt	orb60104
Pferdeserum (gewonnen in Neuseeland)	ThermoFisher Scientific	26050088
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich	S0615
Glutamin	Gibco	25030081
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS) ohne Calcium, ohne Phenolrot	Gibco	14175053
<i>Earle's Balanced Salt Solution</i> (EBSS) mit Glukose, ohne Calcium, ohne Phenolrot	Gibco	14155048
Papain	Sigma-Aldrich	76220
L-Cystein	Sigma-Aldrich	C1276
Phenol	Merck	100206
Chloroform	J.T. Baker	7386
<i>SPLIT-RNA-Extraction-Kit</i>	Lexington	008.48
<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems	4368814
<i>Power SYBR Green PCR Mastermix</i>	Thermo Fisher Scientific	4368577
<i>eBioscience Fixable Viability Dye eFluor 450</i>	Thermo Fisher Scientific	65-0863-14

<i>Bluing Agent</i>	Ventana-Roche	760-2037
Hämatoxylin	Ventana Roche	760-2021
Dystrophin-Primärantikörper, monoklonal	Merck	MAB1645
<i>UltraView Universal DAB Detection Kit</i>	Ventana-Roche	760-500
<i>Tris-Buffered Saline (TBS)</i>	Sigma-Aldrich	T6664
Troponin T-Antikörper für Durchflusszytometrie, mit FITC oder PE markiert	Miltenyi Biotech	130-106-688
Isotyp (REA) Kontroll-Antikörper für Durchflusszytometrie, mit FITC oder PE markiert	Miltenyi Biotech	130-104-613

2.4 qPCR-Primerliste

* PCR-Produkt-Länge

Gen	Beschreibung	RefSeq-Nummer	Sequenz forward	PPL*
			Sequenz reverse	
Primer für <i>Homo Sapiens</i>-Gene				
<i>NPPA</i>	Atriales Natriuretisches Peptid	NM_006172.4	GCTGCTTCGGGGGCAGGATG TGCAGCAGAGACCCCAGGGG	153
<i>NPPB</i>	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>	NM_002521.3	TGCAAGGGTCTGGCTGCTTTGG CACTTCAAAGGCGGCCACAGGG	165
<i>MYH6</i>	Myosin α , schwere Kette	NM_002471.3	TCTTCTCCTCCTACGCAACTG TTGAGATTTCCCGGTGGAGAG	112
<i>MYH7</i>	Myosin β , schwere Kette	NM_000257.4	GCTCTGTGTCTTCCCTGCTGCTC GCTCCTTCTCTGACTTGCGCAGG	159
<i>ACTA1</i>	α -skeletales Aktin	NM_001100.3	AGCAGTTGTAGCTACCCGCCCA GACCATGACGCCCTGGTGTCTG	176
<i>ATP2A2</i>	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums A2	NM_001681.4	ATAGAACGTGCAAATGCCTGC CAGGAGCACCCCTTCACAAAC	160
<i>COL1A1</i>	Alpha-I-Typ-I-Kollagen	NM_000088.3	GGGAATGCCTGGTGAACGTG CCTTGTCACCAGGGGCAC	164
<i>GUSB</i>	β -Glucuronidase	NM_000181.3	ACGATTGCAGGGTTTCACCA CACTCTCGTCGGTGACTGTT	171
<i>CITED4</i>	<i>Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 4</i>	NM_133467.3	CTCCTGCGGGAGGACAGTTT CAATGGCTCAGATTGGGGGA	150
<i>CEBPB</i>	<i>CCAAT/Enhancer-Binding-Protein β</i>	NM_005194.4	CGACGAGTACAAGATCCGGC TGCTTGAACAAGTTCGCAG	186
<i>NFATC2</i>	<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells C2</i>	NM_001136021.3	CTCTGGAGTAAGCCGGATCG GTTTGTATCGACCAGCAGCC	159
<i>IGF1</i>	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor 1	NM_000618.5	ACATTGCTCTCAACATCTCCCA TGGTGTGCATCTTACCTTCA	173
<i>NRG1</i>	Neuregulin 1	NM_001159995.3	TACTGGTGATCGCTGCCAAA AGCTTTTTCCGCTGTTTCTTGG	189
<i>BMP10</i>	Knochenmorphogenetisches Protein 10	NM_005194.4	TGCCCTTGCCAACATCATT ATCCCTTGCACCAGTGTGT	167
Primer für <i>Rattus Norvegicus</i>-Gene				
<i>NPPA</i>	Atriales natriuretisches Peptid	NM_012612.2	CCTCGGAGCCTGCGAAGGTCA TGTGACACACCGCAAGGGCTTG	156
<i>NPPB</i>	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>	NM_031545.1	GACGGGCTGAGGTTGTTTTA ACTGTGGCAAGTTTGTGCTG	195
<i>ACTA1</i>	A-skeletales Aktin	NM_019212.2	AGGACCTGTACGCCAACAAAC ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	195
<i>ATP2A2</i>	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums A2	NM_017290.3	TGCTGGAAGTTGTGATCGAG AGCGTTTCTCTCCTGCCATA	191
<i>COL1A1</i>	Alpha-I-Typ-I-Kollagen	NM_053304.1	TGGACCTCCGGCTCCTGCTC TCGCACACAGCCGTGCCATT	172

2.5 EHT-Herstellung und -Kultur

2.5.1 Gewinnung von Rattenherzzellen

Zur Gewinnung von Rattenherzzellen wurden neugeborene, d.h. 0-3 Tage alte *Wistar*-Ratten verwendet. Die folgenden standardisierten Präparationsschritte wurden von der medizinisch-technischen Assistentin June Uebeler durchgeführt. Die Tiere wurden per Dekapitation getötet und direkt *post mortem* sternotomiert. Das gesamte Herz inklusive Gefäßstumpf wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, die Vorhöfe und Gefäße anschließend von den Ventrikeln getrennt. Das verbleibende Myokard der Herzkammern wurde mittels einer feinen Schere manuell zerkleinert, bis die resultierenden Fragmente eine Größe von 1 mm³ unterschritten. Anschließend folgte ein DNase/Trypsin-Verdau des Gewebes, der auf dem Protokoll von Eschenhagen et al. basiert und detailliert in der Doktorarbeit von Jasper Boeddinghaus geschildert ist (Eschenhagen et al. 1997, Boeddinghaus 2014). 50 µl der so gewonnenen Suspension wurden 1:10 verdünnt und mit Trypanblau gefärbt, dadurch konnte mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl in der finalen Suspension bestimmt werden. Die Zelllösung wurde anschließend bis zur Verwendung zur EHT-Herstellung für höchstens eine Stunde auf Eis gelagert.

2.5.2 Differenzierung von Herzmuskelzellen aus hiPSC

Die zur Herstellung von humanen EHTs benötigten hiPSC-CM wurden von den medizinisch-technischen AssistentInnen Thomas Schulze und Birgit Klampe aus humanen induzierten Stammzellen der Zelllinie ERC001 differenziert. Diese auf Fibroblasten eines (herz)gesunden Probanden basierende Zelllinie wird aufgrund ihrer guten Differenzierbarkeit institutsintern regulär als Kontrollzelllinie verwendet. Die Differenzierung erfolgte anhand des Protokolls von Breckwoldt et al (2017), auf das zur detaillierten Darstellung der Vorgänge verwiesen wird. In Kürze wurde durch die Kultivierung von hiPSC in *Spinner Flasks* die Formierung von *Embryoid Bodies* forciert. Die Differenzierung der Stammzellen zu kardialen mesodermalen Vorläuferzellen wurde durch die Verwendung der Proteine Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2, knochenmorphogenetisches Protein 4 und Activin A induziert. Die finale Differenzierung zu Kardiomyozyten erfolgte durch die Supplementierung der Zellen mit Insulin bei gleichzeitiger Blockade des Wnt-Signalweges durch die Verwendung des *Small Molecule* DS-I-7. Nach Abschluss der Differenzierung nach 14 Tagen wurden die *Embryoid Bodies* durch den Zusatz von Kollagenase dissoziiert, die Zellzahl in der Suspension wurde wiederum mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt zur Herstellung von EHTs genutzt oder aber eingefroren.

2.5.3 Herstellung von EHTs

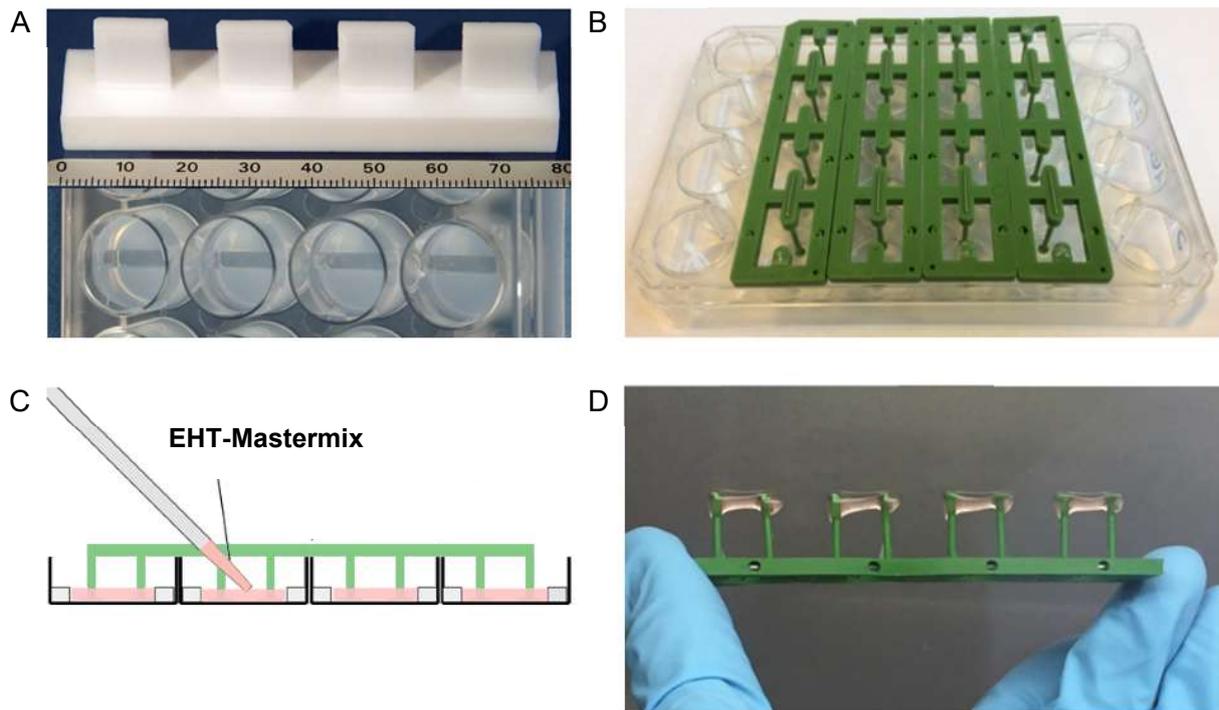


Abb. 3.1: Schritte der EHT-Herstellung. (A) Teflon-Platzhalter wurden genutzt, um Mulden in aushärtender Agarose zu formen. (B) Die Füße der EHT-Silikonhalterungen wurden in den Mulden platziert. (C) Der Mastermix wurde um die Füße der Halterungen herum in die Agarose-Mulde pipettiert. (D) Nachdem das Fibrinogen im Mastermix zu Fibrin polymerisiert war, konnten die fertigen EHTs aus den Agarosemulden entfernt werden. Abbildungen modifiziert nach Hansen, Eder et al. und Sørensen (2010, 2013).

Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurde auf Eis der Mastermix vorbereitet (Zusammensetzung siehe Tabelle unten). Danach wurden in jede Vertiefung einer 24-Well-Kulturplatte 1,5 ml einer bei 60°C gelagerten, autoklavierten 2%igen Agaroselösung pipettiert. Umgehend wurden PTFE-Platzhalter (siehe Abb. 3.1.A) in der noch flüssigen Agarose versenkt. Wenn die Agarose nach circa 15 Minuten ausgehärtet war, wurden die Platzhalter entfernt und die Silikonhalterungen zur EHT-Kultur so eingebracht, dass je zwei Füße der Halterung in einer der durch die Platzhalter vorgeformten Mulden Platz fanden (siehe Abb. 3.1.B). Nun wurden pro EHT 100 µl des Mastermix mit 3 µl einer auf 100 U/ml konzentrierten Thrombin-Lösung in einer Pipettenspitze vermischt und schnellstens um die Silikonfüße herum in die Agarosemulde pipettiert (siehe Abb. 3.1.C). Der Mastermix wurde während des EHT-Herstellungsprozesses regelmäßig vermischt, um ein Verklumpen oder Sedimentieren der enthaltenen Rattenherzzellen oder hiPSC-CM zu vermeiden. Nach Abschluss des Pipettierens wurden die EHTs für 1,5 Stunden bei 37°C, 7% CO₂, 40% O₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Fibrinogen im Mastermix durch Thrombin zu Fibrin gespalten und polymerisiert – dadurch nahm der einstmalig flüssige Mastermix eine gelartige Konsistenz an. Anschließend wurde jedes EHT mit circa 200 µl warmen DMEM oder EHT-Kulturmedium überschichtet, um das Herauslösen aus

der Agarose zu erleichtern. Schließlich konnten die EHTs an den Silikonhalterungen nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit vorsichtig aus den Agarosemulden gezogen (siehe Abb. 3.1.D) und in eine vorbereitete 24-Well-Kulturplatte überführt werden. Die Silikonhalterungen wurden nach Ende der EHT-Kultur und vor der nächsten Nutzung zweimal ausgekocht, dann (genau wie die PTFE-Platzhalter) autoklaviert und steril verwahrt.

Zusammensetzung EHT-Mastermix für 24 EHTs (inkl. 10% Aufschlag für Pipettierverluste)		
Bestandteil	Menge in Ratten-EHTs	Menge in humanen EHTs
Zellen	13,2 x 10 ⁶	26,4 x 10 ⁶
2x DMEM	148 µl	
Fibrinogen	66 µl	
Y-27632	-	2,6 µl
Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM)	ad 2640 µl	

Zusammensetzung 2x DMEM 20ml	
Bestandteil	Menge
DMEM-Puder	536 mg
Pferdeserum	4,8 ml
Penicillin/Streptomycin	0.4 ml
<i>Aqua ad iniectionabilia</i>	ad 20 ml

Zusammensetzung NKM	
Bestandteil	Volumenanteil
DMEM	88%
Fetales Kälberserum	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Glutamin	1%

2.5.4 EHT-Kultur

EHTs wurden in 24-Well-Platten kultiviert und in Zellkulturinkubatoren bei 37°C, 7% CO₂, 40% O₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit verwahrt. Sowohl die Herstellung als auch der Wechsel des EHT-Mediums fand unter einer Zellkultur-Abzugshaube, d.h. unter sterilen Bedingungen statt. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt – montags, mittwochs und freitags. Pro 24 EHTs wurden zwei Kulturplatten genutzt. Während die EHTs in einer dieser Platten aufbewahrt wurden, wurde zum Medienwechsel aus der anderen Platte das alte Medium abgesaugt. Danach wurden pro EHT 1,5 ml reguläres EHT-Kulturmedium in die Vertiefungen der jetzt leeren Platte pipettiert. Anschließend wurden die EHTs unter einer Zellkultur-Abzugshaube in die Wechselplatte mit neuem Medium überführt. EHTs kontrahierten mikroskopisch sichtbar i.d.R. ab dem 3. bis 5. Tag in Kultur, diese Kontraktionen ähnelten in ihrem Muster zunächst einem unkoordinierten „Flimmern“. Nach 3 bis 5 weiteren Tagen entwickelten die EHTs koordinierte Kontraktionen, die makroskopisch sichtbar und Videooptisch analysierbar waren.

Zusammensetzung EHT-Kulturmedium	
Bestandteil	Volumenanteil/Konzentration
DMEM	~89%
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	10%
Penicillin/Streptomycin	1%
Aprotinin	33 µg/ml
Insulin	10 µg/ml

Während potenziell Hypertrophie-induzierender Interventionen wurden die Kulturbedingungen gemäß den Experimenten von Hirt, Sörensen et al. (2012) angepasst, da das Vorhandensein von Pferdeserum im Kulturmedium erwiesenermaßen einen starken Hypertrophie-Reiz darstellt (Simpson et al. 1982) und somit Ergebnisse verfälschen könnte. Um diesen ungewollten Hypertrophie-Reiz zu umgehen, wurde zunächst für einen Medienwechsel der Anteil des Pferdeserums im Kulturmedium von 10% auf 4% reduziert, die restliche Konstitution des Mediums blieb unverändert. Für die Dauer des Experiments wurden die EHTs dann in serumfreiem Medium kultiviert, der Medienwechsel erfolgte in diesem Zeitraum täglich.

Zusammensetzung serumfreies EHT-Kulturmedium	
Bestandteil	Volumenanteil/Konzentration
DMEM	~99%
Penicillin/Streptomycin	1%
Aprotinin	33 µg/ml
Insulin	10 µg/ml
Triiodthyronin	0,5 ng/ml
Hydrocortison	50 ng/ml

2.6 Nachlastmodulation im EHT

Um die biologischen Effekte von Nachlastveränderungen auf EHTs untersuchen zu können, musste die Nachlast der EHTs beeinflussbar sein. Die Nachlast eines EHT ist definiert durch die Steifigkeit der Silikonhalterung, die es verbiegen muss, um verkürzend kontrahieren zu können. Drei verschiedene Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt, um ebendiese Steifigkeit zu beeinflussen.

2.6.1 Silikonhalterungen unterschiedlicher basaler Steifigkeit

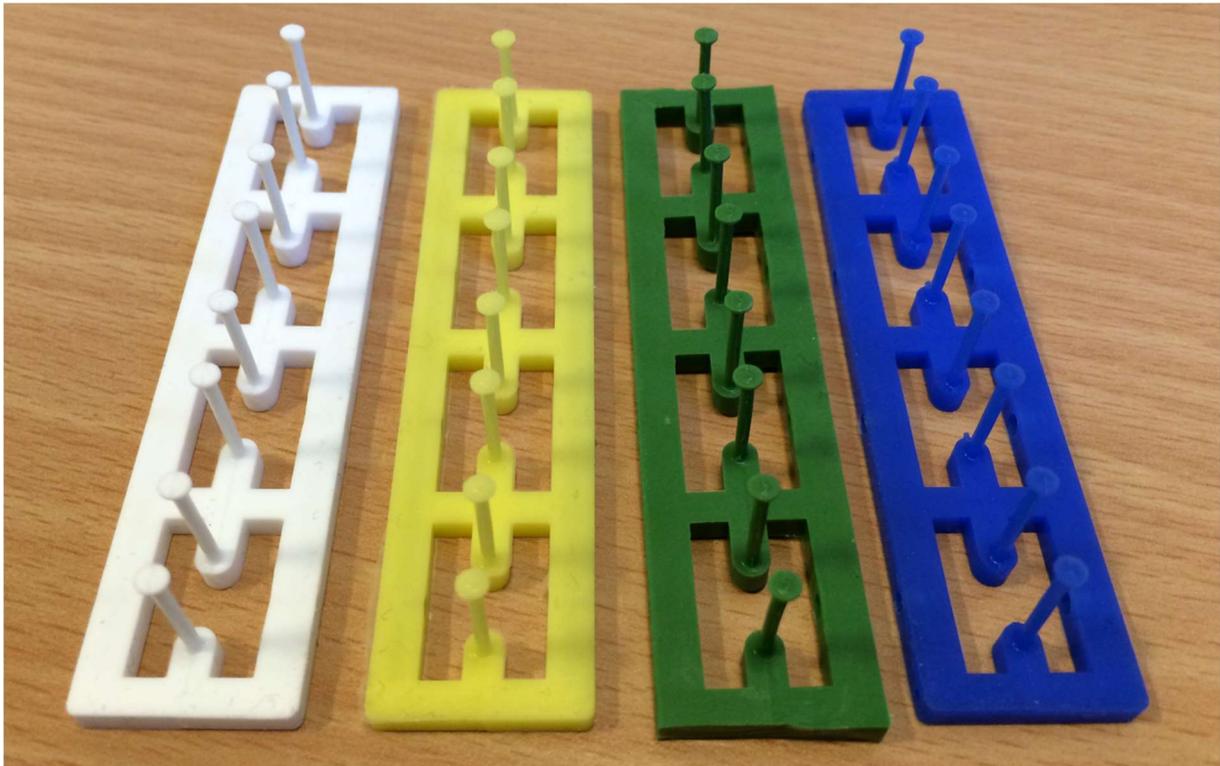


Abb. 3.2: Industriell gefertigte EHT-Halterungen aus Silikon verschiedener Härte

Für diese Arbeit wurden EHT-Halterungen genutzt, die (im Gegensatz zu vergangenen Arbeiten; Sörensen 2013) industriell von der Siltec GmbH angefertigt worden waren. Eine Besonderheit dieser Silikonhalterungen war, dass die Füße, an denen die EHTs kultiviert wurden, hohl waren; dies ermöglichte das Einführen von Edelstahlklammern und Magneten. Bei der Herstellung dieser Halterungen kamen Silikone verschiedener Härte zum Einsatz, sodass sich die Füße der fertigen Halterung je nach Material in ihrer Steifigkeit unterschieden. Durch die gleichzeitige Verwendung verschiedener Halterungen konnten EHTs aus einem Experiment verschiedenen Nachlasten ausgesetzt werden.

Farbe der Silikonhalterung	Silikonhärte	Steifigkeit der Silikonfüße
Weiß	40 Shore	0,60 mN/mm
Gelb	50 Shore	0,80 mN/mm
Grün	60 Shore	1,24 mN/mm
Blau	70 Shore	2,11 mN/mm

2.6.2 Edelstahlklammern zur Nachlasterhöhung

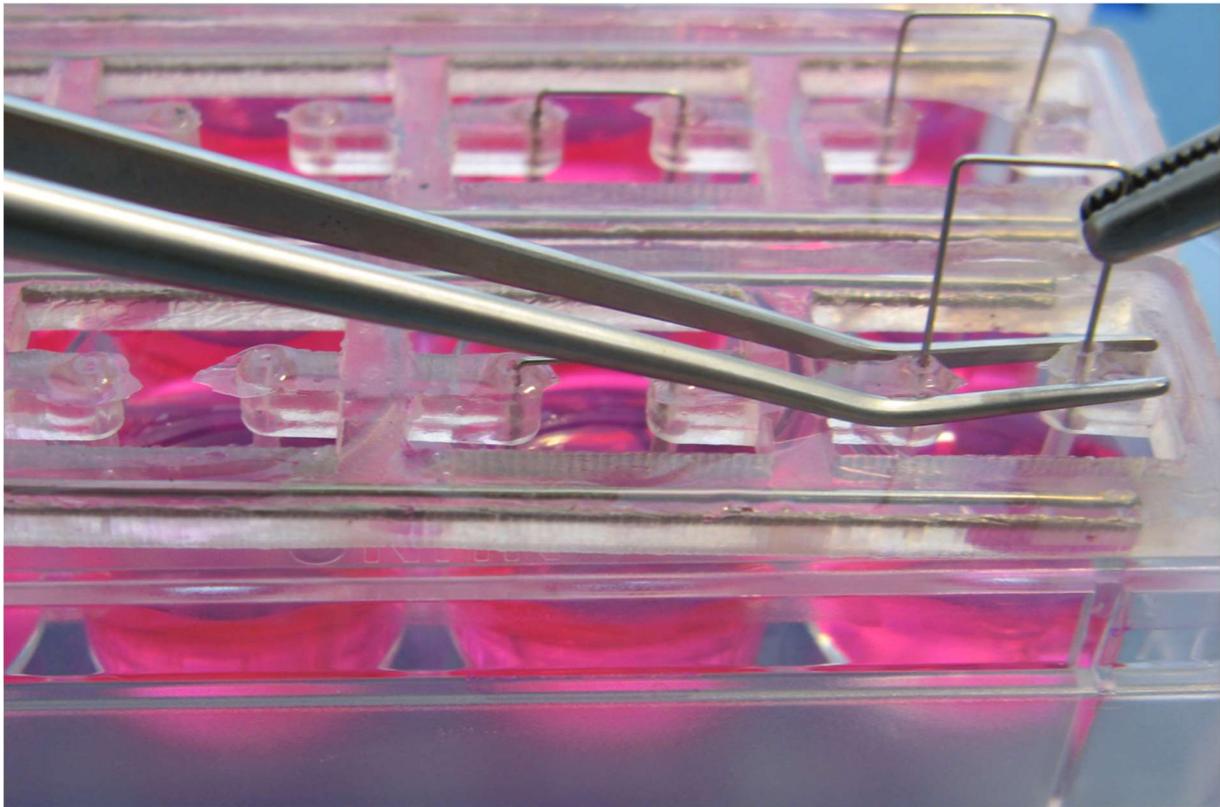


Abb. 3.3: Einbringen einer Klammer in die hohlen Füße einer EHT-Kultur-Silikonhalterung. Abbildung modifiziert nach Sørensen (2013).

Um eine drastische Nachlast-Erhöhung während der EHT-Kultur zu ermöglichen, wurden von Hand Edelstahlklammern hergestellt, die sich in die hohlen Füße der EHT-Silikonhalterungen einführen ließen. Zu diesem Zwecke wurden Stücke runden kieferorthopädischen Edelstahldrahtes (0,4 mm im Durchmesser) mit einer Rundzange zurechtgebogen und mit einem Seitenschneider auf Maß gekürzt. Die Schnittstellen wurden mit einer Metallfeile abgerundet. Um zu gewährleisten, dass die Klammern die Füße der Silikonhalterung nicht zusammen- oder auseinanderbiegen würden, wurde jede Klammer am Ende des Fertigungsprozesses einmal in eine EHT-Silikonhalterung „probegesteckt“ und der korrekte Sitz überprüft. Die Edelstahlklammern wurden in 70%iger Ethanolösung gelagert und vor Benutzung in steriler PBS-Lösung gewaschen, um das Einbringen von Ethanol in die EHT-Kulturplatte zu vermeiden. Die Klammern wurden mittels eines autoklavierten Sets verschiedener Pinzetten in die hohlen Silikonfüße gesteckt. Das Aufbringen eines Tropfens steriler PBS-Lösung auf die Eintrittspunkte der Klammer erleichterte dabei das Einstecken. Die resultierende Nachlasterhöhung (*Afterload-Enhancement*; AE) wurde für 7 Tage aufrechterhalten. Am Ende des Versuchs wurden die Klammern vorsichtig wieder mithilfe der autoklavierten Pinzetten entfernt, bevor die EHTs für weitere Analysen eingefroren oder fixiert wurden.

2.6.3 Nachlastmodulation durch Magnetismus: Die „Piezo-Stage“

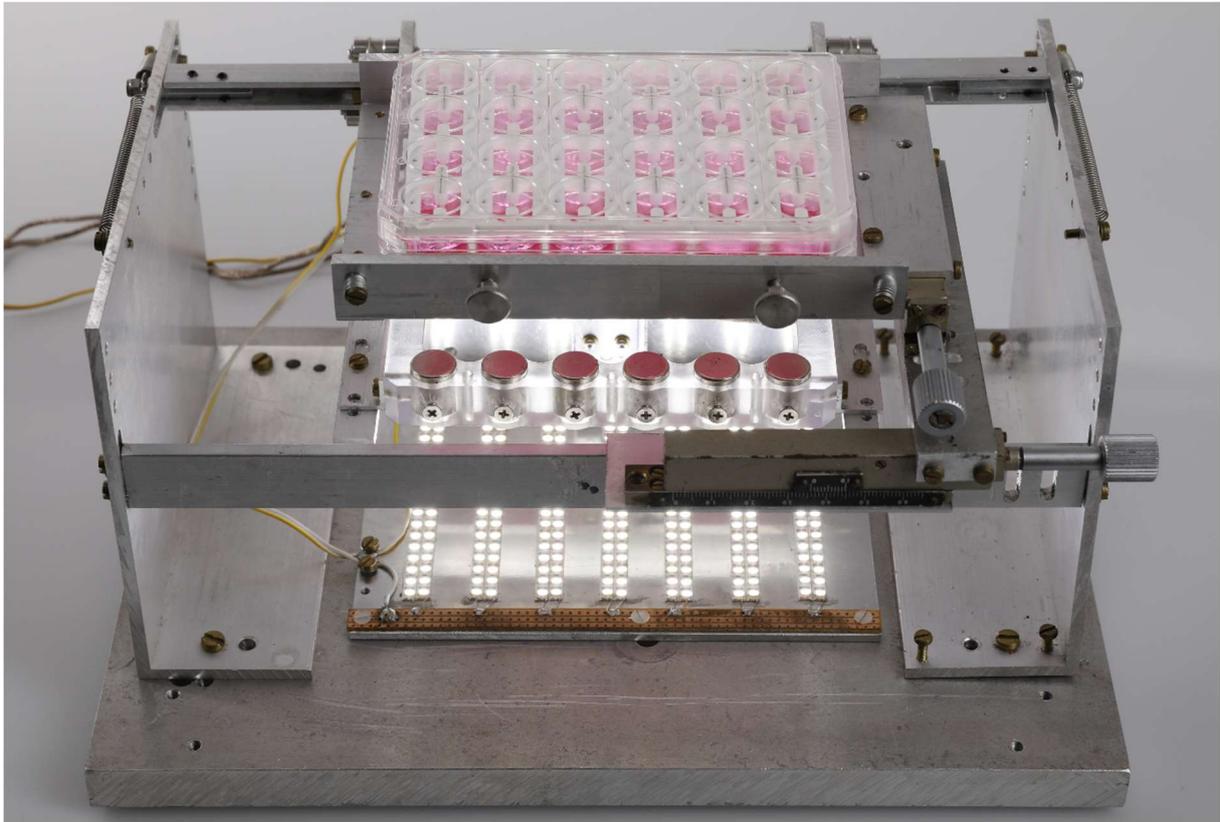


Abb. 3.3: *Piezo-Stage* mit eingesetzter EHT-Kulturplatte.

Um komplexere Nachlastmodulationen zu realisieren, als allein durch die Verwendung der bereits erwähnten verschieden steifen Silikonhalterungen und Edelstahlklammern möglich gewesen wäre, wurde die sogenannte „*Piezo-Stage*“ genutzt. Das Prinzip dieser von Marita L. Rodriguez konstruierten Vorrichtung macht sich magnetische Anziehungskräfte zunutze: Ähnlich wie die unter 3.6.2 beschriebenen Metallklammern wurden kleine, zylinderförmige Magnete in die Füße der EHT-Silikonhalterungen eingebracht. Unterhalb der so präparierten EHT-Silikonhalterungen befand sich eine Platte mit in Plexiglas eingelassenen Magnetzylindern („Magnetplatte“), die axial zu den Magneten in den Silikonhalterungen ausgerichtet waren. Durch das Auf- und Abbewegen der Magnetplatte veränderte sich die Intensität der magnetischen Anziehungskräfte zwischen den Plattenmagneten und den *Post*-Magneten und dadurch in der Konsequenz auch die Steifigkeit der Silikonfüße. Der Aufbau und die Funktion der einzelnen Bestandteile dieser Apparatur werden im Folgenden beschrieben; trotzdem soll an dieser Stelle auf die Publikationen von Rodriguez, Werner, **Becker** et al. (2019) und **Becker**, Rodriguez et al. (2020) verwiesen werden, die weitere technische Aspekte dieser Methode eingehend behandeln bzw. die Durchführung von Experimenten mit der *Piezo-Stage* anhand eines Videos veranschaulichen.

2.6.3.1 Herstellung von Magnet-Silikonhalterungen

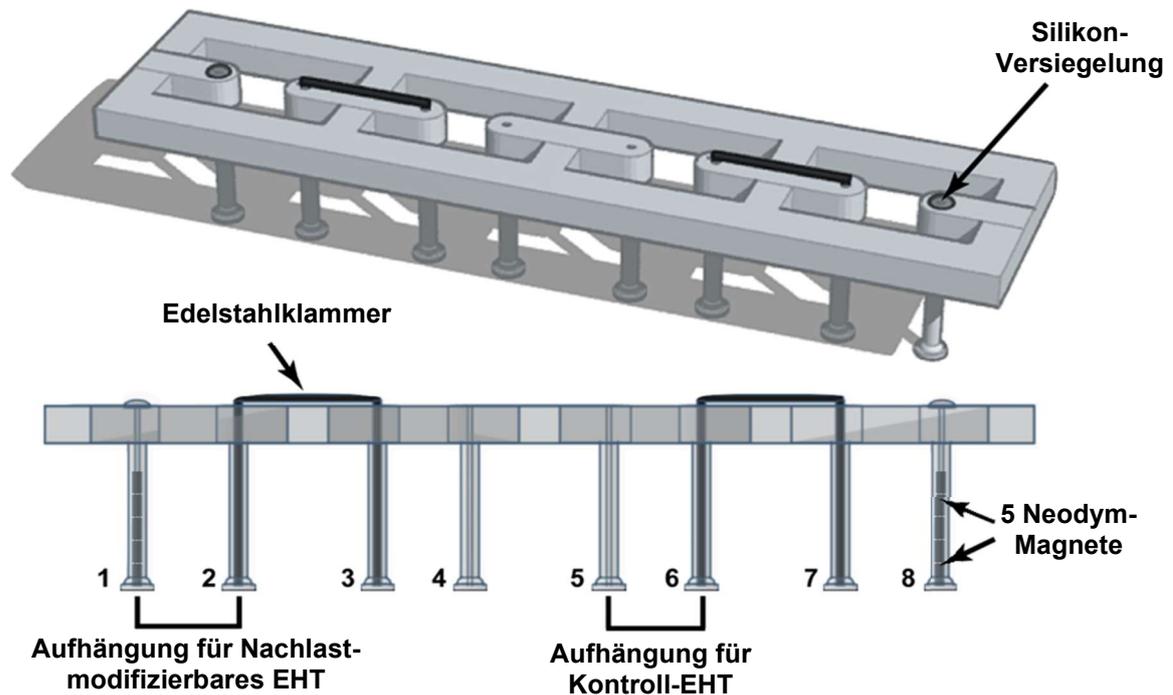


Abb. 3.4: Aufbau von EHT-Silikonhalterungen für die Verwendung mit der Piezo-Stage.
Abbildung modifiziert nach Rodriguez, Werner, Becker et al. (2019).

Als Basis für die Herstellung von *Piezo-Stage*-kompatiblen EHT-Halterungen dienten weiße *Hollow-Post*-Silikonhalterungen mit einer Materialhärte von 40 Shore. Zunächst wurde die Polarität eines kleinen, zylindrischen Neodym-Magneten mithilfe eines Testmagneten bestimmt. Dann wurde die obere Öffnung eines der beiden äußeren Silikonfüße einer EHT-Halterung mit PBS-Lösung befeuchtet und anschließend der noch auf der Oberfläche des Testmagneten anhaftende kleine Neodym-Magnet in den hohlen Silikonfuß eingesteckt. Ein abgefeiltes Stück kieferorthopädischen Edelstahl-Drahtes wurde verwendet, um den Magneten bis zum unteren Ende des Silikonfußes vorzuschieben. Mit dieser Technik wurden in jedem der insgesamt 12 äußeren Silikonfüße von 6 EHT-Kulturhalterungen 5 Magnete mit gleichbleibender Polarität „übereinandergestapelt“. Um Korrosionsvorgängen vorzubeugen, wurden die Silikonhalterungen zwei Tage lang getrocknet und anschließend die magnetischen Silikonfüße mit einem kleinen Tropfen Silikonkleber versiegelt. Damit eine Veränderung der Steifigkeit des magnetischen Silikonfußes tatsächlich eine berechenbare Auswirkung auf die Nachlast des entsprechenden EHTs haben konnte, musste der nicht-magnetische zweite Silikonfuß durch eine Klammer fixiert werden; ansonsten würde bei einer zunehmenden Steifigkeit des magnetischen Fußes das kontrahierende EHT lediglich den viel weicheren anderen Fuß weiter auslenken. Um dies zu verhindern, wurden ähnlich dem in 3.6.2 beschriebenen Vorgang von Hand Edelstahlklammern hergestellt, die je einen Fuß eines äußeren und einen Fuß eines im Inneren auf der Silikonhalterung kultivierten EHT fixierten.

So ergab sich der in Abb. 3.4 dargestellte Aufbau einer *Piezo-Stage*-kompatiblen EHT-Silikonhalterung: Die beiden äußeren der vier EHTs wurden an einem magnetischen und einem fixierten Silikonfuß kultiviert, die beiden inneren „Kontroll“-EHTs an einem fixierten und einem nicht weiter modifizierten Silikonfuß.

2.6.3.2 Aufbau der *Piezo-Stage*

Bei der Konstruktion der *Piezo-Stage* wurden, soweit möglich, nicht-magnetische Materialien wie Aluminium und Messing verbaut, um unerwünschte Wechselwirkungen mit den verwendeten Magneten zu vermeiden. Das namensgebende Herzstück der *Piezo-Stage* war ein Piezomotor der Firma *Micronix USA* mit einem linearen Bewegungsumfang von 51 mm. Ausgestattet mit einem linearen optischen Encoder konnte der Motor auf 1 nm genau auf eine bestimmte Position bewegt werden. Um solche Bewegungen programmieren zu können, war ein sog. „*Motion Controller*“ vonnöten, dieser bildete die Schnittstelle zwischen Computer und Piezomotor. An der sich vertikal bewegenden Oberfläche des Motors war mittels eines Aluminiumwinkels die eingangs erwähnte Plexiglasplatte mit 12 eingelassenen Magneten befestigt, die also horizontal ausgerichtet war. Der Abstand dieser „Platten-Magnete“ zueinander entsprach dem Abstand der äußersten Silikonfüße der EHT-Halterung in der Kulturschale zueinander. Die Neodym-Magneten ($d=13\text{ mm}$; $h=14\text{ mm}$) wurden durch Schrauben in der Plexiglasplatte festgeklemmt, um zu verhindern, dass sich die gegenseitig anziehenden Magneten aus der Platte lösen und aneinanderschlagen können. Die Polarität dieser Magneten entsprach der Polarität der in 3.6.2.1 beschriebenen Magneten in den Silikonfüßen der EHT-Halterung. Da die Gewichtskraft der Magnetplatte samt Aluminiumwinkel die maximale Last des Piezomotors in der entsprechenden Ebene (2 Newton) deutlich überstieg, wurde eine Messingrolle als Gegengewicht verwendet. Die Messingrolle war durch zwei Stücke chirurgischen Fadens, die je über zwei Rollen gelagert wurden, mit dem Aluminiumwinkel bzw. der Magnetplatte verbunden. Die erste von M. L. Rodriguez konstruierte Version der *Piezo-Stage* wies lediglich eine Rolle pro Faden auf; durch die Verwendung zweier Rollen pro Faden wurde sichergestellt, dass dieser stets in einem gleichbleibenden rechten Winkel vom Gegengewicht bzw. Magnetplatte aus nach oben verlief und sich deren Befestigungswinkel nicht während der Auf- und Abbewegung des Motors veränderte. Oberhalb der vertikal beweglichen Magnetplatte befand sich eine Halterung, in der eine 24-Well-Kulturplatte mittels einer per Rändelschrauben verstellbaren Klemmplatte fixiert werden konnte. Diese Halterung war durch zwei Feintriebe in der horizontalen Ebene frei beweglich, um die kleinen Magneten in den Silikonfüßen möglichst präzise axial zu den darunter befindlichen großen Magneten in der Plexiglasplatte ausrichten zu können. Um die videooptische Analyse der Kontraktilität der in der *Piezo-Stage* kultivierten EHTs zu ermöglichen, mussten die EHTs von der Unterseite beleuchtet werden. Zu diesem Zweck wurde sieben LED-Streifen benutzt, die auf einer Aluminiumplatte aufgebracht bzw. an

Kupferstreifen in Reihe verlötet waren. Die Stromzufuhr der LEDs war mit einem Dimmer versehen, um einer Erwärmung des EHT-Kulturmediums durch übermäßige Beleuchtung vorzubeugen.

2.6.3.3 Einsatz der Piezo-Stage zur Nachlastmodifikation

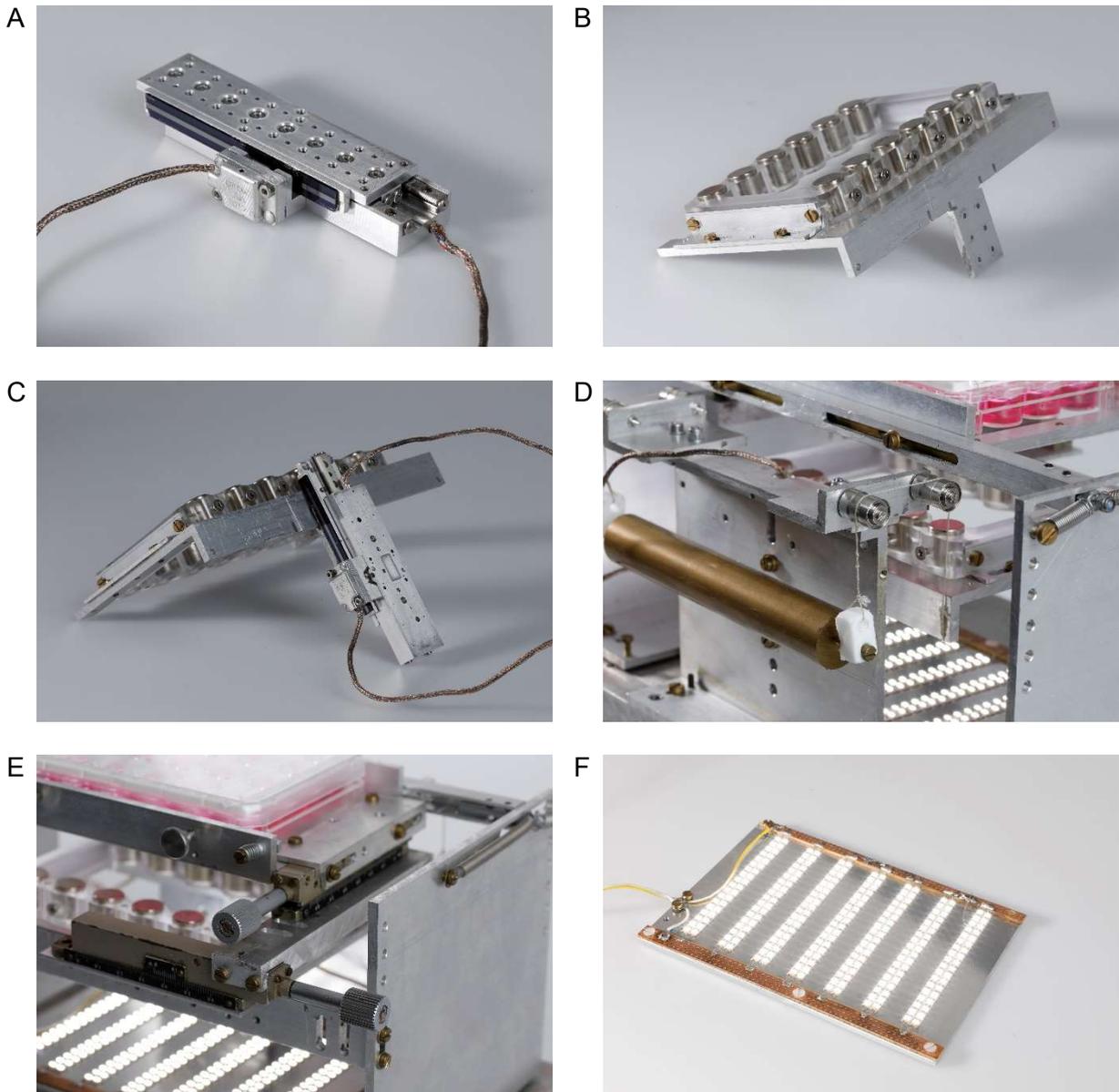


Abb. 3.5: Einzelne Bauteile der *Piezo-Stage*. (A) Linearer Piezomotor mit optischem Encoder. (B) Aluminiumwinkel und Plexiglasplatte mit eingelassenen Magneten. (C) Via Aluminiumwinkel am Piezomotor befestigte Magnetplatte. (D) Über insgesamt vier Rollen gelagerte Messingrolle als Gegengewicht zur Magnetplatte. (E) EHT-Kulturplatten-Halterung, über die zwei abgebildeten Feintriebe in der Horizontalebene beweglich. (F) LED-Platte zur Beleuchtung der EHTs von unten.

Die Steifigkeit der Magnet-EHT-Silikonhalterungen (und damit auch die Nachlast der daran kultivierten EHTs) war im *Piezo-Stage*-System abhängig von dem Abstand der großen „Plattenmagneten“ zu den kleinen Magneten in den Silikonfüßen: Je geringer diese Distanz D , desto stärker die magnetischen Anziehungskräfte und desto höher die Nachlast k . Um eine

präzise Einstellung gewünschter Nachlastwerte zu ermöglichen, wurde dieser physische Zusammenhang zwischen Magnetabstand und resultierender Nachlast durch optische Messungen bestimmt: Kleine Gewichte wurden bei verschiedenen Magnet-Distanzen an einen horizontal ausgerichteten Magnet-Silikonfuß gehängt; durch die optisch messbare resultierende Auslenkung des Silikonfußes konnte dessen Steifigkeit bei der jeweiligen Magnet-Distanz berechnet werden. Ein Beispiel für eine solche Messung findet sich Anhang dieser Arbeit.

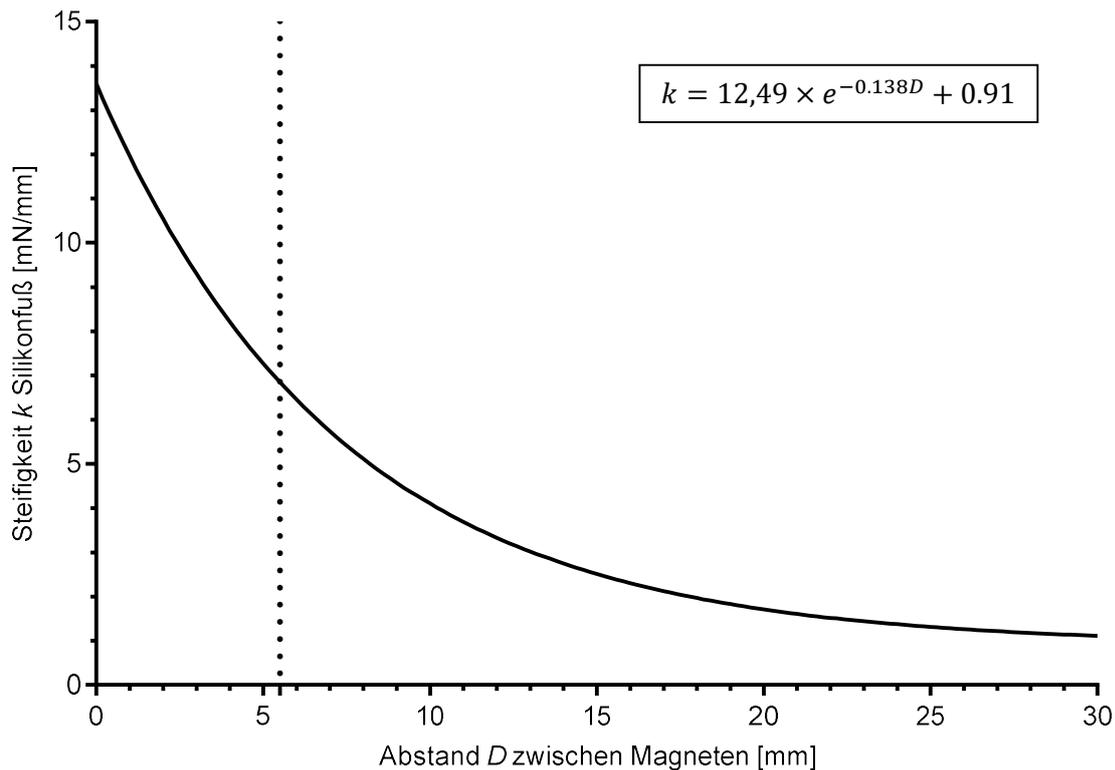


Abb. 3.6: Exponentieller Zusammenhang zwischen Magnet-Abstand und resultierender Steifigkeit. Die Durchgezogene Linie repräsentiert den optisch gemessenen Zusammenhang zwischen zunehmender Magnet-Distanz und abnehmender Nachlast. Die gestrichelte Linie entspricht der höchsten einstellbaren Nachlast von 6,81 mN/mm bei 5,5 mm Abstand in diesem System; bei diesem Abstand stieß die Magnetplatte an den Boden der EHT-Kulturplatte.

Die gemessenen Steifigkeitswerte ließen sich annäherungsweise durch die exponentielle Funktion $k = 12,49 \times e^{-0.138D} + 0.91$ bzw. umgestellt $D = -0.138 \times \ln \frac{k-0.91}{12.49}$ beschreiben. Die größte mithilfe der *Piezo-Stage* an „weißen“ Magnet-Silikonhalterungen applizierbare Nachlast betrug $k=6,81$ mN/mm beim geringsten möglichen Abstand $D=5,5$ mm; das EHT-Nährmedium-Reservoir unterhalb der Magnet-Silikonhalterung verhinderte, dass die Magnetplatte noch näher gerückt werden konnte. Die geringste applizierbare Nachlast betrug 0,91 mN/mm, gleichzeitig die basale Steifigkeit der Magnet-Silikonfüße in Abwesenheit anderer Magneten. Die Kontroll-EHTs wurden konstant bei einer Nachlast von 0,6 mN/mm kultiviert, der Steifigkeit eines nicht-modifizierten „weißen“ Silikonfußes.

Um die Nachlast der an Magnet-Silikonhalterungen kultivierten EHTs auf einen bestimmten Wert einzustellen, wurde der gewünschte Nachlastwert in die oben angegebene Funktion eingesetzt und die nötige Magnet-Distanz errechnet. Anschließend wurde mithilfe der *Motion Controller Platform Software* (Micronix, USA) die auf dem Piezomotor montierte Magnetplatte zu dieser Distanz bewegt. Zu jedem Zeitpunkt wurde dabei mittels des optischen Encoders die *Ist-* und die *Soll-*Position des Motors abgeglichen und die Positionierung ggf. angepasst. Dieser „*Feedback-Loop*“ stellte sicher, dass z.B. nach versehentlichem Verschieben der Magnetplatte diese wieder in ihre Ursprungsposition zurückbewegt wurde.

Außerdem war es möglich, mittels der Software eine sich automatisch wiederholende Abfolge von Piezomotor-Bewegungen zu programmieren. So konnte ein Nachlast-Regime appliziert werden, das in Intervallen von 90 Sekunden zwischen maximaler und minimaler möglicher Nachlast wechselte.

2.7 Video-optische Kontraktilitätsanalyse von EHTs

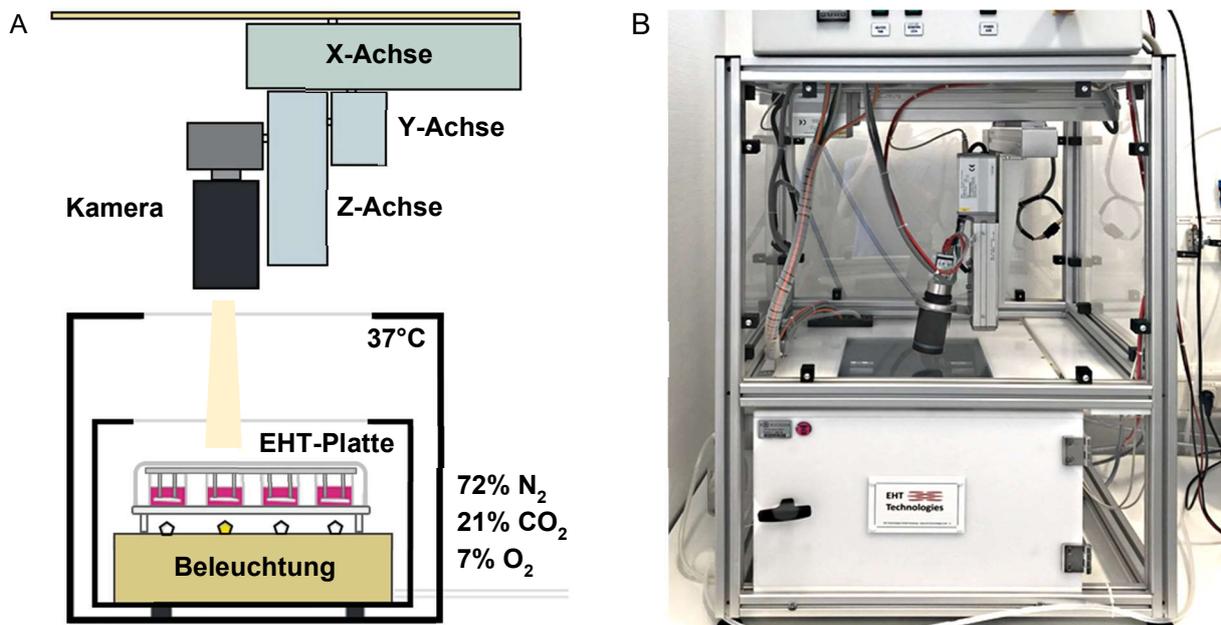


Abb. 3.7: Messstand zur video-optischen Kontraktilitätsanalyse von EHTs. (A) Schematische Zeichnung des Aufbaus der Apparatur. (B) Tatsächlicher Messstand im Labor. Insbesondere die Anordnung der Achsenmotoren und der Kamera lassen sich gut in Bezug auf die schematische Darstellung nachvollziehen. Abbildung (A) modifiziert nach Hansen, Eder et al. (2010).

Um die kontraktile Funktion schlagender EHTs zu analysieren, kam das von Hansen et al. (2010) im Institut entwickelte und von EHT Technologies vertriebene video-optische Messsystem zum Einsatz. Den oberen Teil des Messstandes bildete eine Kamera, die an einem XYZ-System linear beweglicher und per Computer programmierbarer Motoren befestigt war. Der untere Teil des Messstandes bestand aus zwei Boxen, beide mit transparenter oberer Wand: einer äußeren Box, die mit Dämmungsmaterial ausgekleidet war, und einer inneren Box, die sich innerhalb der äußeren befand, auf 37 °C beheizt wurde und der Verwahrung der EHT-Kulturplatten diente. In den abgedichteten und mit einem Auslassventil ausgestatteten inneren Kasten wurde kontinuierlich ein feuchtigkeitsgesättigtes Gasgemisch bestehend aus 72% N₂, 21% CO₂ und 7% O₂ eingeleitet – im Prinzip herrschten dort also dieselben atmosphärischen Bedingungen wie in den Inkubatoren, die zur EHT-Kultur verwendet wurden. Neben einem CO₂- und einem Temperatursensor befand sich in der inneren Box eine Platte mit 24 einzeln einschaltbaren LEDs, auf der mittels einer spezifischen Halterung eine 24-Well-Kulturplatte mit EHTs befestigt wurde. Um Kontraktilitätsmessungen an EHTs durchzuführen, die auf der *Piezo-Stage* kultiviert wurden, wurde die 24-LED-Beleuchtungsplatte samt 24-Well-Plattenhalterung aus der inneren Kiste entfernt und stattdessen die Piezostage mit eigener Beleuchtungsplatte (siehe Abschnitt 2.6.3.2) in die innere Kammer gestellt. Über eine speziell für dieses System entwickelte Software wurden die Kontraktilitätsmessungen programmiert: Zunächst wurde für jedes zu messende EHT die korrekte Position der frei beweglichen Kamera manuell eingestellt und gespeichert, danach fuhr die Kamera die eingestellten Positionen

automatisch ab und filmte jedes der schlagenden EHTs über einen einstellbaren Zeitraum. Bei regulären Messungen wurde stets nur das EHT mittels LED von unten beleuchtet, das tatsächlich auch gerade von der Kamera aufgenommen wurde – so konnte einer Überwärmung des Mediums durch übermäßigen Lichteinfall vorgebeugt werden. Bei Messungen an *Piezo-Stage*-EHTs war die Beleuchtung einzelner EHTs nicht möglich.

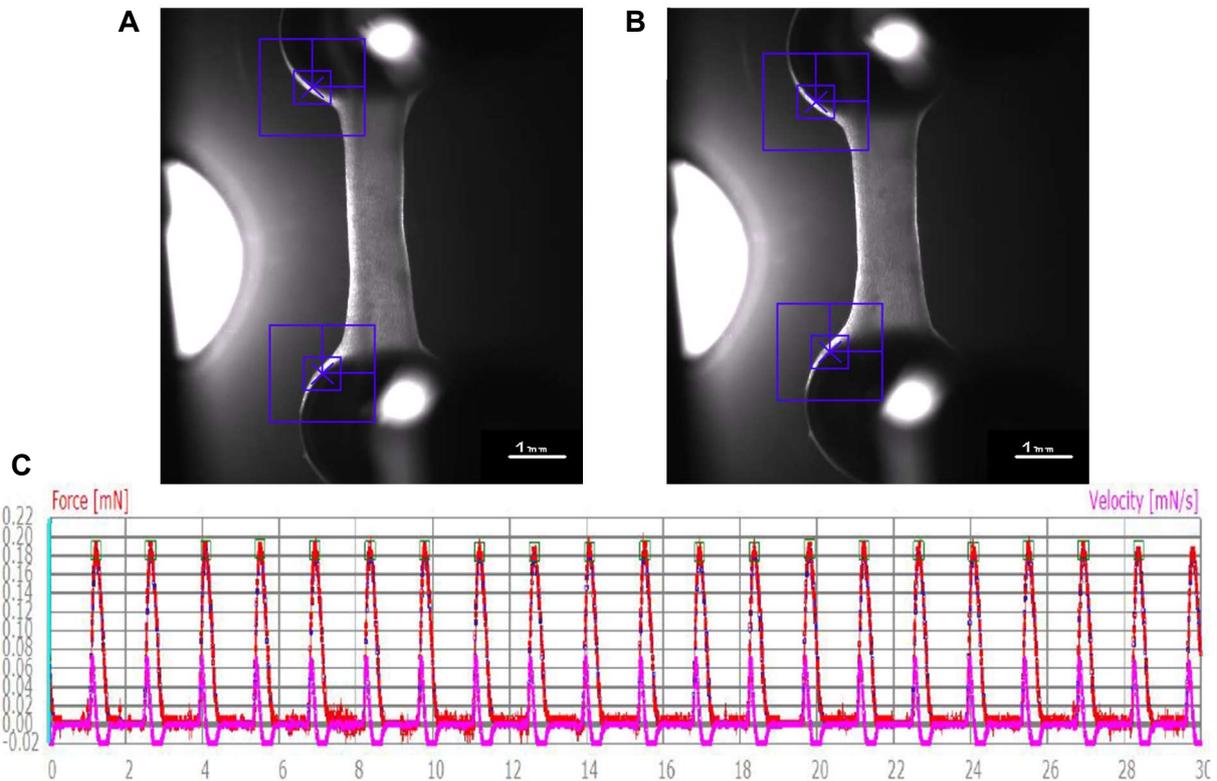


Abb. 3.8: Arbeitsweise der Kontraktions-Analyse-Software. (A) Durch die Kamera des Messsystems fotografiertes entspanntes EHT mit blau markierten Bildpunkten zur Verfolgung der Längenänderung. (B) Das gleiche EHT während der Kontraktion, der Abstand zwischen den markierten Bildpunkten ist verkürzt. (C) Durch die Software aus der Längenänderung errechnete Kraft bzw. Kraftänderungsgeschwindigkeit, aufgetragen gegen die Zeit.

Die Videoaufnahmen schlagender EHTs wurden während der Messung in Echtzeit analysiert: Die Software konnte durch das Verfolgen zweier Bildpunkte, die je ein Ende des EHTs markierten, die Längenänderung des EHTs während der Kontraktionen messen. Aus dieser Längenänderung über die Zeit konnte die Software - zusammen mit Daten über die Materialeigenschaften und die Geometrie der Silikonhalterungen – automatisiert eine Vielzahl an kontraktile Parametern errechnen, so z.B. eine durchschnittliche Kontraktionskraft, die Schlagfrequenz oder verschiedene Kontraktions- und Relaxationszeiten. Um die Präzision der Messung zu erhöhen, konnte über verschiedene Parameter festgelegt werden, welche gemessenen Längenänderungen tatsächlich als Kontraktionen in die Analyse gingen – so konnte beispielsweise durch die Festlegung einen Schwellenwerts für die Kontraktionskraft sichergestellt werden, dass kein Bildrauschen die Messung verfälschen würde.

2.8 Durchflusszytometrie

Die Messung der Zellgröße von Kardiomyozyten ist nötig, um Aussagen über das Vorliegen von kardialer Hypertrophie treffen zu können. Die Durchflusszytometrie erschien als eine praktikable Methode, um zur Zellgröße proportionale optische Streuungsparameter bei vielen tausenden Zellen innerhalb kürzester Zeit zu erfassen. Um in den EHTs enthaltene Kardiomyozyten der Durchflusszytometrie zugänglich zu machen, mussten diese zuerst aus der sie umgebenden Fibrinmatrix herausgelöst werden. Zu diesem Zweck wurden die EHTs einem Papain-Verdau unterzogen.

2.8.1 Papain-assistierte Dissoziation von EHTs

Nach Abschluss der entsprechenden Experimente und Messungen wurden die EHTs mehrmals in vorgewärmter HBSS-Lösung gewaschen, um sie von Pferdeserum-Rückständen des EHT-Kulturmediums zu befreien. Währenddessen wurde eine neue 24-Well-Zellkulturplatte mit 1,5 ml vorgewärmter Papain-Lösung pro Well bzw. EHT befüllt. Anschließend wurden die EHTs in die Papain-Lösung umgesetzt und bei 37°C, 7% CO₂, 40% O₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der Fortschritt des Dissoziationsvorganges wurde alle 5 bis 10 Minuten lichtmikroskopisch überprüft. Sobald die EHTs weitestgehend ihre Form als Strang verloren hatten (in der Regel nach etwa 25 Minuten), wurde der Inhalt jedes Wells mit einer 1000 µl-Pipette mehrmals vorsichtig auf- und abpipettiert, um größere verbleibende Klumpen aus Zellen und Fibrinmatrix aufzulösen. Sobald die Kardiomyozyten fast nur noch als einzelne Zellen vorlagen (in der Regel nach etwa 30 bis 40 Minuten), wurde der Inhalt eines jedes Wells zunächst nochmals vorsichtig auf- und abpipettiert und anschließend in ein einzelnes 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Boden jeden Wells mit 0,5 ml vorgewärmter Dissoziations-Stop-Lösung gespült, um verbleibende Zellen zu lösen; diese 0,5 ml der Lösung wurden anschließend zusammen mit weiteren 1,0 ml einer Dissoziations-Stop-Lösung in das Reaktionsgefäß des zugehörigen Wells bzw. EHTs pipettiert, um den Papain-Verdau abubrechen und die einzelnen Kardiomyozyten möglichst intakt zu erhalten. Im Anschluss wurden die Zellen 8 Minuten lang bei 100 g zentrifugiert und dann weiter für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

Zusammensetzung Papain-Lösung	
Reagenz	Konzentration
EBSS	Basislösung
L-Cystein	5,5 mM
EDTA	1 mM
Y-27632	10 nM
Papain	10 U/ml

Zusammensetzung Stop-Lösung	
Reagenz	Anteil/Konzentration
HBSS	Basislösung
FCS	10% Volumenanteil
Y-27632	10 nM

2.8.2 Vorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden (pro Probe) in 2 ml PBS-Lösung suspendiert und anschließend für 3 Minuten bei 200 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden die Proben in je 1 ml 1:1000 mit PBS verdünnter *Fixable Viability Dye* suspendiert und für 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Dieser Farbstoff färbte nur abgestorbene Zellen an und ermöglichte so, diese durchflusszytometrisch von (zum Zeitpunkt der Viabilitätsfärbung) lebendigen Zellen zu unterscheiden. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS-Lösung resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen, um Rückstände der *Viability Dye* zu entfernen. Dann wurden die Zellen in 0,5 ml ROTI®-Histofix suspendiert und auf Eis 10 Minuten lang fixiert. Danach wurden die Zellen wiederum zweimal in PBS-Lösung suspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen, um Formaldehyd-Rückstände zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden die Proben in Permeabilisierungslösung suspendiert und über Nacht bei 4°C verwahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben für mindestens 2 Stunden gemäß Herstellerangaben gefärbt – verwendet wurden 1:50 mit Permeabilisierungslösung verdünnte Antikörperlösungen gegen kardiales Troponin T. Die enthaltenen rekombinanten Antikörper waren mit den Farbstoffen Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) markiert. Die Markierung des Herzmuskelzell-spezifischen Proteins kardiales Troponin T ermöglichte es, während der Durchflusszytometrie Kardiomyozyten von anderen Zellen bzw. Partikeln zu unterscheiden. Pro Probenreihe, also pro EHT-Generation, wurde mindestens eine Isotyp-Kontrolle angefertigt, die mit einem unspezifisch an intrazelluläre Antigene bindenden Antikörper gefärbt wurde. Spätestens einen Tag nach dem Färben wurden die Proben ein letztes Mal in PBS-Lösung resuspendiert und anschließend an einem LSRFortessa-Durchflusszytometer analysiert. Um möglicherweise mittels Durchflusszytometrie absolute Zellgrößen bestimmen zu können, wurden zusätzlich zu den EHT-Proben noch Polystyren-Partikel mit Durchmessern zwischen 3,4 µm und 16,5 µm bei unveränderten Laser-Einstellungen zur Kalibration vermessen. Die Daten wurden danach mit der *Free Flowing Software 2* (Perttu Terho; *Turku Centre for Biotechnology*) ausgewertet.

Zusammensetzung 500 ml Permeabilisierungslösung	
Bestandteil	Menge in Volumen/Gewicht
Fetales Kälberserum	25 ml
Saponin	2,5 g
Natrium-Azid	0,25 g
PBS	Ad 500 ml

2.9 Molekularbiologie

Die molekularbiologische Aufarbeitung von EHT-Material ermöglichte Rückschlüsse auf die Expression von Genen, die eine Rolle im Zustandekommen kardialer Hypertrophie spielen. EHTs, die molekularbiologisch analysiert werden sollten, wurden am Ende der EHT-Kultur nach einmaligem Waschen in PBS-Lösung so von der Silikonhalterung geschnitten, dass nur der EHT-Teil zwischen den Füßen weiterverwendet wurde. Diese Mittelteile der EHTs wurde dann in je ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und samt diesem in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die EHT-Proben wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung in einem Gefrierschrank bei -80°C gelagert. Die im Folgenden beschriebenen Schritte zur RNA-Extraktion, cDNA-Herstellung und zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurden von der medizinisch-technischen Assistentin Jutta Starbatty durchgeführt.

2.9.1 RNA-Isolation aus EHT-Proben

Zur RNA-Extraktion wurde das Lexington „SPLIT“-RNA-Extraktionskit verwendet. Alle beschriebenen Zentrifugationsvorgänge wurden bei 12000 g durchgeführt. Zunächst wurde jeder tiefgefrorenen EHT-Probe eine RNA-freie Stahlkugel und 400 µl des kalten Isolationspuffers aus dem Extraktionskit zugegeben. Anschließend wurden die Proben mittels eines *Tissue-Lysers* für 2 Minuten bei 30 Hz durch Schütteln homogenisiert. Nach Entfernung der Metallkugel wurde das resultierende Homogenat in ein mit *Phase-Lock-Gel* vorbefülltes Reaktionsgefäß überführt – das Gel hatte den Zweck, die später entstehende wässrige Phase eindeutiger von der organischen Phase zu trennen. Dem Homogenat wurden zunächst 400 µl 4°C kaltes Phenol zugesetzt, das Reaktionsgefäß wurde anschließend fünfmal invertiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl des sauren Puffers aus dem Extraktionskit, die Probe wurde danach mehrmals auf- und abpipettiert. Nach dem Hinzufügen von 200 µl Chloroform wurde die Probe mittels eines Reagenzglasschüttlers gründlich durchmischt und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zentrifugation der Probe für 2 Minuten wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die obere RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, während die Interphase und die organische Phase samt der enthaltenen DNA- und Proteinfraction verworfen wurden. Das Volumen der wässrigen Phase wurde bestimmt und mit der 1,75-fachen Menge Isopropanol auf einem Reagenzglasschüttler vermischt. Eine Siliziumdioxidsäule wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt und anschließend mit 800 µl des Isopropanol-Gemisches befüllt. Die Siliziumdioxidsäule diente dem Zweck, während des nächsten 20-sekündigen Zentrifugationsvorganges RNA-Moleküle zu binden, während die restlichen Bestandteile des Gemisches als Durchfluss verworfen werden konnten. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die komplette, mit Isopropanol verdünnte Probe durch die Säule zentrifugiert worden war. Als nächstes folgten zwei Waschvorgänge, um etwaige Nicht-RNA-Rückstände der Proben-Lösung zu entfernen: Erst wurden 500 µl,

dann 600 µl des Extraktionskit-spezifischen Wasch-Puffers auf die Säule gegeben und nach 20-sekündiger Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen. Abschließend wurde das Reaktionsgefäß samt Säule ein weiteres Mal für eine Minute zentrifugiert, um etwaige Rückstände des Waschpuffers zu entfernen. Um die gewonnenen RNA-Moleküle von der Säule zu lösen, wurden 30 µl des Extraktionskit-spezifischen Eluierungs-Puffer auf die Säule gegeben. Nach einminütiger Einwirkzeit wurde die Säule für eine Minute zentrifugiert; der mit RNA angereicherte Durchfluss konnte entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C zwischengelagert werden.

2.9.2 Reverse Transkription von RNA

Um zu der Proben-RNA komplementäre DNA (cDNA) zu gewinnen, wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* der Firma Applied Biosystems verwendet. Zunächst wurde der RNA-Gehalt der Proben mittels eines Qubit-Fluorometers (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Der für den Prozess benötigte Mastermix wurde gemäß untenstehender Tabelle auf Eis vorbereitet. Anschließend wurde ein 100 bis 500 ng RNA enthaltendes Volumen der einzelnen Proben mit 7 µl des RT-Mastermix und *aqua ad iniectabilia* auf ein Gesamtvolumen von 25 µl verdünnt. Mittels eines *PCR-Cyclers* wurde bei folgendem Temperaturprogramm die reverse Transkription durchgeführt: 10 Min bei 25°C, 120 Min bei 37°C, 5 Min bei 85°C, anschließend Verwahrung bei 4°C bis zur Probenentnahme. Die gewonnene cDNA wurde entweder bei -20°C zwischengelagert oder direkt der quantitativen Echtzeit-PCR zugeführt.

Zusammensetzung Reverse Transkription-Mastermix (RT-Mastermix) gemäß Reaktions-Kit	
Bestandteil	Volumenanteil
dNTP-Lösung	14,3 %
Reverse Transkriptase (Enzym)-Lösung	14,3 %
<i>Random Primer-Mix</i>	35,7 %
Puffer	35,7 %

2.9.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Pro Gen, dessen mRNA-Expression quantifiziert werden sollte, wurde ein Primer-Mastermix gemäß untenstehender Tabelle präpariert. Die Spezifität der Primer für die mRNA- bzw. cDNA-Transkripte der entsprechenden Gene wurde mittels der Primer-BLAST-Anwendung der *U.S. National Library of Medicine* überprüft. Der verwendete *Power SYBR Green PCR Mastermix* enthielt neben einer hitzeaktiven Taq-Polymerase auch den interkalierenden *SYBR Green*-Farbstoff, der die von der Polymerase Primer-spezifisch amplifizierten DNA-Stränge durch Fluoreszenz detektierbar machte. Pro Probe und Primer wurden auf einer 384-Well-PCR-Platte drei *Wells* als Triplikat mit je 8 µl des entsprechenden Primer-Mastermix und 2 µl der 1:10 mit *aqua ad iniectabilia* verdünnten Proben-cDNA-Lösung befüllt. Zusätzlich wurde für jeden Primer ein Kontroll-Triplikat mit *aqua ad iniectabilia* anstelle einer Probe pipettiert. Die Verwendung von Triplikaten ermöglichte es, etwaige Pipettierfehler zu erkennen. Die fertige

präparierte 384-Well-Platte wurde mittels eines ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System* über 40 PCR-Zyklen analysiert. Je mehr Kopien eines Primer-spezifischen Transkriptes in einer Probe vorhanden waren, desto schneller stieg die Anzahl der Transkriptkopien an – entsprechend nahm die detektierte *SYBR-Green*-Fluoreszenz zu. Nach Festlegung eines Schwellenwertes für diese Fluoreszenz konnte für jede der Proben bestimmt werden, in welchem PCR-Zyklus dieser Schwellenwert überschritten wurde – der sogenannte *Cycle of Threshold* (CT). Für die Auswertung der qPCR wurden zunächst die CT-Werte der Triplets gemittelt – Werte, die sich dabei mehr als einen halben Zyklus von den anderen beiden unterschieden, wurden eliminiert. Dann wurde von allen CT-Werten einer Probe der CT-Wert des Glucuronidase B-Transkripts subtrahiert – da die Glucuronidase B unabhängig von Hypertrophie-induzierenden Versuchen exprimiert wurde, konnten so Unterschiede im cDNA-Gehalt der Versuchsansätze normalisiert werden. Danach wurden für jedes untersuchte Gen die CT-Werte der Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments gemittelt und anschließend von den CT-Werten der Interventionsgruppe abgezogen. Durch das Entlogarithmieren der so ermittelten $\Delta\Delta$ -CT-Werte wurde der exponentielle Anstieg von cDNA-Kopien während der qPCR berücksichtigt – diese finalen ermittelten Werte stellten die relative Expression des entsprechenden Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe dar.

Primer-Mastermix	
Bestandteil	Volumenanteil
<i>Power SYBR Green PCR Mastermix</i>	25%
<i>Forward Primer</i> , gelöst in Tris-EDTA-Puffer	0,63%
<i>Reverse Primer</i> , gelöst in Tris-EDTA-Puffer	0,63%
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	73,75%

2.10 Histologie

Die histologische Aufarbeitung von EHTs erlaubte die Messung von Zell-Querschnittsflächen als Kenngröße der Hypertrophie von Herzmuskelzellen. Für histologische Analysen bestimmte EHTs wurden am Ende der EHT-Kultur zweimal in PBS-Lösung gewaschen und anschließend in einer mit ROTI-Histofix befüllten 24-Well-Kulturplatte für circa 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die fixierten EHTs von den Silikonhalterungen gelöst und zur kurzfristigen Lagerung in TBS-Lösung überführt. Die fixierten EHTs wurden als nächstes horizontal in sich verfestigender 4%iger Agarose platziert. Nachdem diese getrocknet war, konnten die EHTs unter Mitnahme eines Agarose-Quaders herausgeschnitten werden. Dieser Einbettungsprozess erleichterte die korrekte Ausrichtung der EHTs bei der weiteren histologischen Aufarbeitung – so konnten präzise Querschnitte im rechten Winkel zur EHT-Längsachse hergestellt werden. Die im Folgenden beschriebenen Schritte zur Herstellung histologischer Präparate wurden allesamt durchgeführt von Kristin Hartmann, Mitarbeiterin der Mauspathologie Facility am Universitätsklinikum Eppendorf.

2.10.1 Entwässern, Einbetten und Schneiden von EHT-Proben

Zunächst wurden die fixierten EHTs in beschriftete Einbettkassetten eingesetzt und anschließend entwässert, um die Einbettung in praktisch gänzlich wasserunlösliches Paraffin-Wachs zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Präparate in Ethanol-Lösungen zunehmender Konzentration (70%, 80%, 96% und 100%) eingetaucht. Nach drei Entwässerungsschritten in 100% Ethanol wurden die Proben zweimal für anderthalb Stunden mit Xylol als Intermedium behandelt. Anschließend folgte die zweifache Immersion der Proben in 61°C warmem Paraffin für je zwei Stunden. Flüssiges Paraffin wurde mittels einer Paraffinausgießstation in vorgewärmte Metallschälchen gegossen, die EHT-Proben aus den Einbettkassetten entnommen und in das Paraffin eingetaucht. Um präzise EHT-Querschnitte zu ermöglichen, musste die Probe möglichst vertikal im Paraffin positioniert werden. Sobald dies zufriedenstellend gelungen war, wurde das Metallschälchen auf den „Kühl-Spot“ der Vorrichtung bewegt und der beschriftete Teil der Einbettkassette auf dem aushärtenden Paraffinblock positioniert. Der auf diese Weise mit Probeninformationen versehene Paraffinblock konnte, nachdem das Wachs sich vollständig verfestigt hatte, aus der Metallschale entnommen werden. In dieser Form waren die EHT-Proben bei kühler Lagerung lange haltbar. Um histologische Schnitte herzustellen, wurde die Temperatur der Oberfläche des Paraffinblocks mittels einer Kühlplatte auf -5°C gesenkt, anschließend wurde der Block in einem Rotationsmikrotom befestigt. Mithilfe dessen wurden 2-3 µm dicke Schnitte hergestellt, die anschließend in ein 53°C heißes Wasserbad getaucht wurden, um beim Schneiden unvermeidliche Auffaltungen zu korrigieren. Die nun gestreckten, faltenfreien

Schnitte wurden durch das Anheben mit einem gläsernen Objektträger aus dem Wasserbad auf diesem aufgebracht.

2.10.2 Entparaffinieren, Wässern und Färben von EHT-Schnitten

Um eine Vermessung der Kardiomyozyten-Querschnittsflächen zu ermöglichen, kam eine immunhistochemische Dystrophin-Färbung in Kombination mit einer Gegenfärbung zum Einsatz. Dystrophin ist ein Protein, das lediglich in der Zellmembran von Skelett- und Herzmuskelzellen vorkommt und den kontraktilen Apparat dieser Zellen mit der Zellmembran bzw. der extrazellulären Matrix verbindet. Durch die Dystrophin-Färbung wurde also das Sarkolemm als Zellgrenze visualisiert. Die Optimierung und Durchführung des kompletten Färbeprozesses sowie das vorherige Entparaffinieren und Wässern der Schnitte erfolgte mittels des Ventana BenchMark XT-Vollautomaten. Entparaffinieren und Wässern liefen dabei in etwa gegensätzlich zum Entwässern und Paraffinieren ab: Nach der Behandlung mit Xylol als Intermedium wurde zum Wässern eine Reihe absteigender Ethanol-Lösungen und abschließend *aqua bidest* verwendet. Dann folgte auf eine 60-minütige Antigen-Demaskierung mit EDTA-Puffer bei einem pH von 8,0 die Färbung mit 1:200 verdünnter Dystrophin-Primärantikörper-Lösung. Als Sekundärantikörper kam das *Ultraview Universal DAB Detection Kit* zum Einsatz. Zusätzlich wurde eine Gegenfärbung mit *Ventana-Roche Bluing Agent* und Hämatoxylin für je vier Minuten vorgenommen – vor allem die Zellkerne wurden mit diesen Substanzen angefärbt. Nach Abschluss des Färbeprozesses wurden die Schnitte ein weiteres Mal entwässert, also durch eine aufsteigende Reihe von Ethanol-Lösungen gezogen und anschließend mit Xylol behandelt. Um die Schnitte zu präservieren und insbesondere vor dem Ausbleichen zu schützen, wurden sie im letzten Schritt mit *Mounting Medium* eingedeckt.

2.10.3 Auswertung der EHT-Querschnitte

Die fertig gefärbten EHT-Querschnitts-Präparate wurden mithilfe der AxioVision-Software (Zeiss) lichtmikroskopisch abfotografiert und digital mit einem Maßstabsbalken versehen. Anschließend wurde zur Bilddatei jeder EHT-Probe von einer in die Analyse nicht eingebundenen Person eine Kopie erstellt, deren Benennung keinerlei Rückschluss auf die Versuchsgruppe zuließ – die folgende Messung wurde dementsprechend verblindet durchgeführt. Die Foto-optische Bestimmung der Kardiomyozyten-Querschnittsflächen wurde mit FIJI, einer modifizierten Version der *Open Source Software* ImageJ vorgenommen. Mittels der Skalierungsfunktion von FIJI wurde die Messung zunächst anhand des Maßstabsbalkens im Bild kalibriert. Anschließend wurden pro EHT-Querschnitt 50 angeschnittene Kardiomyozyten, nach Möglichkeit aus der Randregion des EHTs, händisch umrandet. Die so von der FIJI-Software errechneten EHT-Querschnittsflächen wurden zunächst zwischengespeichert. Nachdem die Messungen aller Proben abgeschlossen waren, wurden

die ermittelten Werte mittels einer Entblindungstabelle einzelnen EHTs bzw. Versuchsgruppen zugeordnet.

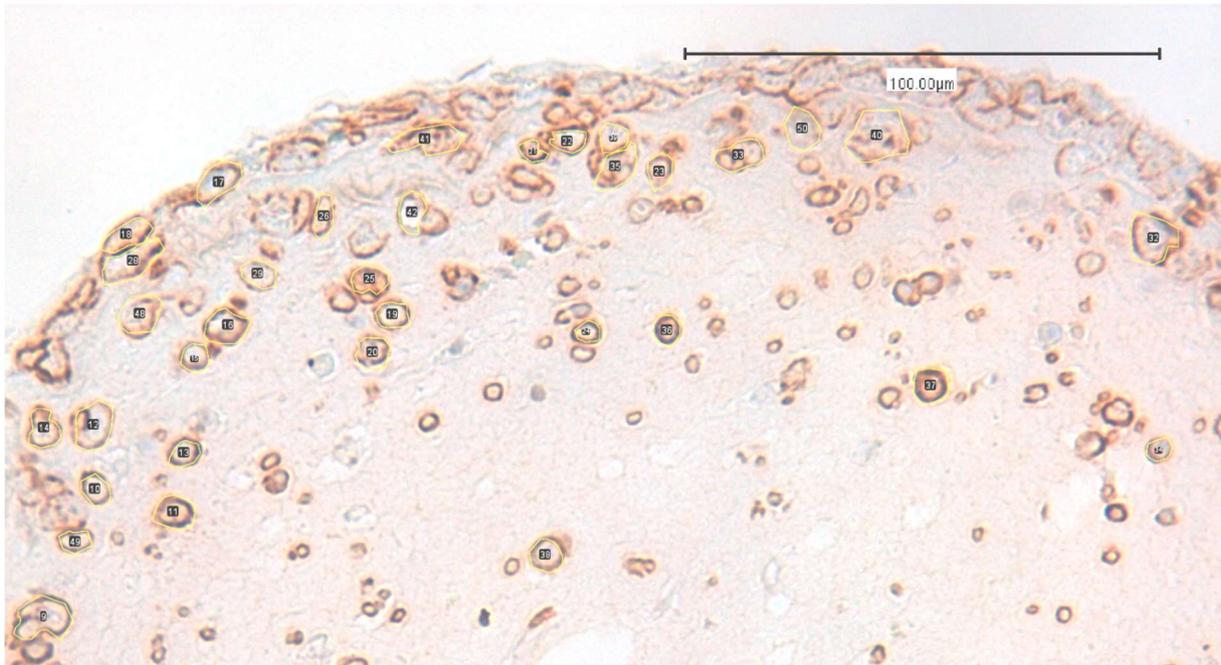


Abb. 3.11: Dystrophin-gefärbter Ratten-EHT-Querschnitt. In der Abbildung wird beispielhaft ein digital bearbeiteter Ausschnitt aus der Fotografie eines histologischen EHT-Querschnitts-Präparates gezeigt. Die bräunlich-rötlich angefärbten Strukturen sind Sarkolemma von Kardiomyozyten, die Dystrophin enthalten. Die gelbe Umrandung einiger Kardiomyozyten ist die händische Markierung, die zur Vermessung der Zell-Querschnittsfläche nötig war. Oben im Bild ist ein Maßstabsbalken sichtbar.

2.11 Massenspektrometrie und Proteom-Analyse

Eine Kooperation mit dem Interfakultären Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung Greifswald ermöglichte die massenspektrometrische Analyse des Proteoms von EHT-Proben. EHTs verschiedener Versuchsgruppen wurden nach circa 30 Tagen Kulturdauer wie in 3.9 beschrieben eingefroren. Je drei EHTs der gleichen Versuchsgruppe mit ähnlichen kontraktile Eigenschaften wurden zu Triplikaten zusammengeführt – pro Versuchsgruppe wurden so fünf Triplikate gebildet. Diese Triplikate wurden auf Trockeneis nach Greifswald überführt und dort von Elke Hammer und ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern prozessiert. Die EHTs wurden zunächst durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen bei 30°C bei gleichzeitigem Schütteln lysiert. Das entstehende Homogenat wurde anschließend für eine Stunde bei 16000 g zentrifugiert. Durch Ultraschallbehandlung wurden Nukleinsäure-Rückstände in den Proben fraktioniert. Mittels eines Bradford-Tests wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt, als Referenz dienten Lösungen mit bekannter Konzentration von Rinder-Serumalbumin. Das Prinzip des genannten Tests beruht auf der Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brillant-Blau G250, in saurem Milieu durch die Interaktion mit kationischen und unpolaren Aminosäure-Seitenketten sein Absorptionsmaximum zu verschieben. Anschließend wurden aus 20 µg Protein je EHT den Triplikaten entsprechend Protein-Sammellösungen gemischt. 4 µg Protein pro Triplikat-Gemisch wurden reduziert, alkyliert und über Nacht durch einen kombinierten Trypsin/Endoprotease LysC-Verdau aufgeschlossen. Das entstehende Peptid-Gemisch wurde mittels eines UltiMate 3000 Ultrahochleistungsflüssigkeits-Chromatographen in verschiedene Bestandteile aufgetrennt; je nach Stärke der chemischen Interaktion mit der AccuCore-Säule des Chromatographen verließen die einzelnen Bestandteile des Peptid-Gemischs diese Säule später oder früher. Direkt im Anschluss wurde aus den aufgetrennten Analyten durch Elektrospray-Ionisation ein Nebel aus gasförmigen Peptid-Ionen erzeugt, der in ein QExactive Plus Quadrupol-Orbitrap-Tandem-Massenspektrometer eingeleitet wurde. Mittels des Quadrupol-Spektrometers konnten Vorläufer-Peptid-Ionen mit einem bestimmten Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) selektiert werden, die im Anschluss in einer mit inertem Gas befüllte Kammer beschleunigt wurden. Dort zerfielen die Peptide durch kollisionsinduzierte Dissoziation in kleinere ionisierte Bestandteile (wie z.B. Aminosäuren), die in ein Orbitrap-Massenspektrometer gelenkt wurden. Durch die Form der Umlaufbahn dieser Fragment-Ionen um die spindelförmige Elektrode der Orbitrap konnten wiederum die m/z -Verhältnisse dieser Fragment-Ionen berechnet werden, was eine eindeutige Identifikation des entsprechenden Vorläufer-Peptides ermöglichte. Aus Art und Anzahl der identifizierten Peptide konnte letzten Endes das Proteom, also die Gesamtheit der Proteine und deren relatives Vorkommen in den EHT-Proben rekonstruiert werden.

2.12 Statistik

Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der vorliegenden Daten erfolgte mit der GraphPad Prism Software, Versionen 6 und 9. Abgebildet sind die Daten (sofern nicht anders beschrieben) als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (*Standard Error of the Mean*; SEM). Mit „n“ wird die Anzahl der EHTs in der jeweiligen Versuchsgruppe angegeben. Wurden zwei ungepaarte, unabhängige Versuchsgruppen bezüglich eines Merkmals in einer einzelnen Messung verglichen, so wurde als statistische Analyse ein t-Test nach Student durchgeführt. Waren in solch einem Szenario mehr als zwei unabhängige Versuchsgruppen vorhanden, kam eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One-way ANOVA*) zum Einsatz. Wenn für zwei Gruppen von EHTs mehrfache Kontraktilitätsmessungen über den Kulturzeitraum hinweg verglichen wurden, so wurde die Daten einer zweifaktoriellen Varianzanalyse (*Two-way ANOVA*) mit multiplen Vergleichen unterzogen. Wurden die Zellgrößen von zwei EHT-Versuchsgruppen verglichen, so lagen die Messwerte als technische Replikate vor – pro EHT wurde mehr als eine Zellgröße gemessen. Um diesen „Pseudo-Replikaten“ methodisch gerecht zu werden, musste ein gemischtes Modell zur statistischen Analyse herangezogen werden (Eisner 2021) – in der GraphPad Prism Software Version 9 bezeichnet als „*Nested t-Test*“ bzw. „*Nested One-Way ANOVA*“. Als statistisch signifikant wurden p -Werte kleiner als 0,05 bezeichnet. Das Signifikanzniveau wird in den Grafiken wie folgt aufgezeigt: * $\rightarrow p < 0,05$; ** $\rightarrow p < 0,01$; *** $\rightarrow p < 0,001$; **** $\rightarrow p < 0,0001$. Statistisch nicht signifikante Unterschiede wurden graphisch nicht gekennzeichnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Nachlasterhöhung in humanen EHTs der Zelllinien ERC018 und C25

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war, unter Einbezug vorhandener Daten zu beleuchten, ob es möglich ist, das etablierte hiPSC-CM-basierte EHT-Format als Modell mechanisch induzierter pathologischer kardialer Hypertrophie zu nutzen. Ein entsprechendes Modell kardialer Hypertrophie wurde von Hirt et al. (2012) an Ratten-EHTs bereits etabliert; dementsprechend wurde die beschriebene Intervention der Nachlasterhöhung (AE) durch Einbringen von Edelstahlklammern unter serumfreien Kulturbedingungen so präzise wie möglich auf humane EHTs übertragen. Tessa Werner hat entsprechende Versuche an humanen EHTs der Zelllinien C25 und ERC018 vorgenommen. Der folgende Teil des Abschnitts 3.1 beschreibt Ergebnisse aus ihrer Dissertation (2018), die hier lediglich zur Einordnung der vorliegenden Arbeit aufgeführt werden. Der Verfasser dieser Arbeit hat also weder am Text noch an den Grafiken geistiges Eigentum.

Die Nachlast von humanen EHTs der Zelllinien C25 und ERC018 wurde mithilfe von Edelstahlklammern 12-fach erhöht. Während der sieben Tage andauernden Intervention wurden die EHTs unter serumfreien Bedingungen kultiviert. Als Kontrollgruppe dienten EHTs, die bei gleichen übrigen Kulturbedingungen keinerlei Nachlast-Veränderung unterworfen wurden. Nach Ende dieser AE-Intervention zeigten C25-EHTs gegenüber der Kontrollgruppe um 24,7% verminderte Kräfte – ERC018 EHTs wiesen lediglich einen statistisch nicht signifikanten Trend zu niedrigeren Kräften auf. Bei Ratten-EHTs führte die gleiche Intervention zu einer Kraftreduktion von 35% (Hirt et al. 2012). Während die AE-Intervention keine eindeutige Auswirkung auf den Relaxationsvorgang von C25- und ERC018-EHTs hatte, führte sie bei Ratten-EHTs zu einer Verlängerung der Relaxationszeit von 33% (Hirt et al. 2012). Die Expression des *ANP*-Gens als Teil des hypertrophen Genprogrammes blieb bei humanen C25- und ERC018-EHTs von der Nachlasterhöhung unbeeinflusst. Bei Ratten-AE-EHTs war *ANP* das Gen des untersuchten Spektrums, das mit einer mehr als 30-fach erhöhten Transkription am sensibelsten auf die Intervention reagierte (Hirt et al. 2012). In Bezug auf gemessene Kardiomyozyten-Querschnittsflächen als Marker der Zellgröße hatte die AE-Intervention keinen eindeutigen Effekt in EHTs der Zelllinien C25 und ERC018. Bei Ratten-EHTs führte die Behandlung zu einer Zunahme der Kardiomyozyten-Querschnittsflächen von 28,4% (Hirt et al. 2012). Zusammenfassend lässt sich also sagen: Im Gegensatz zu Ratten-AE-EHTs wiesen humane AE-EHTs der Zelllinien C25 und ERC018 lediglich ein Charakteristikum pathologischer kardialer Hypertrophie auf, nämlich einen Verlust der Kontraktionskraft. Die bei Ratten-EHTs gemessene diastolische Dysfunktion, Re-Expression fetaler Gene und Zunahme der Zellgrößen blieben aus. Als Modell pathologischer Hypertrophie erwiesen sich C25- und ERC018-AE-EHTs also eher ungeeignet.

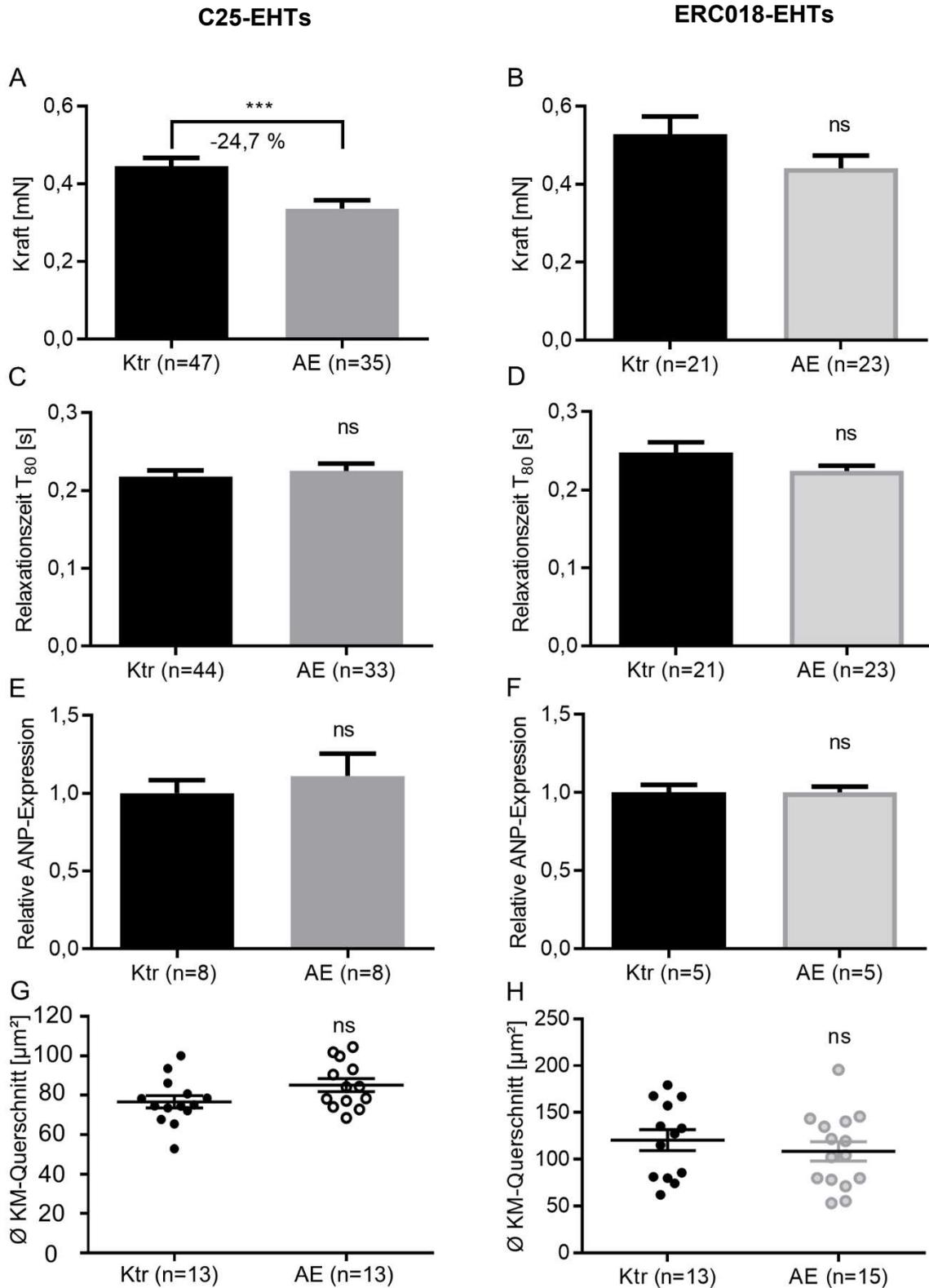


Abb. 3.1: Starke Nachlasterrhöhung in C25- und ERC018-EHTs. Alle in dieser Abbildung dargestellten Daten entstammen Tessa Werners Dissertation (2018). (A+B) Video-optisch gemessene Kontraktionskräfte humaner C25- bzw. ERC018-EHTs nach einer Woche Nachlasterrhöhung durch Edelstahlklammern. (C+D) Die Relaxationszeit T_{80} bezeichnet die Zeit, die vom Beginn einer Kontraktion an vergeht, bis ein EHT sich wieder zu 80% von der maximalen Kontraktion entspannt hat. (E+F) Mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmte relative Expression des ANP-Gens in AE- und Kontroll-EHTs der Zelllinien C25 und ERC018. (G+H) Die durchschnittliche Querschnittsfläche von Kardiomyozyten wurde durch die digitale Auswertung histologischer Schnitte bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein EHT; pro EHT wurden mindestens 50 Zellen vermessen.

3.2 Merkmale pathologischer kardialer Hypertrophie in ERC001-AE-EHTs

3.2.1 Effekte der AE-Intervention auf die Kontraktilität von ERC001-EHTs

Zusätzlich zu den bereits untersuchten Zelllinien C25 und ERC018 sollte im Rahmen dieser Arbeit die Tauglichkeit von hiPSC-CM-basierten AE-EHTs der Zelllinie ERC001 als Modell für Nachlast-induzierte, pathologische kardiale Hypertrophie geprüft werden. Da eine Beeinträchtigung der Herzmuskelfunktion Bestandteil dieses kardialen Phänotyps ist, wurden ERC001-AE-EHTs bezüglich ihrer Kontraktilität mit Kontroll-EHTs verglichen.

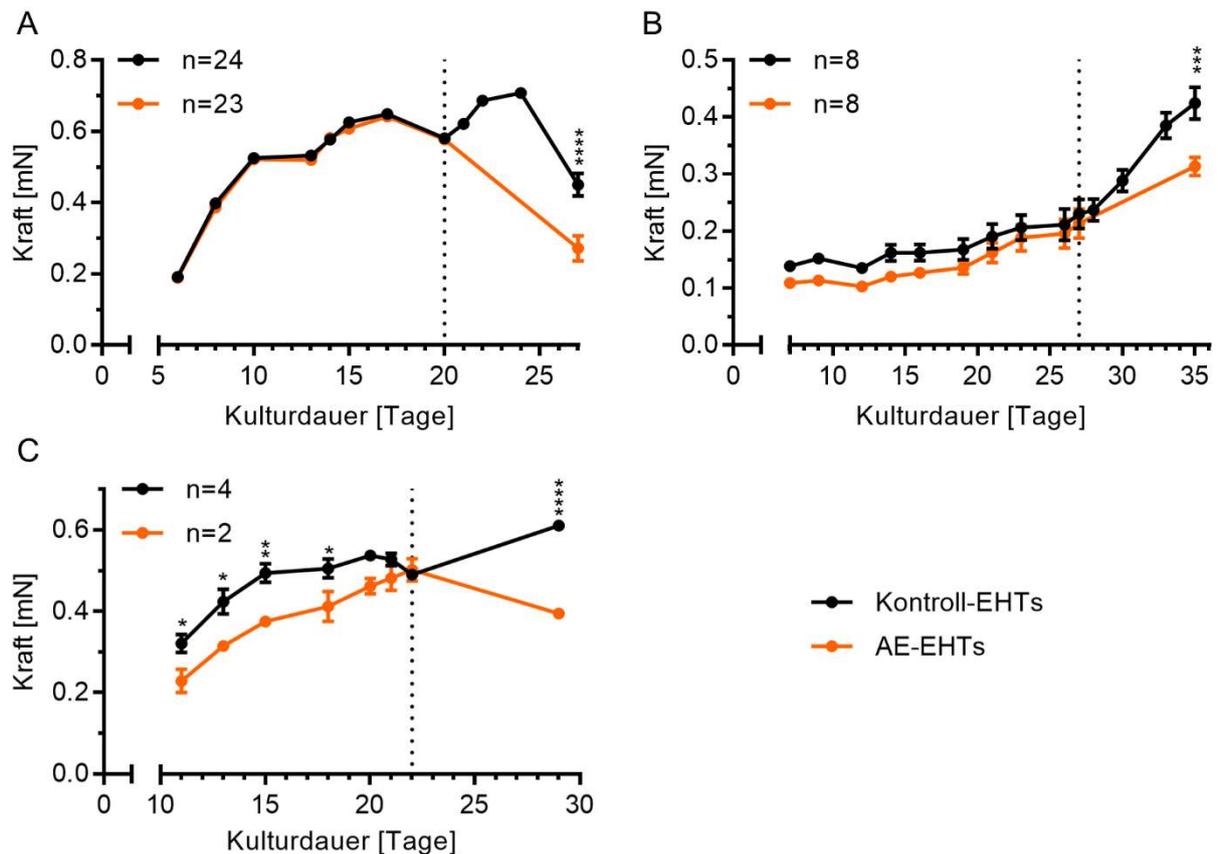


Abb. 3.2: Kräfte von ERC001-EHTs im Verlauf der Kultur. (A), (B) und (C) stellen die gemessenen Kontraktionskräfte je einer unabhängigen Generation von ERC001-EHTs über die Dauer der Kultur dar. Die gepunktete Linie markiert jeweils den Beginn der Nachlast-erhöhenden AE-Intervention.

Ab ungefähr 7 Tagen nach der Herstellung von ERC001-EHTs wurden diese regelmäßigen video-optischen Kontraktilitätsmessungen unterzogen. Sobald sich nach etwa drei Wochen ein Plateau in der Kraftzunahme der ERC001-EHTs zeigte, wurden diese gemäß ihrer letzten gemessenen Kontraktionskraft in zwei vergleichbare Gruppen eingeteilt. Die Nachlast der AE-Interventions-Gruppe wurde durch das vorsichtige Einbringen von Edelstahlklammern (siehe 2.6.2) 12-fach erhöht. Während des einwöchigen AE-Versuchs unter serumfreien Bedingungen konnten lediglich bei der Kontrollgruppe Kontraktilitätsmessungen vorgenommen werden – die Auslenkung der Silikonfüße war bei den ERC001-AE-EHTs durch die Klammer-Versteifung so eingeschränkt, dass eine video-optische Kontraktilitätsanalyse

nicht möglich war. Nach der einwöchigen Intervention wurden die Edelstahlklammern vorsichtig entfernt und eine letzte Kontraktilitätsmessung an allen EHTs durchgeführt.

Drei unabhängige Generationen von ERC001-AE-EHTs wurden in Bezug auf ihre Kontraktilität untersucht. Die EHTs der drei Experimente unterschieden sich deutlich in der Kraft, die sie vor der Nachlasterrhöhung im Plateau entwickelten: Während die in Abb. 3.2 (B) gezeigten EHTs lediglich durchschnittliche Kräfte von 0,23 mN im Plateau entwickelten, wiesen die EHT des in (A) abgebildeten Experiments im Mittel Kräfte von 0,58 mN zu Beginn der Intervention auf. EHTs des Experiments (C) bewegten sich mit 0,45 mN mittlerer Kraft dazwischen. Darüber hinaus reagierten die EHTs der verschiedenen Generationen in ihrer Kontraktilität sehr unterschiedlich auf die serumfreien Bedingungen, die ab dem Beginn der Intervention herrschten. Während in dem Experiment 3.2 (A) sowohl Kontroll- als auch AE-Interventions-Gruppe über die Interventionszeit hinweg in der Kraft eher abnahmen, zeigten beide Versuchsgruppen des Experiments (B) einen deutlichen Kraftzuwachs im Zeitraum der serumfreien Kultur. Bei allen drei Experimenten war allerdings zu beobachten, dass die Kontraktionskraft der AE-EHTs nach Abschluss der Intervention deutlich geringer war als die Kraft der Kontrollgruppen-EHTs – unabhängig davon, wie die entsprechende Generation EHTs insgesamt auf die serumfreien Bedingungen reagierte. Bezogen auf die zusammengeführten Daten aller drei Versuche wiesen die ERC001-AE-EHTs nach Abschluss der AE-Behandlung im Schnitt um 37,6% geringere Kräfte auf als die Kontrollgruppe.

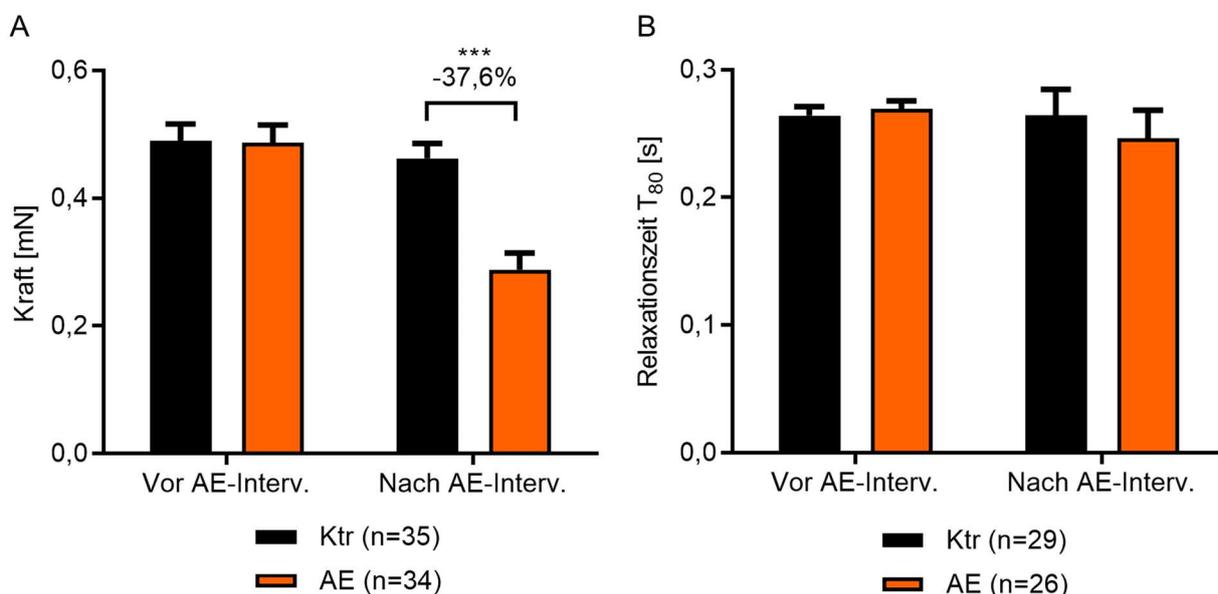


Abb. 3.3: Effekt der AE-Intervention auf die Kontraktilität humaner ERC001-EHTs. (A) Kräfte der EHTs aller drei ERC001-Generationen vor und nach der AE-Intervention. (B) Relaxationszeiten der EHTs aller drei ERC001-Generationen vor und nach der AE-Intervention. Die geringere Anzahl von eingeschlossenen EHTs in dieser Analyse lässt sich darauf zurückführen, dass die automatisierte Video-optische Messung der Relaxationszeit anfälliger für Störungen ist als die Messung der Kraft. EHTs, für die an einem der beiden Messzeitpunkte eine Fehlmessung vorlag, wurden dementsprechend für die komplette Analyse zensiert.

Während die systolische Funktion humaner ERC001-EHTs also deutlich durch die Nachlasterrhöhung mittels Metallklammern kompromittiert wurde, ließ sich kein Effekt auf die Entspannung, also die diastolische Funktion der EHTs feststellen. Tatsächlich wiesen humane ERC001-AE-EHTs nach der Intervention in einem statistisch nicht signifikanten Trend eher geringfügig kürzere Relaxationszeiten auf als EHTs der entsprechenden Kontrollgruppe.

3.2.2 Methodik: Zellgrößenbestimmungen via Durchflusszytometrie

Neben Veränderungen der Kontraktilität entschieden weitere Parameter über die Tauglichkeit von ERC001-AE-EHTs als Modell mechanisch induzierter kardialer Hypertrophie. Es stellte sich die Frage, ob die AE-Intervention bei ERC001-EHTs (anders als bei EHTs der Zelllinien C25 und ERC018) tatsächlich zu einer Zunahme der Kardiomyozyten-Zellgröße, also einer Hypertrophie führen würde. Zur Messung von Zellgrößen wurden in dieser Arbeit (genau wie in vorherigen Arbeiten; Sørensen 2013, Werner 2018) Kardiomyozyten-Querschnittsflächen in histologischen EHT-Querschnitten vermessen. Die genannte etablierte Methode hat jedoch auch Nachteile: Das Anfertigen, Digitalisieren und Vermessen der EHT-Querschnitte ist zeitaufwändig. Darüber hinaus werden die einzelnen Kardiomyozyten manuell ausgewählt und markiert, das Verfahren ist also in einem gewissen Maße untersucherabhängig. Deshalb sollte

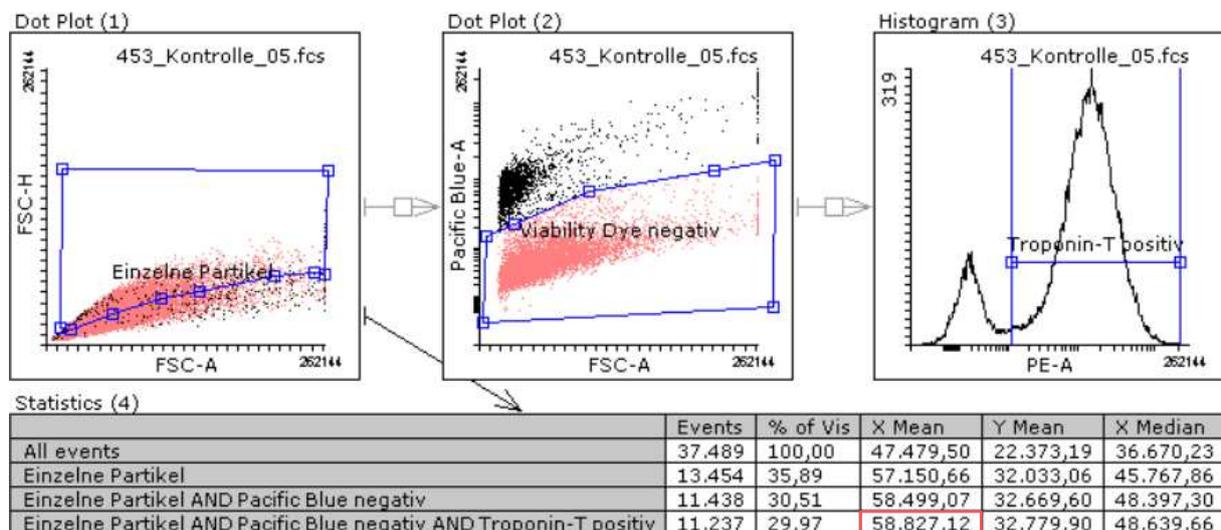


Abb. 3.4: Gating-Strategie zur Vorauswahl lebendiger Kardiomyozyten. Gezeigt ist ein Screenshot einer beispielhaften Analyse mittels der *Free Flowing Software*. Im *Dot Plot (1)* wurde für alle analysierten Partikel der FSC-H gegen den FSC-A aufgetragen, um nach Möglichkeit in Verbänden vorliegende Zellen von der weiteren Analyse auszuschließen. Die „Einzelne Partikel“-Population (blau umrahmt) wurde im *Dot Plot (2)* weiter analysiert. Dort wurde die relative Intensität des Viabilitäts-Farbstoffs *Pacific Blue* gegen den FSC-A aufgetragen und eine „*Viability Dye negativ*“-Population definiert (wiederum blau markiert). Alle Partikel wurden im *Histogram (3)* gemäß ihrer PE-Fluoreszenz aufgetragen. Hier wurde eine „*Troponin-T positiv*“-Population definiert, da der Färbefarbstoff gegen das entsprechende Protein an den PE-Farbstoff gekoppelt war. Der FSC-A-Mittelwert der Partikel, die die Schnittmenge der Populationen „*Einzelne Partikel*“, „*Viability Dye negativ*“ und „*Troponin-T positiv*“ darstellten, ist in der *Statistics (4)*-Tabelle durch einem roten Kasten markiert.

im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob die Analyse aus EHTs herausgelöster Kardiomyozyten mittels Durchflusszytometrie eine valide Methode zur Messung von Kardiomyozyten-Zellgrößen darstellt.

Am Ende der Kulturzeit wurden aus EHTs mittels des in 2.8.1 geschilderten Papain-Verdau einzelne Kardiomyozyten herausgelöst. Die Zellen wurden nach EHTs getrennt analysiert. Die Proben wurden zweifach gefärbt: zum einen mit Antikörpern gegen das Kardiomyozyten-Protein Troponin-T, zum anderen mit einem Viabilitäts-Farbstoff, der lt. Herstellerangaben lediglich Zellen mit defekter Membran (also tote Zellen) anfärbte. Durch die Kombination der Färbungen gelang es, in die Zellgrößen-Analyse lediglich Zellen einfließen zu lassen, die höchstwahrscheinlich zum Zeitpunkt der Färbung noch lebendige Kardiomyozyten waren; die Konzeptionierung der entsprechenden Zell-Vorauswahl ist in Abb. 3.4 dargestellt.

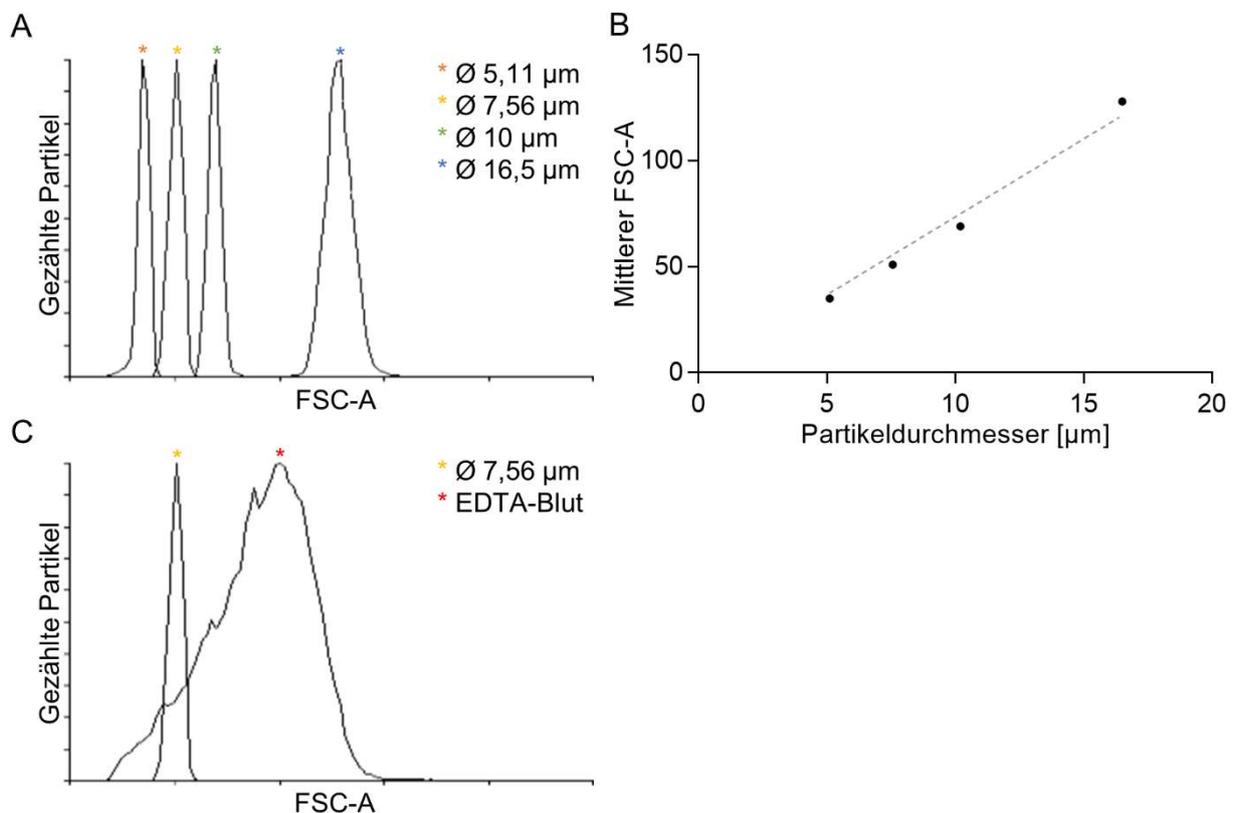


Abb. 3.5: Ansatz zur Kalibrierung von FSC-A-Werten mittels Partikeln bekannter Größe. Das Diagramm (A) entstand durch das Addieren von FSC-A-Histogrammen, die je eine Population von Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 5,1 µm und 16,5 µm repräsentieren; gemessen wurden pro Durchmesser zwischen 3800 und 10000 Ereignisse. Der Zusammenhang zwischen Durchmesser und mittlerem gemessenem FSC-A der genannten Partikel ist in (B) gezeigt. Für (C) wurden wiederum Histogramme überlagert: zum einen von Partikeln mit einem Durchmesser von 7,6 µm, zum anderen von einer EDTA-Blutprobe, die im Wesentlichen aus Erythrozyten bestand. Diese weisen beim Menschen in der Regel einen Durchmesser von etwa 7,5 µm auf.

Als vielversprechendster durchflusszytometrisch messbarer Parameter zur Bestimmung von Zellgrößen erschien die Vorwärtsstreuung (FSC). Um zu überprüfen, welchen Einfluss der Durchmesser eines Partikels auf den gemessenen FSC-A-Wert hat, wurden Polystyren-Partikel (sogenannte „Beads“) bekannter Durchmesser zwischen 5,1 µm und 16,5 µm

durchflusszytometrisch analysiert. Aus den Ergebnissen dieser Messungen, die sich in Abb. 3.5 (A) finden, ließ sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen Partikeldurchmesser und gemessenem FSC-A-Wert konstruieren; dieser ist in Abb. 3.5 (B) dargestellt.

Es stellte sich nun die Frage, ob es mittels der in Abb. 3.5 (B) dargestellten Funktion möglich wäre, aus dem (bei gleichen Laser-Einstellungen) durchflusszytometrisch bestimmten FSC-A von Zellen deren absolute Durchmesser zu errechnen. Zur Klärung dieser Frage wurde in Abb. 3.5 (C) der *Forward Scatter* einer EDTA-Blutprobe mit dem von 7,6 μm messenden Partikeln verglichen. Der zelluläre (und damit durchflusszytometrisch erfassbare) Anteil menschlichen Blutes besteht zu 99% aus Erythrozyten, die ungefähr einen Durchmesser von 7,5 μm aufweisen – der mittlere *Forward Scatter* aller Zellen einer menschlichen Blutprobe entspricht also nahezu dem der enthaltenen Erythrozyten. Aus Abb. 3.5 (C) ist ersichtlich, dass sich der gemessene FSC-A der Erythrozyten enorm vom FSC-A der mit 7,6 μm sehr ähnlich großen Polystyren-Partikel unterschied. Dementsprechend war der *Forward Scatter* einer Zelle bzw. eines Partikels offensichtlich nicht allein von deren bzw. dessen Größe abhängig.

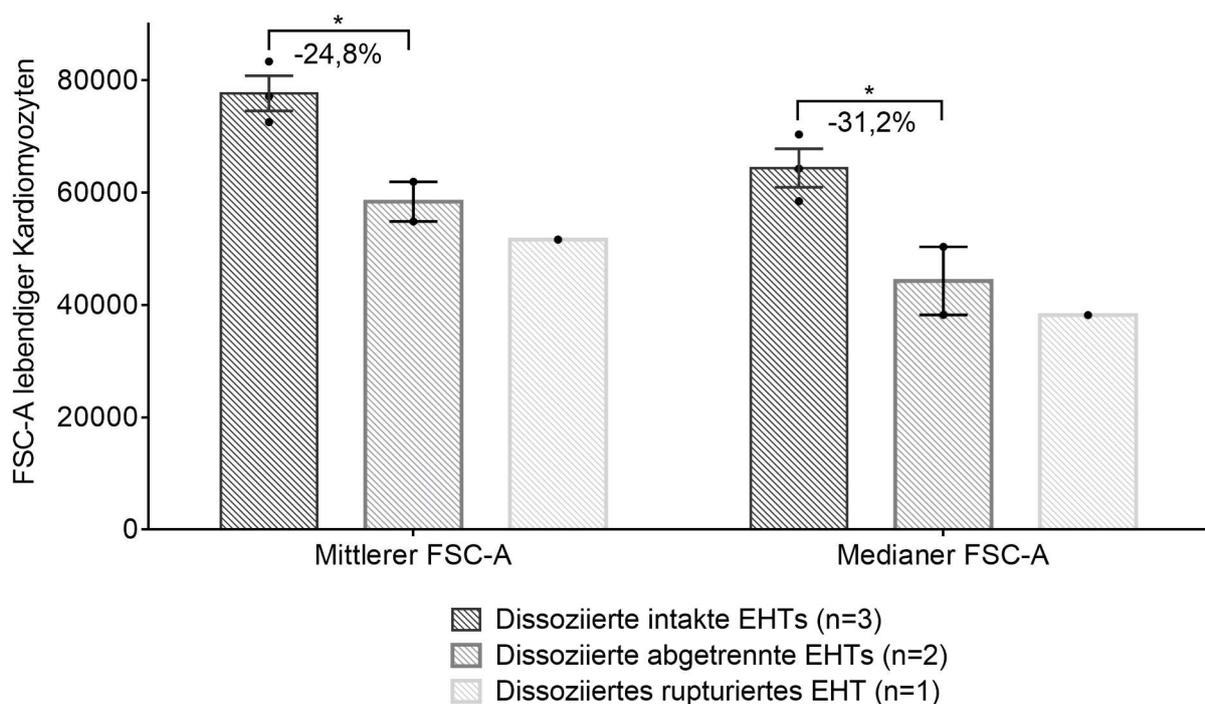


Abb. 3.6: FSC-A-Werte von Kardiomyozyten aus EHTs verschiedener mechanischer Entlastungszustände. Aufgetragen ist der Mittelwert bzw. Median des FSC-A von Kardiomyozyten, die durch den Verdau verschieden entlasteter EHTs gewonnen wurden. Ein Punkt repräsentiert dabei die FSC-A-Werte aller analysierten lebendigen Kardiomyozyten aus einem EHT ($661 < n < 2473$).

Um zu validieren, dass sich mittels der Durchflusszytometrie tatsächlich Zellgrößen-Unterschiede feststellen ließen, wurde folgendes Experiment vorgenommen: Zwei EHTs einer Generation wurden von einem der beiden Füße der EHT-Kultur-Silikonhalterung abgelöst. Ziel dieser Intervention war, durch den resultierenden mechanischen Entlastungszustand eine Atrophie (also eine Schrumpfung) der im EHT enthaltenen Kardiomyozyten auszulösen. Zwei

Tage darauf wurden die abgetrennten EHTs neben regulär kultivierten EHTs und einem EHT, das zu Beginn der Kultur spontan rupturiert war, dissoziiert und durchflusszytometrisch analysiert. Der mittlere FSC-A-Wert von Kardiomyozyten aus abgetrennten EHTs war im Vergleich mit der normal kultivierten Kontrollgruppe rund 25% niedriger – der Median der FSC-A-Werte unterschied sich um noch deutlichere 31%. Noch geringer war sowohl im arithmetischen Mittel als auch im Median der FSC-A der Kardiomyozyten, die aus dem spontan rupturierten EHT stammten.

Zusammengefasst lässt sich also sagen: Mittels durchflusszytometrischer Bestimmung des FSC-A-Wertes ließen sich durchaus Unterschiede in den Zellgrößen von Kardiomyozyten feststellen. Die Messungen an Polystyren-Partikeln bekannter Größe legten dabei nahe, dass für Objekte ähnlicher Struktur ein linearer Zusammenhang zwischen Objekt-Durchmesser und gemessenen FSC-A-Werten bestünde. Der Unterschied zwischen FSC-Werten von Erythrozyten und denen von in etwa gleich großen Polystyren-Partikeln zeigte jedoch, dass sich Objekte unterschiedlichen Aufbaus in ihrer Größe nicht durch FSC-A-Messungen vergleichen ließen. Während also ein relativer Vergleich der Größen von Kardiomyozyten auf Basis von FSC-Werten methodisch aussagekräftig wirkte, erschien eine Bestimmung absoluter Kardiomyozyten-Größen durch das Erstellen einer Kalibrierungsgeraden mittels Polystyren-Partikeln unzulässig.

3.2.3 Effekt der AE-Intervention auf Zellgrößen humaner ERC001-AE-EHTs

Um zu überprüfen, ob sich durch die AE-Intervention Hypertrophie in humanen ERC001-EHTs auslösen ließe, wurden Zellgrößen der in den EHTs enthaltenen Kardiomyozyten auf zweierlei Art und Weise bestimmt: Zum einen wurden Kardiomyozyten-Querschnittsflächen auf histologischen Querschnittspräparaten vermessen, zum anderen wurden FSC-A-Werte von Kardiomyozyten aus AE- und Kontroll-EHTs verglichen. Wie in Abb. 3.7 (A) dargestellt, wiesen die vermessenen Kardiomyozyten beider Versuchsgruppen eine mittlere Querschnittsfläche von etwa $100 \mu\text{m}^2$ auf – es war also kein Effekt der AE-Intervention ersichtlich. Der gemessene mittlere FSC-A-Wert von Kardiomyozyten aus derselben Versuchs-Generation unterschied sich gemäß Abb. 3.7 (B) genauso wenig. In beiden Messmethoden wiesen die AE-EHTs dieser Versuchsgeneration einen minimalen Trend zu größeren Kardiomyozyten auf: Der mittlere FSC-A war in ERC001-AE-EHTs um 2,6% größer als in der Kontrollgruppe, die histologisch bestimmte Kardiomyozyten-Querschnittsfläche um 2,9%. Die Messergebnisse beider Methoden stimmten also sehr präzise überein. Auch die FSC-A-Werte von Kardiomyozyten einer zweiten analysierten Generation von ERC001-AE-EHTs in Abb. 3.7 (C) unterschieden

sich über die Versuchsgruppen hinweg kaum voneinander. Alles in allem bewirkte die AE-Intervention also nicht die Entstehung einer Kardiomyozyten-Hypertrophie in humanen ERC001-EHTs.

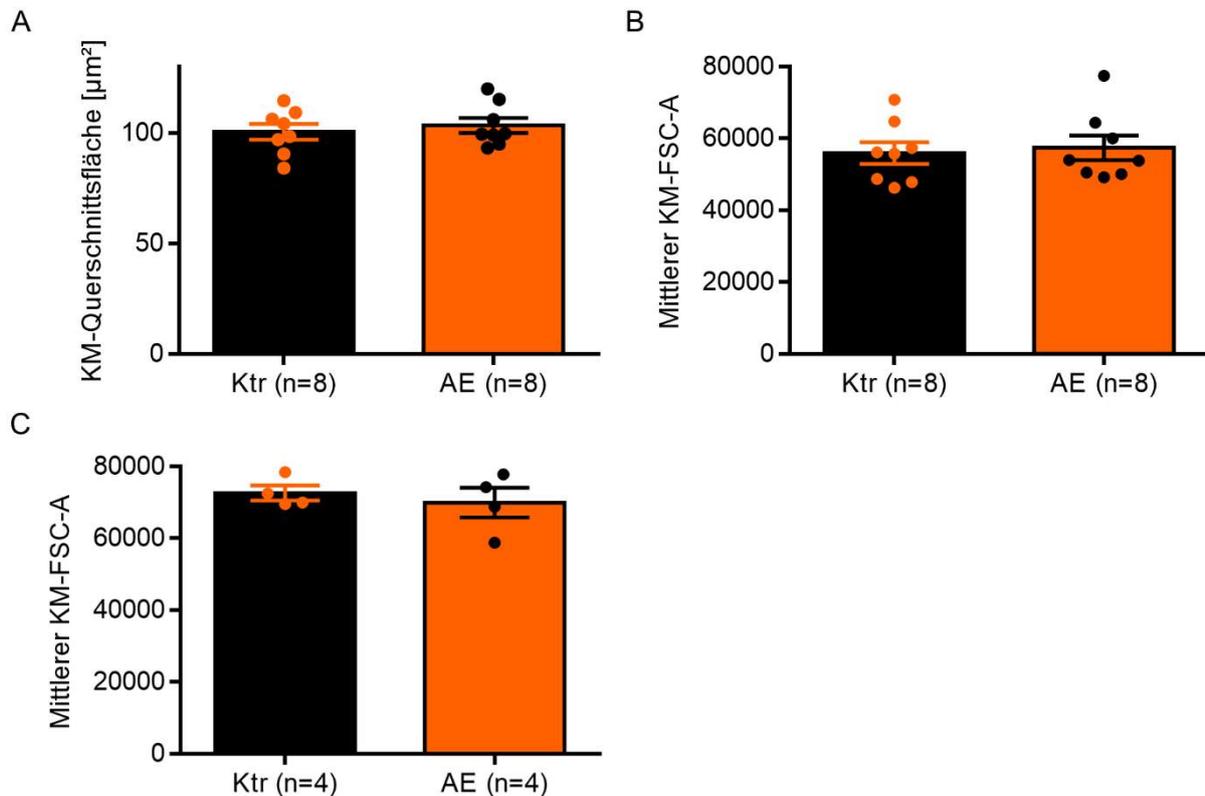


Abb. 3.7: Zellgrößenmessungen an humanen ERC001-AE-EHTs. (A) Aus EHTs derselben Versuchs-Generation wie (B) wurden histologisch KM-Querschnittsflächen bestimmt. Jeder Punkt entspricht dabei einem EHT – pro EHT wurden 50 KM vermessen. (B+C) Dargestellt ist der mittlere FSC-A-Wert von lebendigen Kardiomyozyten (KM), die aus ERC001-AE-EHTs herausgelöst wurden. (B) und (C) repräsentieren dabei je einen unabhängigen Versuch. Jeder Punkt entspricht dem FSC-A-Mittelwert aller vermessenen KM eines EHTs (B: $7600 < n < 12600$; C: $1000 < n < 4000$).

3.2.4 Gen-Expressionsveränderungen in ERC001-AE-EHTs

Ein weiteres Merkmal pathologischer kardialer Hypertrophie, dessen Auftreten in ERC001-AE-EHTs überprüft werden sollte, war die Reaktivierung des fetalen Genprogrammes. Gemäß 2.9 wurde in ERC001-EHT-Proben die Expression ausgewählter Gene durch qPCR auf RNA-Ebene quantifiziert. EHTs aus vier verschiedenen, unabhängigen Experimenten wurden untersucht. Die größten Unterschiede zwischen AE- und Kontroll-EHTs bezüglich Genexpression wurden in dem Experiment Abb. 3.8 (A) gemessen. In AE-EHTs wurden für das atriale natriuretische Peptid (ANP) eine 1,8-fach, für das *Brain Type Natriuretic Peptide* (BNP) eine 2,4-fach und für die α -Isoform des skeletalen Aktins (ACTA) sogar eine 3,1-fach erhöhte Konzentration der entsprechenden Transkripte gemessen – statistisch signifikant war allerdings lediglich die Messung der BNP-Transkripte. In AE-EHTs des Experiments Abb.

3.8 (B) reagierte die Expression des (für BNP-codierenden) *NPPB*-Gens mit einer 1,9-fachen Erhöhung am empfindlichsten auf die Intervention. Die für ANP und ACTA codierenden Gene wurden in einem nicht signifikanten Trend lediglich 1,4- bzw. 1,5-fach häufiger transkribiert. Interessanterweise zeigten in diesem Experiment ERC001-AE-EHTs eine um ein Drittel verminderte Expression des *MYH6*-Gens – dieses kodiert für die α -Isoform der schweren Myosin-Kette, die vorwiegend während der Embryonalentwicklung exprimiert wird. Das *MYH7*-Gen codiert für die entsprechende β -Isoform des Proteins, die im postnatalen (also reifen) menschlichen Herzen dominant vorliegt. In AE-EHTs des Experiments Abb. 3.8. (C) wurde eine um 34% verminderte Expression des *MYH7*-Gens gemessen. In ERC001-AE-EHTs dieses Experiments (C) blieb die Transkription der für die natriuretischen Peptide ANP und BNP codierenden Gene von der Intervention unbeeinflusst. Lediglich die Expression des *ACTA1*-Gens war gegenüber Kontroll-EHTs 2,3-fach erhöht. AE-EHTs des Experiments Abb. 3.8 (D) zeigten leichte bzw. moderate, statistisch nicht signifikante Trends zu erhöhten Expressionen von *NPPB* bzw. *ACTA1*. Die - verglichen mit der Kontrolle - im Trend verminderte *MYH6*-Expression bei gleichzeitig erhöhter *MYH7*-Expression entsprach am ehesten den Ergebnissen von Experiment (B). In allen EHT- Versuchsgenerationen blieb die *ATP2A2*-Expression sowie die *COL1A1*-Expression von der Intervention unbeeinflusst.

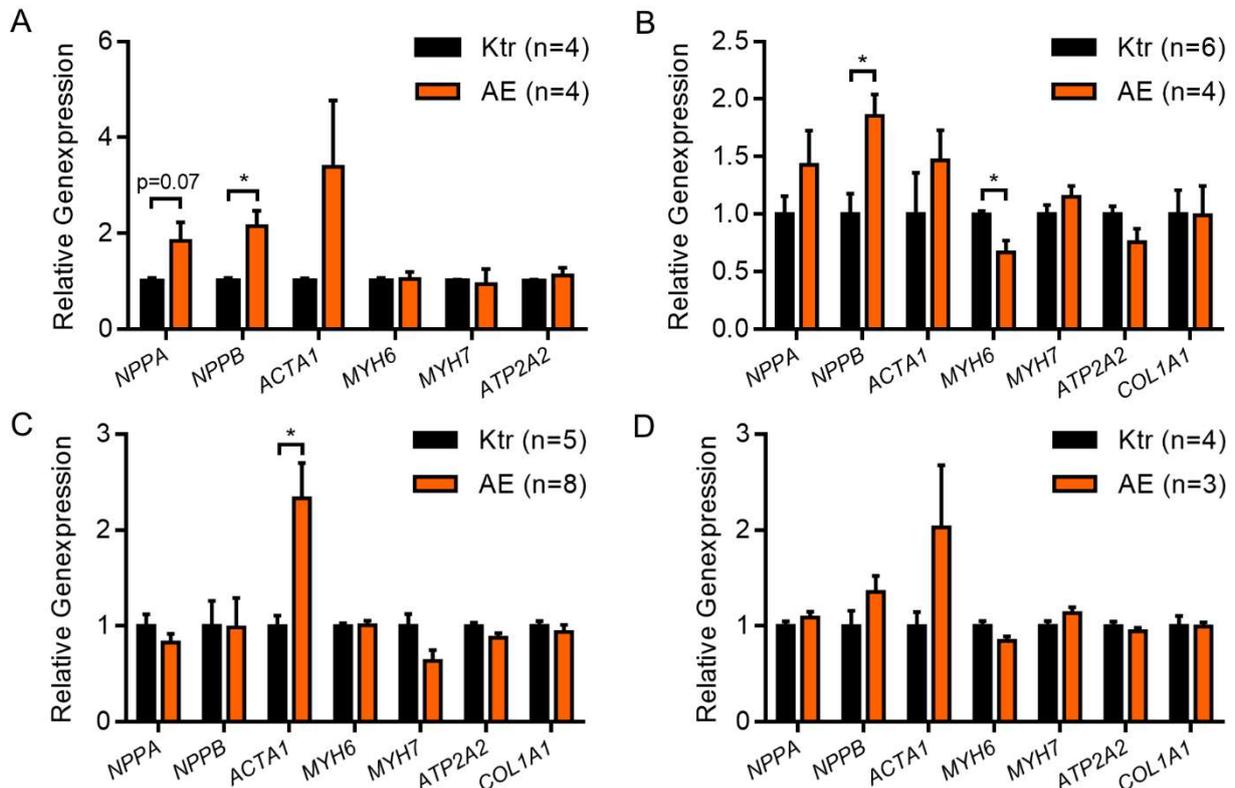


Abb. 3.8: Genexpressionsmuster verschiedener Generation von ERC001-AE-EHTs. Die relative Expression von Transkripten der aufgeführten Gene ist für AE-EHTs und die Kontrollgruppe aufgetragen. Jedes der vier Diagramme stellt die Messungen an EHTs einer unabhängigen Versuchsgeneration dar. Die relativen Genexpressionen sind gemäß 2.9.3 angegeben als $\Delta\Delta$ -CT-Werte.

Offensichtlich unterschieden sich die Ergebnisse der vier analysierten ERC001-AE-EHT-Generationen also deutlich bezüglich der Expression von Genen des fetalen Genprogramms. Um eine etwas allgemeinere Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die AE-Intervention in ERC001-EHTs eine Reaktivierung des fetalen Genprogrammes bewirkte, wurden die bereits beschriebenen Daten in Abb. 3.9 (A) zu einer einzigen Analyse zusammengeführt. Hier zeigte sich, dass über die verschiedenen Experimente hinweg die Gene *ACTA1* und *NPPB* mit einer auf das 2,3- bzw. 1,5-Fache erhöhten Transkription am sensibelsten auf die AE-Intervention reagierten. *NPPA* wurde in ERC001-AE-EHTs lediglich im Trend vermehrt exprimiert – die restlichen untersuchten Gene blieben von der Intervention im Wesentlichen unbeeinflusst. Diese Ergebnisse ließen sich gut in Einklang bringen mit den Resultaten der Massenspektrometrie, die von der Arbeitsgruppe Elke Hammer an der Universität Greifswald durchgeführt wurde. Mittels Massenspektrometrie konnte die relative Häufigkeit von mehreren tausend Proteinen in den EHT-Proben bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass von den Proteinen, die dem untersuchten Spektrum des fetalen Genprogramms zuzuordnen sind, BNP und ACTA am ehesten vermehrt in den ERC001-AE-EHT-Proben nachweisbar waren – analog also zur erhöhten Transkription der korrespondierenden Gene *ACTA1* und *NPPB*. Alpha-1-Typ-1-Kollagen war massenspektrometrisch in den EHT-Proben nicht nachweisbar.

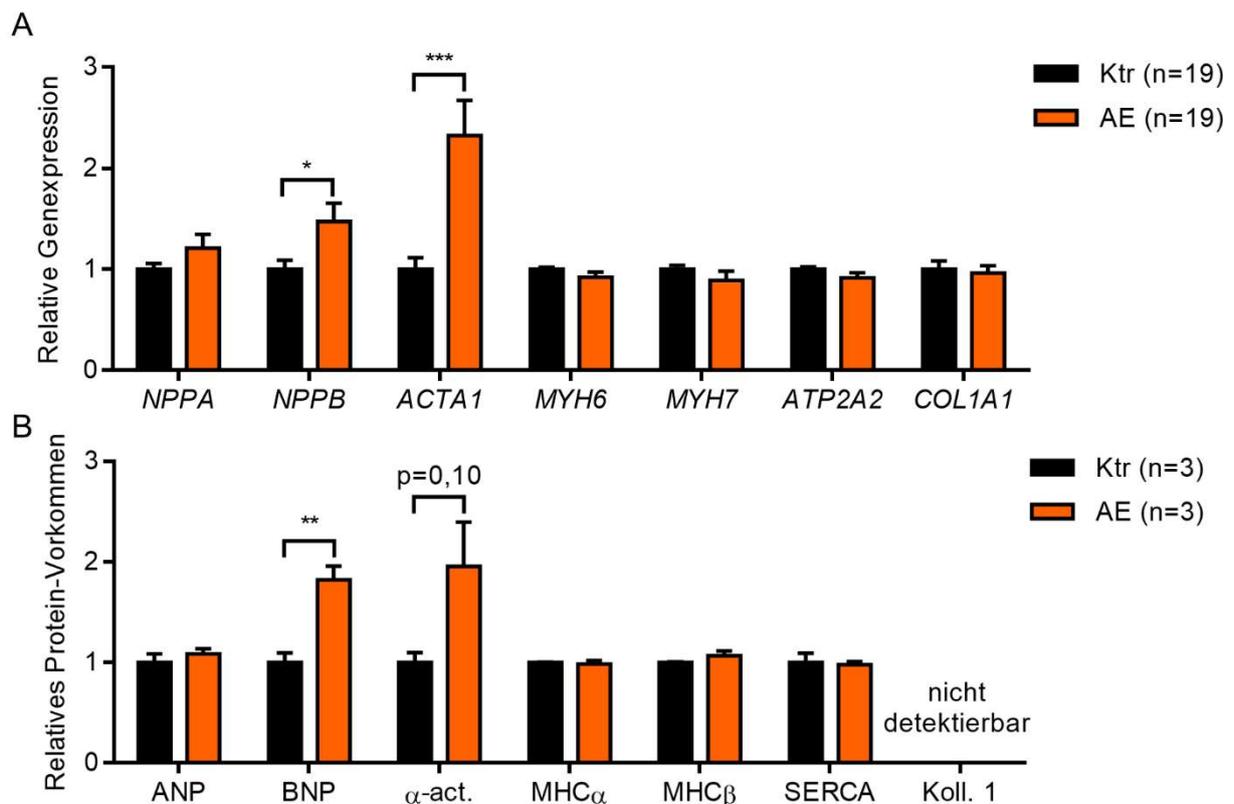


Abb. 3.9: Expression des fetalen Genprogramms auf Transkript- und Proteinebene in ERC001-AE-EHTs. (A) Aufgetragen sind die zusammengeführten qPCR-Ergebnisse aus Abb. 3.8 (A-D) als $\Delta\Delta$ -CT-Werte. (B) Aufgetragen ist das massenspektrometrisch bestimmte relative Vorkommen der Proteine, für die die in (A) untersuchten Gene codieren. Jedes der drei Replikate pro Versuchsgruppe entspricht dabei einem Protein-Gemisch, das aus je drei verschiedenen EHT-Proben gewonnen wurde – insgesamt floss also biologisches Material aus 9 EHTs pro Versuchsgruppe in die Analyse ein.

3.3 Kultur von EHTs an Silikonhalterungen verschiedener Steifigkeit

Die Applikation einer massiven Nachlast-Erhöpfung bewirkte also in Ratten-EHTs die Entwicklung vieler, in humanen ERC001-EHTs zumindest die Ausprägung einiger phänotypischer Charakteristika der pathologischen kardialen Hypertrophie (Hirt et al. 2012). Unklar war jedoch, ob sich durch anders (und vor allem niedriger) dosierte Nachlast-Stimuli in EHT andere Formen kardialer Plastizität auslösen ließen – ob es also möglich wäre, Ratten- oder humane EHTs als Modell physiologischer kardialer Hypertrophie zu nutzen.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, kamen als ein möglicher mechanischer Stimulus physiologischer Hypertrophie EHT-Silikonhalterungen mit verschiedenen steifen Füßen zum Einsatz. Durch die Verwendung verschiedener Silikone während des Herstellungsprozesses der Halterungen war es so möglich, EHTs bei einer konstanten Nachlast von 0,60 mN/mm, 0,80 mN/mm, 1,24 mN/mm oder 2,11 mN/mm zu kultivieren. Zum Vergleich: Die AE-Intervention steigerte die Nachlast der betroffenen EHTs auf ungefähr 12 mN/mm.

3.3.1 Einfluss der Steifigkeit von Silikonhalterungen auf EHT-Kontraktilität

Ein Charakteristikum physiologischer kardialer Hypertrophie ist die verbesserte oder zumindest nicht verschlechterte kontraktile Funktion des Myokards – eine negative Veränderung der Kontraktilität kennzeichnet die pathologische Hypertrophie. Um Effekte der durch die Verwendung verschiedene Silikonhalterung bedingten Nachlast-Unterschiede auf die Kontraktilität von EHTs analysieren zu können, wurden entsprechend kultivierte EHTs Video-optischen Messungen unterzogen. Die Messungen begannen ab dem Zeitpunkt, zu dem erste koordinierte Kontraktionen der humanen ERC001- bzw. Ratten-EHTs sichtbar waren, und wurden bis zum letzten Kulturtag fortgesetzt. Die in Abb. 3.10 (A) und (C) analysierten humanen EHTs zeigten allesamt eine Zunahme von Kraft und Silikonfuß-Auslenkung über die komplette Kulturdauer hinweg. Darüber hinaus war ersichtlich, dass mit zunehmender Steifigkeit der Silikonhalterung auch die gemessenen Kräfte zunahmten: Während bei 0,60 mN/mm Nachlast kultivierte EHTs gegen Ende der Kultur lediglich Kräfte von 0,35 mN aufwiesen, betrugen die Kräfte bei 2,11 mN/mm kultivierter EHTs mit 1,2 mN beinahe das Vierfache. Bei EHTs, kultiviert mit einer Nachlast von 0,80 mN/mm bzw. 1,24 mN/mm, lagen die Kräfte mit 0,5 mN bzw. 0,8 mN entsprechend dazwischen. Bezüglich der Auslenkung der Silikonfüße, die durch die Kontraktion der humanen ERCC001-EHTs verursacht wurde, unterschieden sich die Versuchsgruppen deutlich weniger. Tendenziell wiesen allerdings die ERC001-EHTs mit der höchsten Nachlast die geringste Auslenkung auf. Da bei einer höheren Silikonfuß-Steifigkeit der Fuß nur eine geringere Strecke ausgelenkt werden muss, um eine verhältnismäßig große Kraft zu entwickeln, steht dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zu den hohen Kontraktionskräften, die bei diesen $k=2.11$ mN/mm-EHTs gemessen wurden. Im Gegensatz zu den humanen EHTs entwickelten die Ratten-EHTs schon

nach etwa zwei Wochen ein Plateau in ihrer Kontraktilität. Davon abgesehen ähnelten sich die Ergebnisse allerdings: Auch bei den Ratten-EHTs wiesen die bei der höchsten Nachlast kultivierten EHTs mit 0,76 mN am Ende der Kultur die höchsten Kräfte auf – diese waren mehr als doppelt so hoch wie die Kräfte der bei niedrigster Nachlast kultivierten EHTs, welche lediglich 0,31 mN betrug. Deutlicher als humane EHTs zeigten die Ratten-EHTs Unterschiede in der Silikonfußauslenkung, hier wurden für die beiden Versuchsgruppen mit der höchsten bzw. zweithöchsten Nachlast die niedrigsten bzw. zweitniedrigsten Werte gemessen – über den kompletten Versuchszeitraum hinweg.

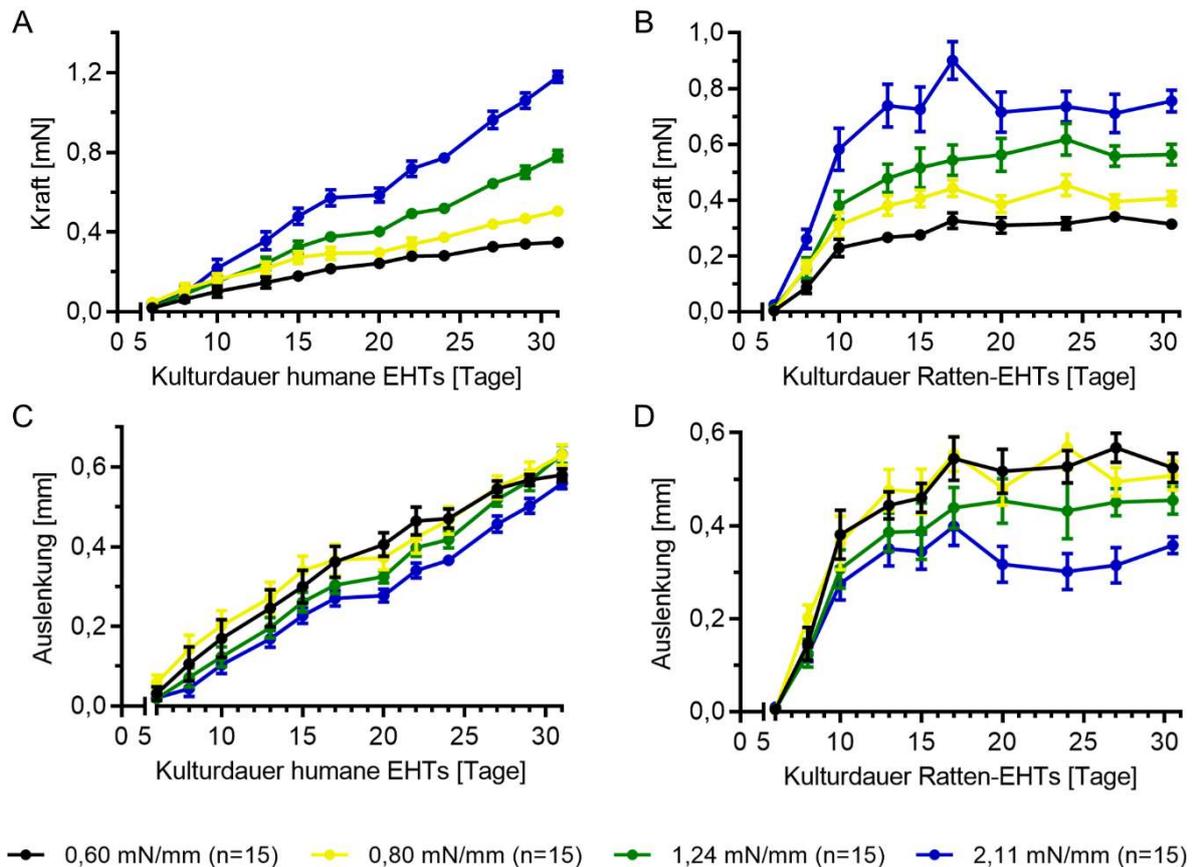


Abb. 3.10: Kontraktilität an verschieden steifen Silikonhalterungen kultivierter EHTs. (A+B) Aufgetragen sind über die Kulturdauer die Kräfte von humanen ERC001-EHTs bzw. von Ratten-EHTs, die an Silikonfüßen mit Steifigkeiten zwischen 0,60 mN/mm und 2,11 mN/mm kultiviert wurden. (C+D) Für dieselben EHTs ist die Auslenkung der Silikonfüße aufgetragen, die während der Kontraktion der EHTs gemessen wurde. Pro Spezies und Silikonhalterungs-Typus wurden 15 EHTs in die Analyse einbezogen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die graphische Darstellung der Signifikanzniveaus verzichtet. Eine tabellarische Aufführung der statistischen Auswertung der Ergebnisse findet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.3.2 Histologie und Genexpression bei verschiedenen Nachlasten kultivierter Ratten-EHTs

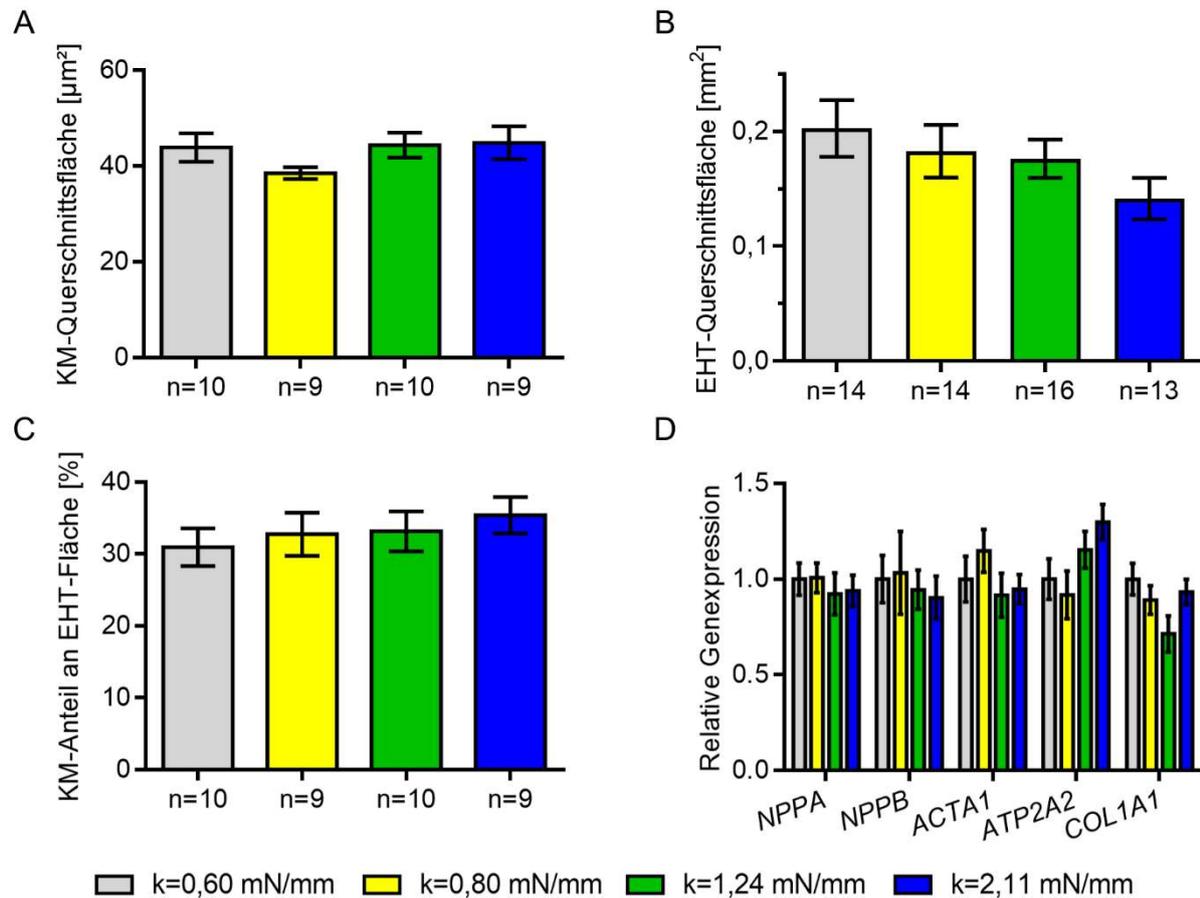


Abb. 3.11: Einfluss von Silikonhalterungen verschiedener Steifigkeit auf Genexpression und histologische Struktur von Ratten-EHTs. Diese Messdaten entstanden in gemeinsamer Arbeit mit Marita L. Rodriguez. (A) Aufgetragen ist die an Dystrophin-gefärbten Präparaten gemessene mittlere Kardiomyozyten-Querschnittsfläche je EHT. Pro EHT wurden 50 Zellen vermessen. (B) Verglichen werden hier die Querschnittsflächen von EHTs, die an verschieden steifen Silikonracks kultiviert wurden. (C) Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der gesamten EHT-Querschnittsfläche, der von Kardiomyozyten bedeckt war. (D) Dargestellt ist die relative Expression verschiedener Gene des fetalen Genprogramms. Pro Versuchsgruppe wurde RNA aus 15 bis 18 EHTs analysiert. Die in Abb. 3.11 abgebildeten Daten wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

Um nachzuvollziehen, ob die unterschiedlichen Nachlasten der verschiedenen Silikonracks eine Kardiomyozyten-Hypertrophie oder andere strukturelle Veränderungen bewirkten, wurden immunhistochemisch auf Dystrophin oder ANP gefärbte EHT-Querschnittspräparate analysiert. Wie aus Abb. 3.11 (A) ersichtlich, betrug die durchschnittlichen Kardiomyozyten-Querschnittsfläche in allen Versuchsgruppen in etwa $40 \mu\text{m}^2$ - keiner der verschiedenen Nachlast-Zustände vermochte also im Vergleich zu den anderen eine Veränderung der Zellgröße hervorzurufen. Mit zunehmender Nachlast verminderte sich gemäß Abb. 3.11 (B) im Trend die mittlere Gesamt-Querschnittsfläche der EHTs. Wie in 3.11 (C) zu sehen, nahm im Trend mit zunehmender Nachlast von EHTs gleichzeitig die Kardiomyozyten-Dichte zu. Dementsprechend verminderte sich mit zunehmender Nachlast am gesamten EHT-Querschnitt tendenziell der Nicht-Kardiomyozyten-Anteil, der vor allem aus Fibrin besteht. Um

zu überprüfen, ob durch die verschiedenen steifen Racks eventuell schon pathologisches *Remodeling* in Ratten-EHTs angestoßen wurden, wurde die Expression einiger Gene des fetalen Genprogramms bestimmt. Wie in Abb. 3.11 (D) dargestellt, zeigten sich hier keinerlei signifikante Unterschiede, die das Vorliegen einer pathologischen Hypertrophie implizieren würden.

Alles in allem führte die Kultur von humanen und Ratten-EHTs an verschiedenen steifen Silikonracks zwar zu höheren messbaren Kräften bei zunehmender Nachlast, bewirkte allerdings in Ratten-EHTs keine Kardiomyozyten-Hypertrophie – es lag also nicht der Phänotyp einer physiologischen kardialen Hypertrophie vor. Trotzdem gab es Anzeichen für Nachlast-abhängige strukturelle Umbauprozesse: Mit zunehmender Nachlast schien der Nicht-Kardiomyozyten-Anteil von Ratten-EHTs abzunehmen. Anzeichen für pathologische kardiale Plastizität lagen nicht vor.

3.4 Kultur von EHTs bei fluktuierender Nachlast

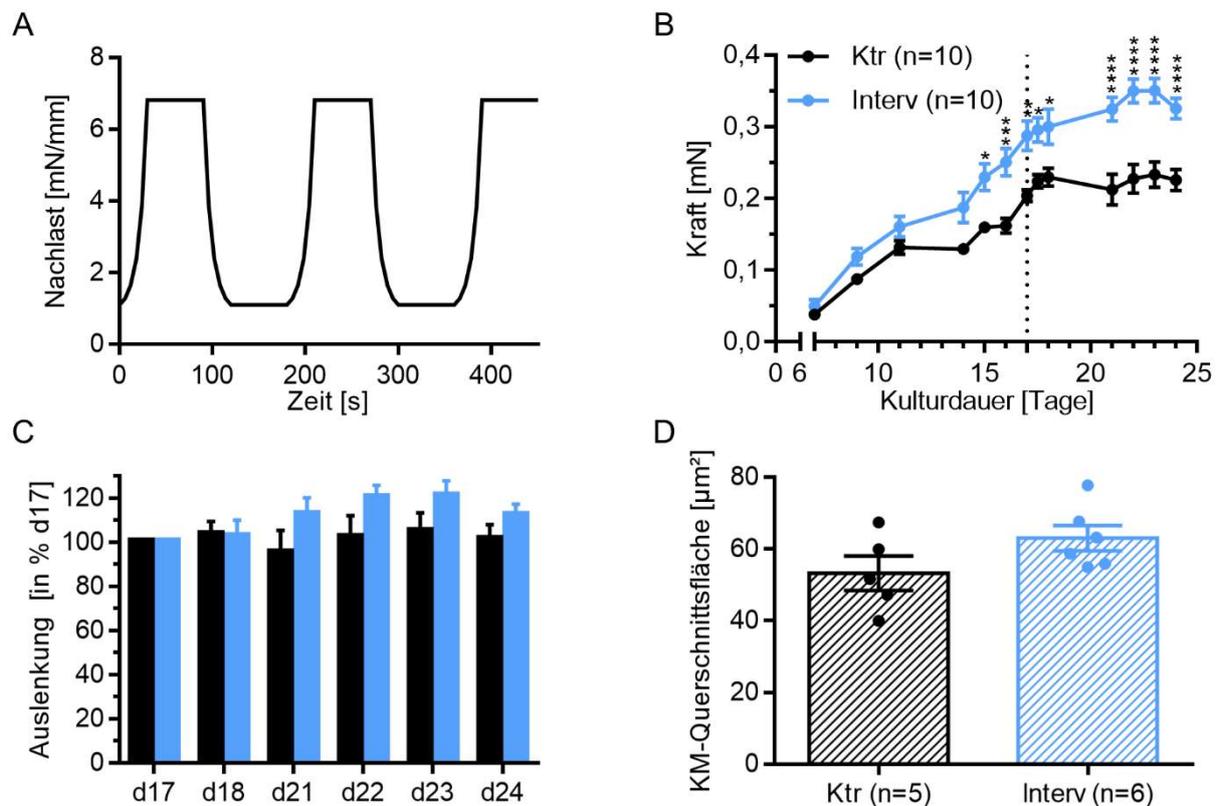


Abb. 3.12: Konzeption und Effekte eines Intervall-Nachlast-Programmes. (A) Abgebildet ist der Verlauf der Nachlast über 2,5 Zyklen des Nachlast-Programmes, dem Ratten-EHTs für den Zeitraum der Intervention permanent ausgesetzt wurden. (B) Über den Kulturzeitraum hinweg werden dargestellt die Kräfte von Kontroll-EHTs (Ktr) und EHTs, die das Intervall-Nachlast-Programm durchliefen (Interv). Die gestrichelte Linie markiert den Beginn der Intervention. Die Kräfte wurden bei der basalen Nachlast von 0,6 mN/mm für Kontroll- und 0,91 mN/mm für Interv.-EHTs gemessen. (C) Die gemessenen Silikonfuß-Auslenkungen von je 10 Ktr und Interv-EHTs wurde auf die Werte von Tag 17 zu Beginn der Intervention normalisiert und als Balkendiagramme für die einzelnen Tage der Intervention aufgetragen. (D) Kardiomyozyten-Querschnittsflächen wurden aus Dystrophin-gefärbten EHT-Präparaten bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert ein EHT; pro EHT wurden 50 Zellen vermessen.

Da die Verwendung unterschiedlich steifer Silikonracks als kontinuierlicher Nachlast-Stimulus keine kardiale Hypertrophie bewirkte, sollten die Auswirkungen von dynamischen Nachlast-Zuständen auf EHTs charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden Ratten-EHTs auf magnetischen Silikon-Halterungen gemäß 2.6.3.1 kultiviert; nach 16 Tagen wurden EHTs der Interventionsgruppe mithilfe der *Piezo-Stage* (2.6.3) dem in Abbildung 3.12 (A) dargestellten Intervall-Nachlastprogramm unterzogen. Die Nachlast dieser EHTs wechselte in 90 Sekunden langen Zyklen zwischen der maximal erreichbaren Nachlast von 6,8 mN/mm und einer geringen Nachlast von ungefähr 1 mN/mm. Die Applikation dieses Intervall-Programms wurde während der 7 Tage andauernden Intervention lediglich für den Medienwechsel und für die Video-optischen Kontraktilitätsmessungen unterbrochen; während der Kontraktilitäts-Messungen waren die Intervall-EHTs also lediglich der basalen Steifigkeit der mit Magneten versehenen Silikonfüßen ausgesetzt. Wie aus Abb. 3.12 (B) ersichtlich, waren die Kräfte der Intervall-EHTs über den kompletten Kulturzeitraum höher als die der Kontroll-EHTs. Vor und

nach der Intervention betragen die Kräfte der Intervall EHTs im Mittel 0,29 mN bzw. 0,33 mN, die der Kontrollgruppe lediglich 0,20 mN und 0,23 mN. Dieser Unterschied ließ sich vermutlich darauf zurückführen, dass die Silikonfüße der Intervall-EHTs durch die enthaltenen Magnete mit 0,91 mN/mm eine größere basale Steifigkeit aufwiesen als die der Kontroll-EHTs mit 0,60 mN/mm – die Intervall-EHTs waren also auch schon in der Kulturzeit vor der Intervention einer etwas höheren Nachlast ausgesetzt als die Kontrollgruppe. Um unabhängig von diesem Unterschied der basalen Nachlast eine Aussage über den Effekt des Intervall-Nachlast-Programms auf die Kontraktilität treffen zu können, wurden für Abbildung 3.12 (C) die im Interventionszeitraum gemessenen Silikonfuß-Auslenkungen aller EHTs auf die letzten gemessenen Werte vor der Intervention normalisiert. Hier zeigte sich, dass die Intervall-EHTs gegenüber der Kontrollgruppe während der Intervention in einem statistisch nicht signifikanten Trend geringfügig an Kontraktilität zulegen. Um zu überprüfen, ob das Intervall-Programm einen Einfluss auf die Zellgrößen von Kardiomyozyten in Ratten-EHTs hatte, wurden deren Querschnittsflächen in Dystrophin-gefärbten EHT-Querschnitten gemessen. Hier wiesen angeschnittene Kardiomyozyten aus Intervall-EHTs mit $63 \mu\text{m}^2$ im Mittel eine größere Fläche auf als Zellen der Kontrollgruppe mit $53 \mu\text{m}^2$ - dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Das einwöchige Intervall-Programm vermochte in Ratten-EHTs weder eine Steigerung der Kontraktilität noch der Zellgröße im Sinne einer physiologischen Hypertrophie herbeiführen – auch wenn für beide Parameter tendenziell etwas höhere Werte bei Intervall-EHTs gegenüber Kontroll-EHTs gemessen wurden.

3.5 Kultur von EHTs bei schrittweise zunehmender Nachlast

3.5.1 Effekte inkrementell erhöhter Nachlast auf Ratten-EHTs

Neben der Verwendung verschieden steifer Silikonhalterungen und dem Intervall-Nachlast-Programm wurde eine schrittweise Erhöhung der EHT-Nachlast als dritte mechanische Intervention zur potenziellen Herbeiführung einer physiologischen Hypertrophie in EHTs getestet. Für die erstgenannten beiden Interventionen waren die Versuche zur Induktion physiologischer Hypertrophie vor allem an Ratten-EHTs durchgeführt worden – schließlich hatten sich Ratten-EHTs im Vergleich zu humanen EHTs in den AE-Experimenten durch ausgeprägtere biologische Reaktionen auf die Intervention als plastischerer „Modell-Organismus“ hervorgetan (Hirt et al. 2012, Werner 2018). Für die Intervention der inkrementell erhöhten Nachlast wurden Ergebnisse eines Versuch an Ratten-EHTs bereits von Rodriguez, Werner, **Becker** et al. veröffentlicht (2019): Hier führte die schrittweise Steigerung der Nachlast zu einer Zunahme der Kontraktionskraft auf mehr als das Dreifache der Werte, die bei EHTs der Kontrollgruppe gemessen wurden (Abb. 3.13 A). Mit diesem Vorgang ging allerdings keine Hypertrophie in Form einer Zunahme der entsprechenden Kardiomyozyten-Querschnittsflächen einher (Abb. 3.13 B). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Versuchs-Protokoll auf humane ERC001-EHTs übertragen.

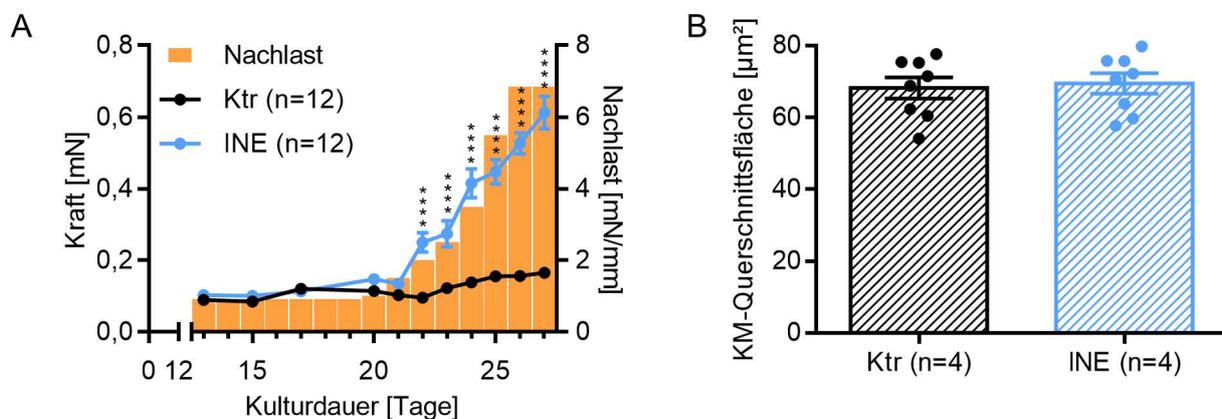


Abb. 3.13: Effekte von schrittweise zunehmender Nachlast auf Ratten-EHTs. Abbildungen modifiziert nach Rodriguez, Werner, **Becker** et al. (2019). (A) Aufgetragen sind die über den Kulturzeitraum gemessenen Kontraktionskräfte von Kontroll-EHTs (schwarze Punkte) und EHTs, die der inkrementellen Nachlast-Erhöhung unterworfen wurden (INE; blaue Punkte). Die orangen Balken stellen die Nachlast der INE-EHTs dar und sind an der rechten Y-Achse abzulesen. (B) Histologisch bestimmte Querschnittsflächen von Kardiomyozyten aus Kontroll-EHTs (schwarze Punkte) und INE-EHTs (blaue Punkte) des gleichen Experiments. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 50 vermessenen Zellen eines EHTs.

3.5.2 Effekte inkrementell erhöhter Nachlast auf humane ERC001-EHTs

Humane EHTs der Zelllinie ERC001 wurden an magnetischen Silikonracks gemäß 2.6.3.1 kultiviert. Mittels der *Piezo-Stage* (2.6.3) wurde die Nachlast von EHTs der Interventionsgruppe ab Tag 15 der EHT-Kultur schrittweise von 0,91 mN/mm auf 6,81 mN/mm erhöht. Es wurden die gleichen Nachlast-Inkremente gewählt, die auch für den oben beschriebenen analogen Versuch an Ratten-EHTs verwendet wurden – lediglich der erste Nachlast-Erhöhrungs-Schritt von 0,91 mN/mm auf 1 mN/mm wurde übersprungen. Die EHTs wurden nur zum Medienwechsel aus der *Piezo-Stage* entfernt, dementsprechend fanden die Kontraktilitätsmessungen während der Intervention bei erhöhter Nachlast statt.

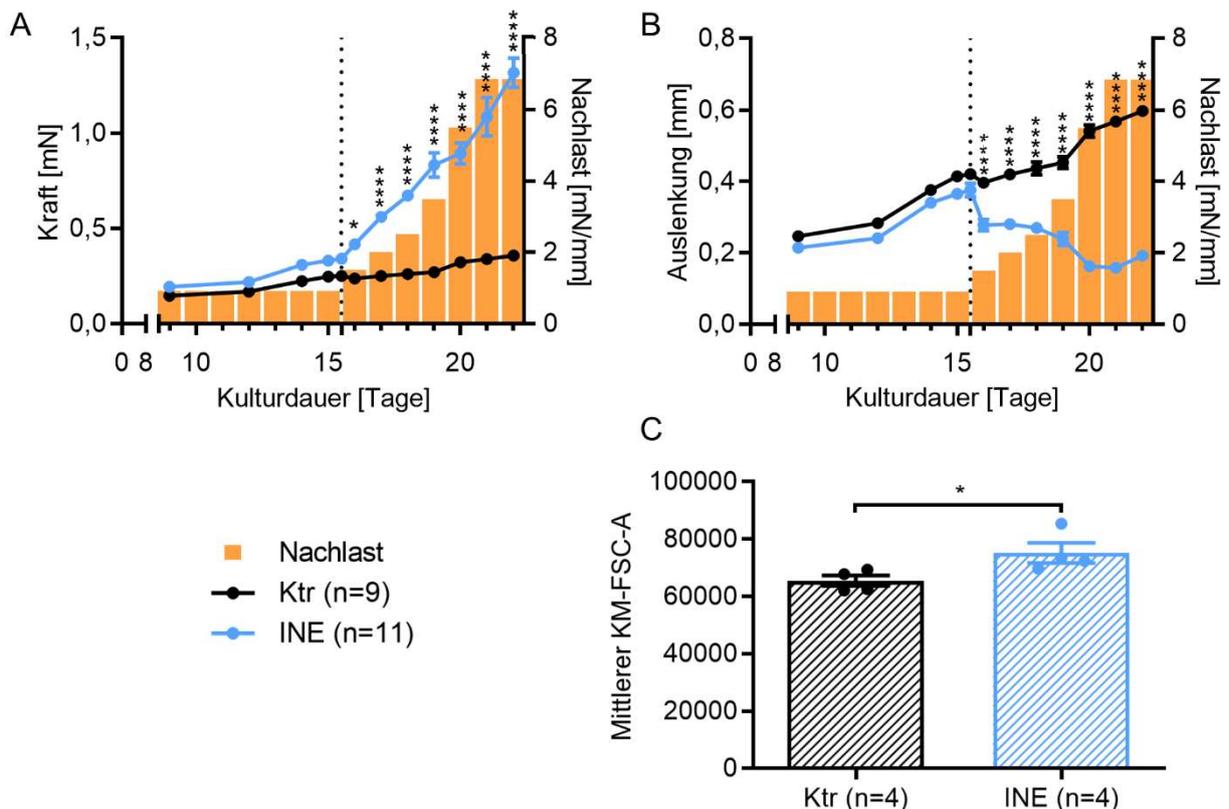


Abb. 3.14: Effekte der schrittweisen Nachlast-Erhöhrung auf Kontraktilität und Zellgrößen in humanen ERC001-EHTs. (A) Dargestellt sind die über den Kulturzeitraum gemessenen Kontraktionskräfte von Kontroll-EHTs (schwarze Punkte) und EHTs, die der inkrementellen Nachlast-Erhöhrung unterzogen wurden (INE-EHTs; blaue Punkte). Die orangen Balken repräsentieren die Nachlast der INE-EHTs am entsprechenden Kulturtag und beziehen sich auf die linke Y-Achse. Die gestrichelte Linie markiert den Beginn des Interventionszeitraums. (B) Abgebildet sind die gemessenen Silikonfuß-Auslenkungen von INE- und Kontroll-ERC001-EHTs über den Kulturzeitraum. Die orangen Balken und die gestrichelte Linie sind analog zu (A) zu verstehen. (C) Die Balken repräsentieren die mittleren FSC-A-Werte, die an Kardiomyozyten aus Ktr- oder INE-EHTs gemessen wurden. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aller vermessenen Kardiomyozyten aus einem dissoziierten EHT (2546 > n > 3718).

Die mittlere gemessene Kontraktionskraft der EHTs, die die inkrementelle Nachlast-Erhöhrung durchliefen (INE-EHTs), nahm im Laufe der Intervention mit zunehmender Nachlast von 0,34 mN auf 1,31 mN auf beinahe das Vierfache zu. Die Kontroll-EHTs zeigten in demselben Zeitraum lediglich eine Kraftsteigerung von 0,25 mN auf 0,39 mN (Abb. 3.14 A). Während die

Silikonfuß-Auslenkung der Kontroll-EHTs proportional zur Kontraktionskraft im Interventionszeitraum von 0,42 mm auf 0,6 mm zunahm, sank die Auslenkung der INE-EHTs am ersten Interventionstag schlagartig, danach sukzessive um die Hälfte von 0,38 mm auf 0,19 mm (Abb. 3.14 B).

Vier EHTs jeder der beiden Versuchsgruppen wurden am letzten Kulturtag gemäß 2.8 einem Papain-Verdau unterzogen und anschließend mit einem FITC-gekoppelten Troponin-Antikörper gefärbt. Wie in Abbildung 3.14 (C) dargestellt, ergab die durchflusszytometrische Analyse der Proben, dass der mittlere FSC-A-Wert der Kardiomyozyten aus INE-EHTs 15% höher war als der Wert von Zellen aus der Kontrollgruppe. Wenn man gemäß 3.2.2 davon ausginge, dass dies einer Steigerung des Kardiomyozyten-Durchmessers von 15% gleichkäme, so wäre (bei einer idealisiert kugelförmigen Herzmuskelzelle) eine Steigerung der Querschnittsfläche um 15,6% die Konsequenz.

Um besser einordnen zu können, welche Form kardialer Plastizität dieser (leichten) Kardiomyozyten-Hypertrophie zugrunde lag, wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR in Proben aus Kontroll- und INE-EHTs der Zelllinie ERC001 die Expression von 13 verschiedenen Genen quantifiziert. Diese Gene entstammten zum einen dem Spektrum des fetalen Genprogramms, das im Rahmen pathologischer kardialer Hypertrophie reaktiviert wird; zum anderen wurden Gene ausgewählt, die in der Literatur in Tiermodellen physiologischer kardialer Hypertrophie gegenüber Kontrollen differenziert exprimiert wurden.

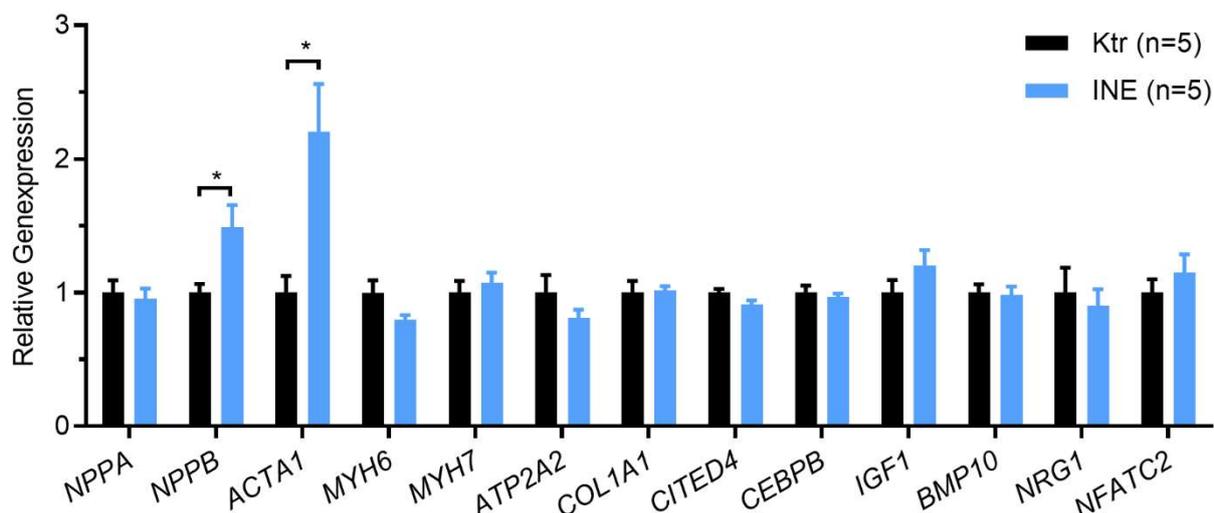


Abb. 3.15: Effekte der schrittweisen Erhöhung von Nachlast auf die Genexpression humaner ERC001-EHTs. Abgebildet sind die relativen Expressionsniveaus 13 verschiedener Gene, bestimmt aus Proben von INE-EHTs (blaue Balken) oder Kontroll-EHTs (schwarze Balken). Genexpressionen sind gemäß 2.9.3 angegeben als $\Delta\Delta$ -CT-Werte.

Wie in Abb. 3.15 dargestellt, waren *NPPB* und *ACTA1* als Vertreter des fetalen Genprogramms in INE-EHTs 1,5- bzw. 2,2-fach höher exprimiert als in Kontroll-EHTs. Bezüglich der anderen untersuchten Gene wiesen beide Versuchsgruppen lediglich statistisch nicht signifikante

Trends zu unterschiedlichen Expressionsniveaus auf. So war in ERC001-INE-EHTs das für die SERCA-Pumpe codierende *ATP2A2*-Gen tendenziell vermindert exprimiert, was eher als Anzeichen pathologischer kardialer Umbauprozesse zu deuten wäre. Die leicht vermehrte Expression von *MYH7* wäre ebenso einzuordnen.

Wäre eine eher physiologische kardiale Hypertrophie Ursache der gemessenen Zellgrößen bei INE-EHTs gewesen, so wäre tendenziell eine vermehrte Expression von *CITED4* und der für Wachstumsfaktoren codierenden Gene *IGF1*, *BMP10* und *NRG1* zu erwarten – einzig *IGF1* zeigte sich jedoch im Trend vermehrt exprimiert, die restlichen genannten Gene eher vermindert. Das für den Transkriptionsfaktor NFAT codierende Gen *NFATC2* wurde in der Literatur im Rahmen physiologischer Hypertrophie vermindert transkribiert – die tendenziell erhöhte *NFATC2*-Expression humaner ERC001-INE-EHTs steht dazu also eher im Widerspruch.

Alles in allem wiesen ERC001-INE-EHTs also deutlich gesteigerte Kontraktionskräfte bei allerdings geringeren Silikonfuß-Auslenkungen auf. Eine leichte Kardiomyozyten-Hypertrophie war durchflusszytometrisch nachweisbar; das Genexpressionsmuster der ERC001-INE-EHTs deutete dabei eher auf das Vorliegen eines pathologischen als eines physiologischen Umbauprozesses hin.

3.6 Direkter Einfluss von Nachlast auf EHT-Kontraktilität

Sowohl bei Ratten- als auch bei humanen EHTs, die einer inkrementellen Nachlast-Steigerung unterworfen wurden, konnten deutlich gesteigerte Kontraktionskräfte gemessen werden. Bei Ratten-EHTs wurde in diesem Zusammenhang allerdings keine, in humanen ERC001-EHTs lediglich eine geringe Kardiomyozyten-Hypertrophie gemessen; auch bezüglich der Genexpression unterschieden sich weder Ratten- noch humane INE-EHTs sehr deutlich von den entsprechenden Kontrollen (Rodriguez et al. 2019). Insofern erschien es fraglich, ob die gemessenen Kraftzunahmen tatsächlich von Umbauprozessen auf Zell- oder Gewebeebene herrührten. Um in diesem Punkt etwas mehr Klarheit zu erlangen, wurde eine weitere Generation von Ratten-INE-EHTs kultiviert und nach der Nachlast-Erhöhung schrittweise wieder entlastet.

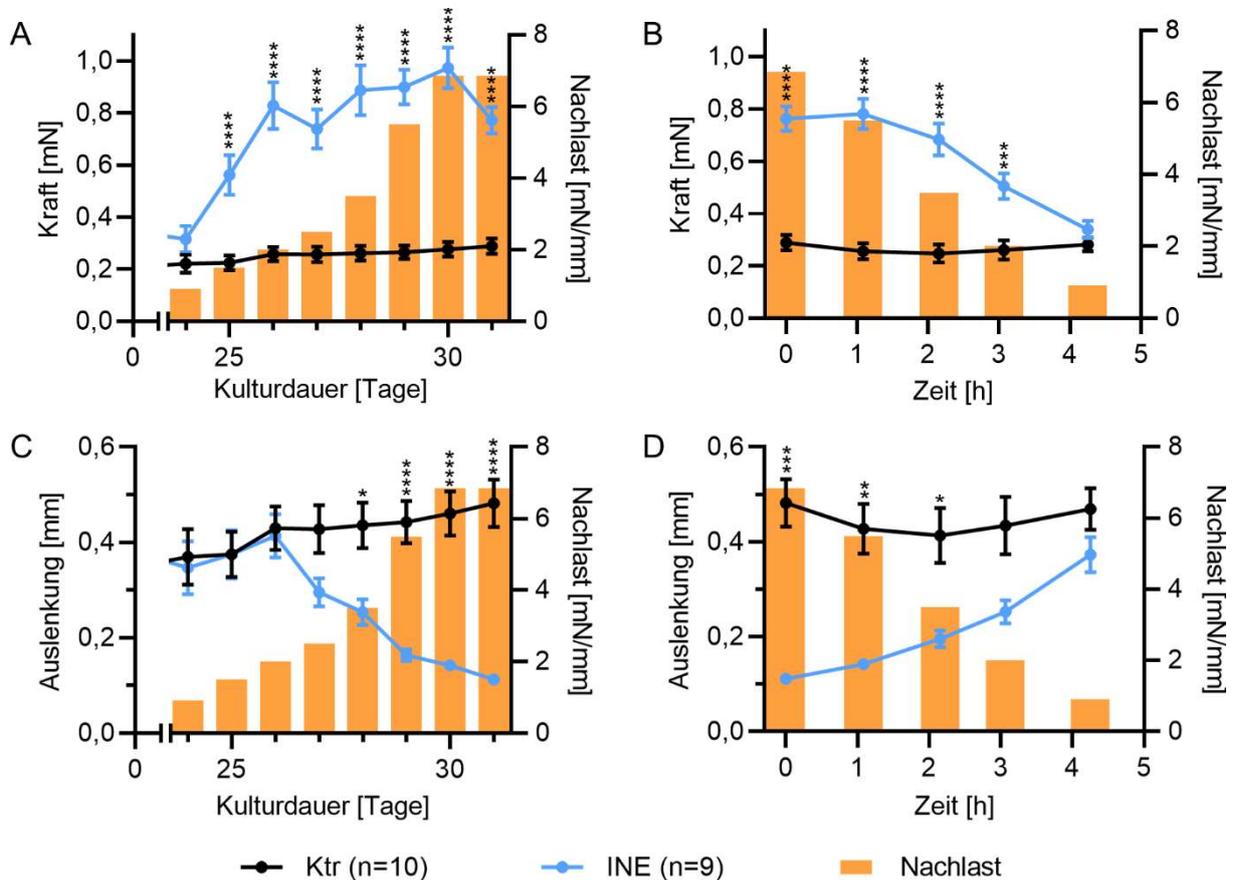


Abb. 3.16: Kontraktilität von Ratten-EHTs während der inkrementellen Erhöhung und Absenkung der Nachlast. (A+C) Abgebildet sind die über die Kulturdauer gemessenen Kontraktionskräfte bzw. die Silikonfuß-Auslenkungen von Ratten-EHTs, die entweder steigenden Nachlasten ausgesetzt wurden (blaue Punkte) oder als Kontrollgruppe dienten (schwarze Punkte). Die orangen Balken repräsentieren die Nachlast gemäß der rechten Y-Achse. (B+D) Dargestellt sind die Kontraktionskräfte bzw. die Silikonfuß-Auslenkung derselben EHTs wie in (A) und (C), die während der inkrementellen Verringerung der Nachlast am Ende der Kulturzeit über wenige Stunden gemessen wurden. Wiederum repräsentieren die blauen Punkte die EHTs an magnetischen Silikonracks, die schwarzen Punkte die Kontrollgruppe und die orangen Balken die absinkende Nachlast.

Wie aus Abb. 3.16 (A) ersichtlich, zeigten auch diese INE-Ratten-EHTs während der inkrementellen Nachlasterrhöhung unter serumfreien Kulturbedingungen eine deutliche Zunahme der Kontraktionskraft bis auf das 3-fache der Ausgangswerte. Gleichzeitig nahm ab dem vierten Nachlast-Inkrement die Silikonfuß-Auslenkung der INE-EHTs deutlich ab, wie in Abb. 3.16 (C) zu sehen. Nach der einwöchigen stufenweisen Nachlast-Erhöhung wurde nun am Ende der EHT-Kultur die Nachlast in ähnlichen Inkrementen im Laufe weniger Stunden wieder abgesenkt. Abb. 3.16 (B) visualisiert, dass im Laufe dieses Vorgangs die Kontraktionskraft der INE-EHTs im Mittel auf 0,34 mN absank, was dem Kraftniveau von 0,29 mN am letzten Kulturtag vor der INE-Intervention nahezu gleichkam. Parallel dazu nahm die Silikonfuß-Auslenkung der INE-EHTs mit abnehmender Nachlast wieder zu, um sich schließlich bei der niedrigsten Nachlast von 0,91 mN/mm mit 0,37 mm wieder dem mittleren Ausgangswert von 0,32 mm anzunähern. Diese Entwicklungen bezüglich der Kontraktibilität der untersuchten EHTs bekräftigten die Annahme, dass keine biologischen Umbauprozesse die gemessenen hohen Kontraktionskräfte bei hohen Nachlasten bedingten – darüber hinaus implizierten sie, dass ein direkter Zusammenhang zwischen EHT-Nachlast und gemessener Kraft bestand.

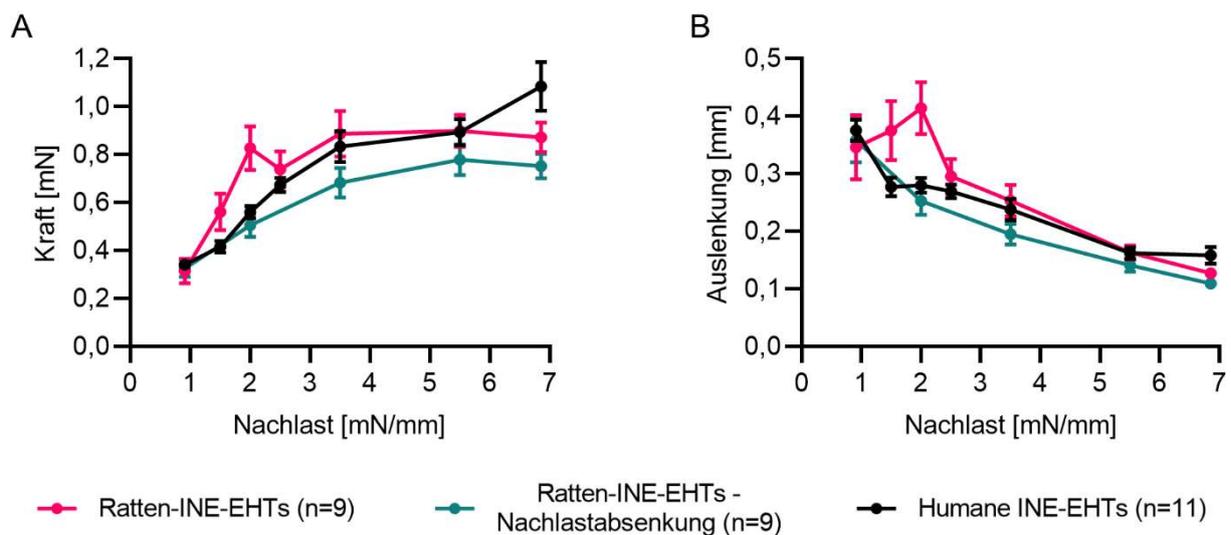


Abb. 3.17: Gemessene Kontraktionskraft und Silikonfußauslenkung von EHTs in Abhängigkeit von deren Nachlast. (A) EHT-Kontraktionskräfte aus drei verschiedenen Datensätzen sind aufgetragen gegen die Nachlast, unter der die EHTs zum Zeitpunkt der Messung kultiviert wurden – unabhängig also vom Zeitpunkt der Messung bezogen auf die Kulturdauer. Die pinke bzw. die blaugrüne Linie repräsentieren dabei die Werte der Ratten-EHTs, die auch in Abb. 3.16 (A) bzw. (B) abgebildet sind; die schwarze Linie bildet Daten humaner EHTs aus dem Versuch Abb. 3.14 (A) ab. (B) Statt der Kontraktionskraft ist hier die gemessene Silikonfuß-Auslenkung derselben EHTs in Abhängigkeit von der Nachlast zum Zeitpunkt der Messung aufgetragen. Für die EHT-Generationen, an denen zwei Messungen bei der Nachlast von 6,85 mN/mm vorgenommen wurden, wurde der Mittelwert der Kontraktionskraft bzw. Auslenkung aus diesen beiden Werten gebildet und in dieser Abbildung aufgetragen.

Dieser Zusammenhang zwischen EHT-Nachlast und -Kontraktibilität wird in Abb. 3.17 deutlich: Hier wurden Datensätze verschiedener EHTs verglichen, die allesamt entweder einer

schrittweisen Erhöhung bzw. Absenkung der Nachlast unterworfen worden waren. Dabei zeigte sich, dass auf Herzmuskelzellen verschiedener Spezies basierende EHTs über verschiedene Versuche hinweg bei zunehmender Nachlast vergleichbare Steigerungen der Kontraktionskraft bzw. Verminderungen der Silikonfuß-Auslenkung aufwiesen. Bemerkenswert ist die Ähnlichkeit der gemessenen Werte auch unter dem Aspekt, dass die Messungen bei zwei der drei Versuchen im Zeitraum von einer Woche, bei dem dritten Versuch im Verlauf weniger Stunden durchgeführt wurden – dieser Gesichtspunkt wurde in der graphischen Darstellung nicht berücksichtigt.

Alles in allem zeigte sich also, dass sowohl bei langsamer inkrementeller Nachlast-Erhöhung wie auch schneller Nachlast-Absenkung sowohl bei humanen als auch bei Ratten-EHTs ein ähnlicher Zusammenhang zwischen EHT-Nachlast und -Kontraktilität bestand.

3.6.1 Der Frank-Starling-Mechanismus als möglicher Urheber der in EHTs beobachteten Nachlast-Kraft-Beziehung

Als eine mögliche Erklärung für die beschriebene direkte Nachlast-Kraft-Beziehung wurde der Frank-Starling-Mechanismus ins Auge gefasst. Dieser Mechanismus erlaubt es dem arbeitenden Herzen, das Schlagvolumen an die Vorlast, also das zum Herzen zurückfließende Blutvolumen, anzupassen. Auf zellulärer Ebene bewirkt eine größere Vordehnung des Myokards eine Sensibilisierung der Myofilamente für Ca^{2+} -Ionen und eine verbesserte Überlappung kontraktile Elemente in den Kardiomyozyten – mit zunehmender Vordehnung nimmt also die Kontraktilität der Kardiomyozyten zu (Hoth und Wischmeyer 2016).

Für die vorliegende Arbeit wurde zur Nachlast-Modifikation in EHTs unter anderem das Piezo-Stage-System genutzt. Dessen Funktionsweise beruht darauf, dass ein kleiner Magnet im Silikonfuß einer EHT-Halterung und ein größerer Magnet darunter axial angeordnet werden. Auch wenn diese Übereinstimmung der beiden Magnet-Längsachsen sorgfältig überprüft wurde, ließen sich kleine Verschiebungen der Magnet-Achsen gegeneinander nicht vermeiden. Eine solche Verschiebung könnte durch eine ungewollte Auslenkung des Silikon-Fußes eine vermehrte Aktivierung des Frank-Starling-Mechanismus mit konsekutiv erhöhter Kontraktilität ausgelöst haben.

Um zu überprüfen, ob die gemessene Nachlast-Kraft-Beziehung durch eine unabsichtliche Dehnung der EHTs bei Nachlastveränderung zustande kam, wurde die Nachlast von Ratten-EHTs auf 3 mN/mm, 5 mN/mm und 6,85 mN/mm erhöht und die resultierende Kraftveränderung Video-optisch gemessen. Zusätzlich wurde die Veränderung der

diastolischen Länge der EHTs während der Nachlast-Erhöhung auf Einzelbildern aus dem Videomaterial der Kontraktilitäts-Analyse vermessen.

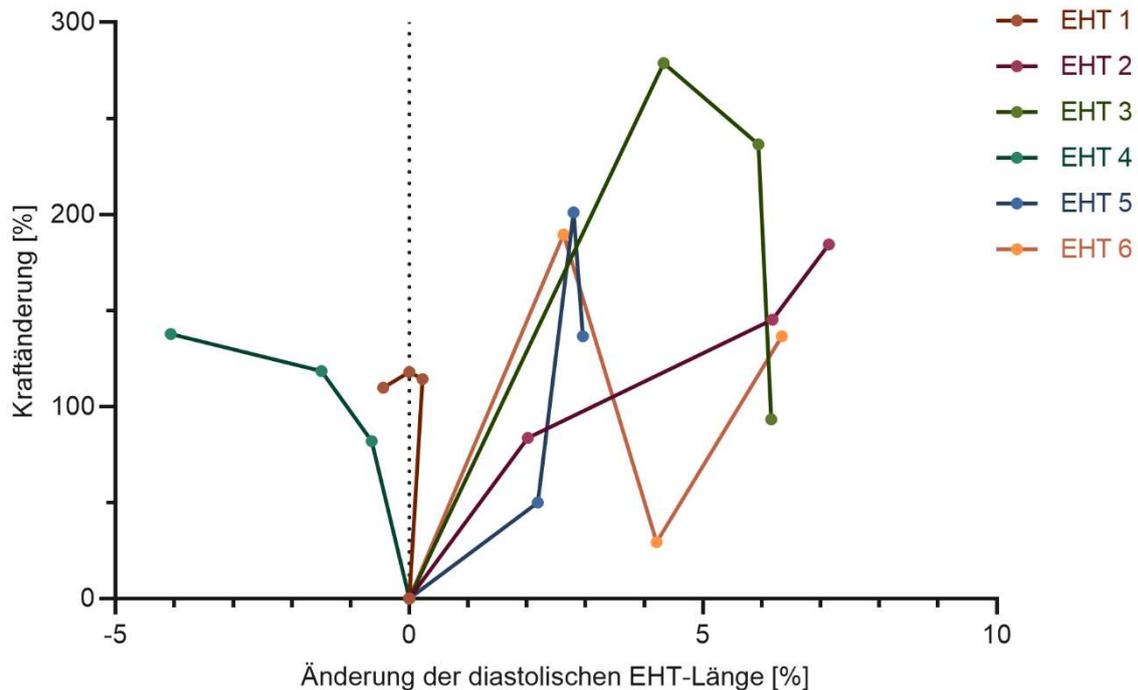


Abb. 3.18 Kraft- und Längenveränderung von EHTs während der Nachlastmodifikation mittels Piezo-Stage. Aufgetragen ist die Kraftänderung verglichen zum Ausgangswert gegen die Längenänderung verglichen zum Ausgangswert, die in Ratten-EHTs während der Nachlastmodifikation mittels *Piezo-Stage* gemessen wurden. Die gestrichelte Linie repräsentiert die Ausgangslänge. Jede der farbigen Linien entspricht einem der 6 untersuchten EHTs. EHT 5 und EHT 6 wurden während des Versuchs mit einer Frequenz von 1 Hz elektrisch stimuliert. Auf eine statistische Analyse der dargestellten Daten wurde verzichtet.

Während dieses Versuchs ließ sich gemäß Abb. 3.18 kein eindeutiger Zusammenhang zwischen (unbeabsichtigter) EHT-Längenänderung und der gemessenen Kraft bei Verwendung der *Piezo-Stage* feststellen. Während EHT 2, 3, 5 und 6 zunehmend höhere Kräfte bei größeren diastolischen Längen aufwiesen, zeigte EHT 1 im Vergleich zur Ausgangsmessung größere Kräfte bei lediglich praktisch identischer diastolischer Länge. Bei EHT 4 trat sogar eine Kraftzunahme bei abnehmender diastolischer Länge auf – genau entgegengesetzt dem Ergebnis, das bei einer Beobachtung des Frank-Starling-Mechanismus zu erwarten wäre. Es erscheint also unwahrscheinlich, dass die beschriebene Zunahme der gemessenen Kontraktionskraft bei Nachlastenerhöhung mittels *Piezo-Stage* vollständig auf den durch ungewollte Vordehnung der EHTs ausgelösten Frank-Starling-Mechanismus zurückzuführen war.

3.6.2 Der Anrep-Effekt als möglicher Urheber der Nachlast-Kraft-Beziehung

Ein zweiter physiologischer Mechanismus, der als mögliche Ursache der Nachlast-Kraft-Beziehung von EHTs in Frage kam, ist der Anrep-Effekt. Während der Frank-Starling-Mechanismus eine sofortige Steigerung der Kontraktionskraft bei vermehrter Myokard-Dehnung bewirkt, versteht man unter dem Anrep-Effekt eine langsame Kraftzunahme über einen Zeitraum von etwa 15 Minuten infolge einer erhöhten Vorlast – von daher rührt auch der englische Begriff dieses physiologischen Phänomens, „*Slow Force Response*“ (Cingolani et al. 2013).

Um zu überprüfen, ob eine ungewollt erhöhte Vordehnung durch Auslösen des Anrep-Effekts für die observierte Nachlast-Kraft-Beziehung bei EHTs verantwortlich war, wurde die Nachlast von EHTs von 0,91 mN/mm auf 3 mN/mm, 5 mN/mm oder 6,85 mN/mm erhöht und anschließend die Kontraktilität der EHTs über 15 Minuten kontinuierlich gemessen.

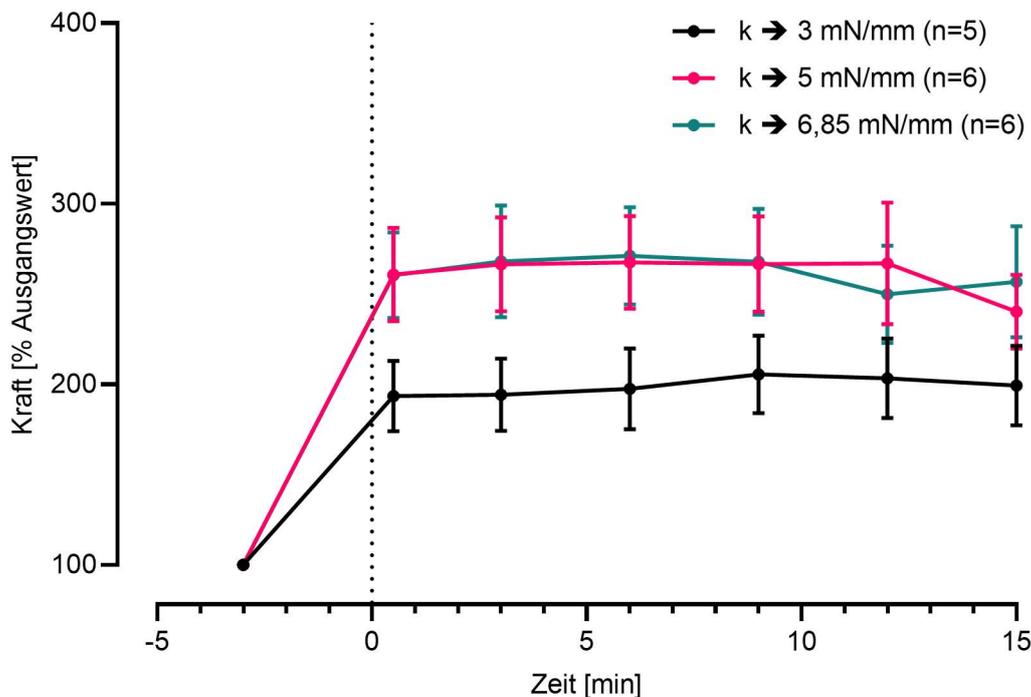


Abb. 3.19 Zeitlicher Verlauf der Kraftzunahme nach Nachlasterhöhung. Abgebildet sind die Kräfte von EHTs, die kurz vor und im Zeitraum von 15 Minuten nach einer Nachlasterhöhung gemessen wurden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt der Nachlasterhöhung. Auf eine statistische Analyse der dargestellten Daten wurde verzichtet.

In Abb. 3.19 ist zu erkennen, dass die Kontraktionskraft mit der Nachlasterhöhung zunahm, in den 15 Minuten nach der Nachlasterhöhung aber konstant blieb – in allen drei Versuchsgruppen. Beim Vorliegen eines Anrep-Effekts wäre eine langsame Zunahme der Kraft um bis zu 25% in diesem Zeitraum zu erwarten gewesen (Cingolani et al. 2013).

Alles in allem schien der Zusammenhang zwischen zunehmender Nachlast und zunehmender Kontraktionskraft in EHTs weder durch den Frank-Starling-Mechanismus noch durch den Anrep-Effekt (hinreichend) erklärbar.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane EHTs der Zelllinie ERC001 als potenzielles Modell mechanisch induzierter pathologischer kardialer Hypertrophie einer 12-fachen Nachlasterhöhung unterworfen. Die ERC001-AE-EHTs wiesen eine deutlich beeinträchtigte Kontraktilität und eine erhöhte Expression einiger Gene bzw. Proteine des fetalen Genprogramms auf. Eine Kardiomyozyten-Hypertrophie ließ sich durch die Intervention jedoch nicht provozieren.

Um Ratten- und humane EHTs als potenzielle Modelle mechanisch induzierter physiologischer kardialer Hypertrophie zu untersuchen, wurden drei unterschiedlich dosierte Nachlast-Stimuli angewendet. Die Kultur von Ratten-EHTs an unterschiedlich steifen Silikonracks (bis zu 2,1 mN/mm) zeigte, dass mit zunehmender Steifigkeit tendenziell die Kontraktionskraft zu- und die Silikonfußauslenkung abnahmen. Eine Zunahme der Zellgröße wurde dabei nicht beobachtet. Außerdem wurden Ratten-EHTs einem Intervall-Nachlast-Programm unterzogen – dieses bewirkte lediglich im Trend eine Zunahme von EHT-Kontraktilität und Kardiomyozyten-Größe. Als dritte Intervention wurde eine schrittweise Erhöhung der Nachlast auf bis zu 6,8 mN/mm durchgeführt. Sowohl bei Ratten- als auch bei humanen EHTs bewirkte dies eine enorme Zunahme der Kontraktionskraft bei gleichzeitiger Abnahme der Silikonfußauslenkung. In humanen ERC001-EHTs konnten darüber hinaus eine Zunahme der Kardiomyozyten-Größe und eine erhöhte Expression von Genen des fetalen Genprogramms gemessen werden.

Wurde nach der inkrementellen Nachlasterhöhung schrittweise die Nachlast wieder abgesenkt, so fiel auch die Kontraktionskraft ab – dies implizierte einen direkten Zusammenhang zwischen EHT-Nachlast und -Kontraktilität. Da die Steigerung der Kraft bei zunehmender Nachlast plötzlich passierte und sich nicht regelhaft mit Veränderungen der diastolischen EHT-Länge in Zusammenhang bringen ließ, schied der Frank-Starling-Mechanismus und der Anrep-Effekt als Mediatoren der Kraft-Nachlast-Beziehung eher aus.

4.1 Pathologische kardiale Hypertrophie in humanen ERC001-EHTs

4.1.1 Die AE-Intervention zur Induktion pathologischer kardialer Hypertrophie

Mit dem Ziel der Induktion pathologischer kardialer Umbauprozesse in humanen EHTs der Zelllinie ERC001 wurden in der vorliegenden Arbeit Stahlklammern in die EHT-Silikonhalterungen eingeführt (AE-Intervention). Dies hatte eine Zunahme der Steifigkeit der Halterungen um mehr als das 10-fache zum Resultat (Sörensen 2013). Die Nachlast eines

jeden Muskels ist definiert als die Gesamtkraft, die der Verkürzung der Sarkomere entgegenwirkt - abzüglich eventueller Dehnungskräfte, abzüglich der Vorlast also (LaCombe et al. 2021). Dementsprechend stellte das Einbringen einer Stahlklammer in die Silikonfüße eine „saubere“ Erhöhung der Nachlast bei gleichbleibender Vorlast dar: Die erhöhte Steifigkeit wirkte der Kontraktion der im EHT enthaltenen Herzmuskelzellen entgegen, während der Abstand der Silikonfüße und damit auch Länge und Dehnung des EHTs konstant blieben.

Analog zu Erkrankungen des menschlichen Herz-Kreislauf-Systems, die zu einer Erhöhung der kardialen Nachlast führen, wurde durch die AE-Intervention in humanen EHTs die Ausprägung einiger Merkmale pathologischen *Remodelings* ausgelöst. In diesem Kontext muss darauf verwiesen werden, dass die instantane 10-fache Nachlasterhöhung durch die AE-Intervention kaum mit bekannten Erkrankungen des menschlichen Herzens vergleichbar ist. Die endsystolische Wandspannung (ESWS) als Maß für Nachlast im menschlichen Herzen lässt sich echokardiographisch bei bekanntem arteriellen Blutdruck bestimmen, eine entsprechende Formel wurde von Brodie et al. publiziert (1976). Bei unveränderter kardialer Geometrie würde gemäß dieser Formel eine Erhöhung der Nachlast bzw. ESWS um das 10-fache eine Erhöhung des endsystolischen Blutdrucks in mmHg um mehr als das 7-fache erfordern – von 100 mmHg als beispielhaftem Normwert also auf über 800 mmHg. Zum Vergleich: Von höchstgradigem arteriellen Hypertonus spricht man ab systolischen Werten ≥ 180 mmHg (Williams et al. 2018). Die durch die AE-Intervention ausgeübte Nachlast überschreitet also bei Weitem das Maß, das in *in vivo* selbst in extremen hämodynamischen Zuständen zu erwarten wäre. Darüber hinaus unterscheiden sich die tatsächlichen Krankheiten und das EHT-Modell auch im zeitlichen Verlauf enorm: Während (primäre) arterielle Hypertonie und Herzklappenstenosen langsam entstehen und häufig jahrelang unbehandelt bleiben, erfolgt die Nachlasterhöhung im EHT-Modell in wenigen Sekunden und wird lediglich für eine Woche aufrechterhalten. Die AE-Intervention stellt also einen zeitlich kürzeren, dafür aber sehr viel intensiveren Nachlast-Stimulus dar als entsprechende Herzkrankheiten, die eine Druckbelastung des Herzens erzeugen.

4.1.2 Varianz zwischen durchgeführten ERC001-AE-Experimenten

In den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.4 gezeigte Messungen der Kontraktilität und Genexpression von ERC001-AE-EHTs weisen deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Generationen von EHTs auf. Durch die Verwendung einer *Master Cell Bank* konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten Zellen aus zumindest ähnlichen Passagen derselben Zelllinie stammten – insofern kann davon ausgegangen werden, dass die zur Differenzierung verwendeten hiPSC genetisch einigermaßen homogen waren. M. Schulze stellte im Rahmen ihrer Doktorarbeit fest, dass gemessene kontraktile Parameter von EHTs teilweise mehr zwischen verschiedenen Differenzierungs-Durchläufen („*Batches*“) einer Zelllinie variierten als zwischen

zwei unterschiedlichen Zelllinien. Auch bezüglich der Expression kardialer Gene stellte sie fest, dass sich *Batches* verschiedener Zelllinien teils mehr ähnelten als andere *Batches*, die auf dieselbe Zelllinie zurückzuführen waren (Schulze 2019). Die Variabilität der Ergebnisse von ERC001-AE-Experimenten ist also wahrscheinlich auf Unterschiede zurückzuführen, die – wie von M. Schulze beschrieben – während der Differenzierung von hiPSC auftreten. Diese Unterschiede sind auch bei sorgfältigstem Arbeiten nach Protokoll offensichtlich nicht zu vermeiden, so wurden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten hiPSC-CM von den routinierten und seit Jahren mit der Technik vertrauten Laborkräften T. Schulz und B. Klampe differenziert.

4.1.3 AE-ERC001-EHTs im Vergleich zu AE-EHTs anderer iPS-Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten AE-Versuche an ERC001-EHTs schlossen inhaltlich an die entsprechenden Versuche T. Werners an, deren Ergebnisse in Abschnitt 3.1 dargestellt sind (2018). Tatsächlich reagierten die ERC001-EHTs in ihrer Kontraktilität deutlicher auf die Nachlasterrhöhung als die von T. Werner untersuchten EHTs: Der bei ERC001-EHTs gemessene Kraftabfall während der AE-Intervention von 37,6% war ausgeprägter als bei C25- bzw. ERC018 EHTs, die einen Kraftabfall von 24,7% bzw. keinen signifikanten Kraftverlust im Interventionszeitraum aufwiesen. In T. Werners Experimenten blieb die Expression von *NPPA* und anderen Genen des fetalen Genprogramms von der AE-Intervention unbeeinflusst (Daten größtenteils nicht gezeigt). Insofern sprachen auch hier die ERC001-EHTs deutlicher auf die Nachlasterrhöhung an: *NPPB* und *ACTA1* wurden über mehrere Versuchsgenerationen hinweg auf RNA- bzw. Proteinebene vermehrt exprimiert, die Transkript-Konzentration für *NPPA* zeigte sich teilweise zumindest im Trend erhöht. Warum sich in ERC001-EHTs mit der AE-Intervention eine deutlichere Reaktion provozieren ließ als in EHTs der Zelllinien ERC018 und C25, ist unklar. Da die drei hiPSC-Zelllinien auf Fibroblasten-Kulturen dreier verschiedener (gesunder) Spender zurückzuführen sind, könnte deren genetische Heterogenität Unterschiede im experimentellen Verhalten der Zelllinien erklären. Darüber hinaus ist bekannt, dass während des Re-Programmierens von Fibroblasten zu hiPSC und über die Passagen der hiPSC-Kultur hinweg dynamische genetische Veränderungen auftreten – selbst iPS-Zelllinien, die aus der gleichen fetalen Fibroblasten-Zelllinie re-programmiert wurden, unterscheiden sich genetisch teilweise deutlich (Laurent et al. 2011). Außerdem beruht die Gewinnung von iPS aus differenzierten Zellen auf deren epigenetischer „Umprogrammierung“ – daher ist es nicht verwunderlich, dass dieser Prozess erwiesenermaßen auch zufällige epigenetische Veränderungen bewirkt (Lister et al. 2011). Insofern könnten also vielerlei Faktoren die (epi)genetische Ausstattung der untersuchten Zelllinien beeinflusst haben und so deren unterschiedliches Ansprechen auf dieselbe Intervention erklären.

4.1.4 Aspekte pathologischer kardialer Hypertrophie in ERC001-EHTs

Das übergeordnete Ziel der AE-Experimente an humanen ERC001-EHTs war, deren Tauglichkeit als Modell mechanisch induzierter pathologischer Hypertrophie zu überprüfen. Ratten-AE-EHTs konnten als Modell solcher Umbauprozesse bereits 2012 von Hirt, Sörensen et al. etabliert werden – an dieses Protokoll waren die Versuche der vorliegenden Arbeit angelehnt. Deshalb sollen im folgenden Text Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Ratten- und ERC001-AE-EHTs diskutiert werden.

4.1.4.1 Systolische Dysfunktion

Die Abnahme der Kontraktionskraft als Merkmal systolischer „kardialer“ Dysfunktion war bei Ratten- und humanen ERC001-AE-EHTs mit einem Abfall um 35% bzw. 38% gut vergleichbar (Hirt et al. 2012). Systolische kardiale Dysfunktion, im Menschen echokardiographisch messbar als erniedrigte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), ist nicht nur Voraussetzung für die Diagnose einer Herzinsuffizienz mit reduzierter EF (HFrEF) – der Grad der systolischen Funktionseinschränkung ist auch ein prognosebestimmender Faktor: Ab einer LVEF von 40% nimmt mit abnehmenden Werten die Mortalität von Herzinsuffizienzpatienten deutlich zu (Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure 2011). Ausgehend von einem normalen Wert von 60% würde ein Abfall der LVEF um 38% in einer LVEF von 37% resultieren. Die in Ratten- und humanen EHTs modellierbare Abnahme systolischer Herzfunktion wäre im Menschen (rechnerisch) also vergleichbar mit der Entwicklung einer moderaten systolischen Dysfunktion, ausgehend von einer normwertigen LVEF. Diese übertragene Einschränkung der EF würde im Kontext einer Herzinsuffizienz auch eine Verschlechterung der Prognose bedeuten.

4.1.4.2 Diastolische Dysfunktion und Fibrose

Neben der systolischen Dysfunktion ließ sich an Ratten-EHTs auch eine Zunahme der Relaxationszeit als Zeichen von diastolischer Funktionsminderung messen (Hirt et al. 2012) – entsprechende Veränderungen blieben bei humanen ERC001-EHTs aus. Grund dafür könnte sein, dass humane EHTs im Gegensatz zu Ratten-EHTs weniger Fibrose entwickeln: Während in Ratten-EHTs histologisch und auf Transkriptionsebene vermehrt Kollagen 1 gemessen wurde (Hirt et al. 2012), bewirkte die AE-Intervention keinerlei Veränderung der Kollagen 1-Expression in humanen EHTs. Dies gilt sowohl für die von Tessa Werner untersuchten Zelllinien ERC018 und C25 als auch für die ERC001-Zelllinie. Diese Aussage hätte noch mehr Gewicht, wenn histologisch in ERC001-EHTs Kollagen 1 quantifiziert worden wäre – dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt. Die Arbeitsgruppe Stenzig vermochte allerdings in bisher unveröffentlichten Experimenten histologisch kein Kollagen-1 in hiPSC-CM-basierten EHTs nachzuweisen. Dies steht im Einklang mit der in 3.2.4 beschriebenen fehlenden Nachweisbarkeit von Kollagen-1 auf Proteinebene sowohl in AE- als auch in Kontroll-ERC001-

EHTs. In der Entwicklung der diastolischen Dysfunktion, die im menschlichen Herz pathologischen Nachlast-Erhöhungen wie einer Aortenklappenstenose oder arterieller Hypertonie folgt, spielt Fibrose eine große Rolle: Die bindegewebigen Umbauprozesse bewirken eine Versteifung des Myokards, dessen abnehmende *Compliance* erschwert in der Konsequenz die Füllung der Ventrikel (Nadruz 2015, Kampaktsis et al. 2017). Insofern ist es durchaus vorstellbar, dass humane AE-EHTs keine diastolische Dysfunktion aufwiesen, weil sie keine Fibrose entwickeln können. Ein möglicher Grund für diese fehlende Fähigkeit liegt in der Zusammensetzung der EHTs. Reguläre hiPSC-CM-EHTs enthalten nämlich keine (definierten) Fibroblasten, deren wesentliche Aufgabe die Regulation der extrazellulären Matrix ist. Tessa Werner konnte in EHTs, denen neben anderen Zelltypen 5% epikardiale Fibroblasten zugesetzt worden waren, histologisch ohne weitere Intervention eine 4-fach gesteigerte auf Kollagen-1 anfärbbare EHT-Fläche messen (2018). Dies legt nahe, dass nur in Fibroblasten-haltigen EHTs überhaupt so viel Kollagen-1 produziert werden kann, dass eine Fibrose und konsekutive diastolische Dysfunktion messbar wäre.

4.1.4.3 Aktivierung des fetalen Genprogramms

Die Re-Expression fetaler Gene ist ein wichtiger Marker pathologischer kardialer Hypertrophie – allerdings ist die Aktivierung des fetalen Genprogramms keine Bedingung zur Entstehung kardialer Hypertrophie (Dorn et al. 2003). Ratten-AE-EHTs wiesen deutliche entsprechende Veränderungen der Genexpression auf: Im Vergleich zu Kontroll-EHTs zeigten sich *NPPA* mehr als 30-fach, *NPPB* und *ACTA1* mehr als 5-fach und *MYH7* ungefähr 2-fach erhöht exprimiert – die *ATP2A2*-Expression war deutlich vermindert (Hirt et al. 2012). In humanen ERC001-AE-EHTs wurde die Genexpression im Vergleich schwächer von der Intervention beeinflusst: Lediglich *ACTA1* und *NPPB* reagierten über verschiedene Versuche hinweg statistisch signifikant mit einer Erhöhung der Expression auf das 2,3- bzw. 1,5-fache von Kontrollwerten. Dass für *MYH7* bzw. β -MHC in humanen EHTs nicht signifikant mehr Transkripte messbar waren, ist nicht überraschend: Zwar nimmt im Menschen während der Entstehung einer Herzinsuffizienz der Anteil von β -MHC an der Gesamtheit der schweren Myosin-Ketten zu, allerdings ist im reifen humanen Myokard (anders als im Ratten-Myokard) β -MHC mit einem Anteil von >90% bereits die bei weitem dominanter MHC-Isoform (Palmer 2005). Insofern ist eine Zunahme der β -MHC-Expression im menschlichen Herzen naturgemäß schwieriger messbar – dies stellt ein bekanntes Problem bei der Übertragung von Ergebnissen aus Nager-Versuchen auf den Menschen dar (Barry et al. 2008). Auch die in ERC001-AE-EHTs fehlenden Unterschiede bzgl. des *NPPA*- und *ATP2A2*-Gens bzw. die im Vergleich geringfügigen Veränderungen der Expression von BNP und des *ACTA1* finden sich in der Literatur wieder: In einer Studie, in der künstliche Herzmuskel-Konstrukte mit Nachlasten von 0,5 mN/mm und auch 10 mN/mm kultiviert wurden, waren zwischen diesen Gruppen die Unterschiede der Genexpression für *ACTA1* am größten. Etwas weniger deutlich war *NPPB*

differenziert reguliert – für *NPPA* und *ATP2A2* waren in den genannten Gruppen keinerlei Expressionsunterschiede messbar (Leonard et al. 2018). Auch wenn nicht geklärt ist, warum die Genexpression in ERC001-EHTs deutlich weniger heftig auf die AE-Intervention reagiert als in Ratten-EHTs, decken sich die Ergebnisse diesbezüglich also nahezu komplett mit den Messungen einer anderen, unabhängigen Arbeitsgruppe, die sehr ähnlich konzipierte Versuche durchgeführt hat.

4.1.4.4 Kardiomyozyten-Hypertrophie

Ein zentrales (und namensgebendes) Charakteristikum pathologischer kardialer Hypertrophie ist die Zunahme der Kardiomyozyten-Größen. Während in Ratten-EHTs die Querschnittsfläche der Herzmuskelzellen durch die Intervention im Mittel um 28% zunahm, war in ERC001-AE-EHTs sowohl in der histologischen als auch in der durchflusszytometrischen Messung keine Hypertrophie (oder Hypotrophie) nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für das in ERC001-EHTs (anders als in Ratten-EHTs) ausbleibende pathologische *Remodeling* in Form von Hypertrophie oder Fibrose liegt in der Zusammensetzung der Konstrukte: Während in Ratten-EHTs alle im neonatalen Rattenherzen vorkommenden Zelltypen enthalten sind, bestehen hiPSC-CM basierte ERC001-EHTs lediglich aus Kardiomyozyten und einem – je nach Differenzierungserfolg – unterschiedlich großem Anteil nicht-differenzierter Zellen. Die Entwicklung pathologischer kardialer Hypertrophie ist jedoch ein komplexer Vorgang, der erwiesenermaßen das Zusammenspiel verschiedener Zelltypen beinhaltet. So sondern Fibroblasten mit dem *Transforming Growth Factor-β* ein Peptid ab, das im Rahmen pathologischen *Remodelings* nicht nur fibrotische Umbauprozesse, sondern auch Kardiomyozyten-Hypertrophie befördert (Koitabashi et al. 2011). Von Endothelzellen sezerniertes Endothelin-1 (ET-1) ist ein seit Langem bekannter Mediator kardialer Hypertrophie (Ito et al. 1991) - sowohl im Tiermodell als auch in Ratten-EHTs bewirkte eine Blockade des ET-1-Rezeptors eine deutliche Abschwächung Nachlast-induzierten pathologischen *Remodelings* (Ito et al. 1994, Hirt et al. 2012). Der Unterschied in Zusammensetzung und Struktur, der in hiPSC-CM-basierten EHTs gegenüber dem Säugetiermyokard noch größer ist als in Ratten-EHTs, könnte also die in ERC001-EHTs nur sehr eingeschränkt nachvollziehbare kardiale Plastizität erklären.

Alles in allem ließ sich durch die AE-Intervention also lediglich die Ausprägung einiger Merkmale pathologischer kardialer Hypertrophie provozieren. Für viele Anwendungen wäre es wünschenswert, wenn sich weitere Charakteristika pathologischer Hypertrophie abbilden ließen; Tiermodelle lassen sich an vielen Stellen wohl noch nicht durch humane ERC001-AE-EHTs ersetzen.

4.2 Methodik: Zellgrößenmessungen via Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen von Kardiomyozyten-Größen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergänzend zu histologischen Messungen eingesetzt. Grund dafür war zum einen, dass diese Technik versprach, objektive (absolute) Zellgrößenmessungen mit einer enormen Durchsatzrate zu ermöglichen (Mosqueira et al. 2018); zum anderen ballten sich die hiPSC-Kardiomyozyten in histologischen Präparaten einiger humaner EHTs so sehr in der Randregion des EHTs, dass eine Unterscheidung zwischen einzelnen Zellen und somit auch die Zellgrößenmessung spezifisch in humanen EHTs erschwert wurde - um einer Verfälschung von Messergebnissen hierdurch vorzubeugen, wurden histologische Präparate grundsätzlich verblindet ausgewertet.

4.2.1 Vorwärtsstreuung und Zellgeometrie

Als Vorwärtsstreuung (*Forward Scatter*, FSC) wird durchflusszytometrisch der Teil des Lichts gemessen, der von der durch den Lichtstrahl hindurchfließenden Zelle im Winkel von $0,5^\circ$ bis 5° gebrochen wird. Der FSC-H („*Height*“) gibt dabei die größte gemessene Signal-Intensität für eine Zelle wieder und wird vom Durchmesser der Zelle entlang des Lichtstrahls, allerdings auch von der Spannung des Lasers und dem refraktivem Verhalten der Zelle beeinflusst. Der FSC-W („*Width*“) erfasst, wie lange die Zelle ein FSC-Signal erzeugt hat, wieviel Zeit die Passage der Zelle durch den Strahl also in Anspruch genommen hat. Der FSC-W wird im Wesentlichen beeinflusst vom Durchmesser der Zelle in Fließrichtung. Der FSC-A („*Area*“) integriert FSC-H und -W in einen Wert (Tzur et al. 2011). HiPSC-CMs reifen strukturell im EHT-3D-Kulturformat – während sie anfangs eine eher rundliche Form aufweisen, nehmen sie nach einigen Wochen zunehmend die zylindrische Form adulter humaner Kardiomyozyten an (Querdel et al. 2021). Insofern war nicht davon auszugehen, dass aus dem EHT herausgelöste hiPSC-CMs kugelförmig wären. Von daher erschien es konsequent, mit dem FSC-A einen Parameter zur Zellgrößen-Messung heranzuziehen, der verschiedene geometrische Aspekte der Zelle berücksichtigt. Andere Autoren beschreiben, dass seitliche Lichtstreuung (*Side Scatter*), FSC-W oder Zell-Autofluoreszenz als durchflusszytometrische Parameter besser mit dem tatsächlichen Zell-Volumen korrelieren als der FSC-A-Wert – diese Beobachtungen entstammen jedoch Experimenten an Lymphozyten bzw. Lymphoblasten (Tzur et al. 2011), die generell eher eine sphärische Form haben als Kardiomyozyten.

4.2.2 Vorwärtsstreuung als Maß für Zellgröße

Durch die durchflusszytometrische Vermessung von Polystyren-Kügelchen verschiedener Größe konnte festgestellt werden, dass ein linearer Zusammenhang zwischen Partikel-Größe und gemessenem FSC-A bestand. Dies ist als Grundlage für Zellgrößen-Messungen mittels

Durchflusszytometrie erforderlich und keinesfalls trivial, schließlich lässt sich ein entsprechender Zusammenhang nicht in allen Analyse-Geräten nachweisen (Shapiro 2005). Die FSC-A-Werte von 7,56 µm messenden Polystyren-Kügelchen und ~7,5 µm messenden Erythrozyten unterschieden sich allerdings deutlich, was darauf hinweist, dass der FSC nicht nur von der Partikelgröße abhängig ist. So ist auch der Brechungsindex eines Partikels entscheidend für gemessene FSC-Werte (Givan 2011) – dieser Brechungsindex unterscheidet sich offensichtlich nicht nur zwischen verschiedenen Materialien (wie Polystyren und „Erythrozyt“), sondern auch zwischen verschiedenen Zelltypen (wie Lymphozyten und Granulozyten; Shapiro 2005) und zwischen verschiedenen Zell-Zuständen: eine tote Zelle mit permeabler Membran ähnelt im Brechungsindex tendenziell eher der sie umgebenden Lösung als eine intakte Zelle und erzeugt so bei gleicher Größe eher einen geringeren FSC (Givan 2011). Geht die Zelle allerdings durch Apoptose zugrunde, so kann bei schrumpfendem Zellvolumen die resultierende Dehydratation den Brechungsindex so verändern, dass paradoxerweise höhere FSC-Werte gemessen werden (Yurinskaya et al. 2017). Insofern war es umso bedeutsamer, dass in dieser Arbeit eine Viabilitäts-Färbung durchgeführt wurde. So konnte vermieden werden, dass defekte bzw. apoptotische Kardiomyozyten die mittleren gemessenen FSC-A-Werte verfälschten. Darüber hinaus sollte deutlich geworden sein, dass der Brechungsindex einen solchen (nicht korrigierbaren) Einfluss auf FSC-Werte hat, dass eine Skalierung von Zell-FSC-Werten anhand von Polystyren-Partikeln methodisch höchst fragwürdig ist.

4.2.3 Validierung des durchflusszytometrischen Messansatzes

Validiert wurde die durchflusszytometrische Kardiomyozyten-Größen-Messung durch die Analyse von Zellen aus intakten und vom Silikonfuß abgetrennten EHTs. Durch dieses Abtrennen wurde jegliche Nachlast von den EHTs entfernt. Vergleichbare Interventionen führen im intakten Herzen schnell zur Atrophie von Herzmuskelzellen: Nach nur drei Tagen zeigt sich die Kardiomyozyten-Querschnittsfläche in durchtrennten (also entlasteten) Katzen-Papillarmuskeln gegenüber Kontrollgewebe um 34% reduziert, nach 4 Wochen gar um 70% (Tomanek und Cooper 1981, Cooper und Tomanek 1982). In EHTs wurde nach etwas kürzerer zweitägiger Entlastung eine etwas weniger deutliche Verminderung des mittleren bzw. medianen Kardiomyozyten-FSC-A-Wertes um 25% bzw. 31% gegenüber Kontroll-EHTs gemessen – das Ausmaß der gemessenen Atrophie lässt sich also sehr gut mit Messdaten aus *in vivo* durchgeführten Experimenten vereinbaren. Sollte die Durchflusszytometrie als Methode zur Messung relativer Kardiomyozyten-Größen in Zukunft vermehrt genutzt werden, wäre eine weitergehende Validierung wünschenswert. Durch den Einschluss von mehr als zwei bzw. drei EHTs pro Gruppe könnte die Aussagekraft erhöht werden. Die Validität des Messverfahrens könnte außerdem direkter nachgewiesen werden, wenn atrophiierte Zellen neben der Durchflusszytometrie parallel mit einem weiteren etablierten Verfahren

(histologische Analyse, *Coulter-Counter*) vermessen würden – auch wenn die Kongruenz histologischer und durchflusszytometrischer Messergebnisse in Abschnitt 3.2.3 bereits beschrieben ist. Die Entscheidung, FSC-A als Parameter zur Messung von Kardiomyozyten-Größen heranzuziehen, wurde rein aus theoretischen Überlegungen gefällt. Insofern wäre für die Zukunft zu erwägen, andere Streuungsparameter oder Zell-Autofluoreszenz zur Zellgrößenbestimmung bei Kardiomyozyten zu evaluieren, wie von Tzur et al. propagiert (2011).

4.3 Versuche zur Induktion physiologischer Hypertrophie in EHTs

Um EHTs als Modell physiologischer kardialer Hypertrophie zu evaluieren, wurden dreierlei Nachlast-Stimuli mit dem Ziel der Induktion entsprechender Umbauprozesse in EHTs erprobt. In Experimenten nach allen drei Nachlastprotokollen wurde beobachtet, dass unter höherer Nachlast kultivierte bzw. auf ihre Kontraktilität hin analysierte EHTs höhere Kräfte aufwiesen. Da diese Veränderung der Kontraktilität durch Absenkung der Nachlast binnen kürzester Zeit reversibel war, ist sie eher nicht als Teil des Phänotypen der physiologischen kardialen Hypertrophie zu werten und wird daher an anderer Stelle diskutiert.

4.3.1 Silikonhalterungen verschiedener Steifigkeit

Als ein Ansatz zur Induktion physiologischer Hypertrophie wurden EHTs an Silikonhalterungen unterschiedlicher Steifigkeiten kultiviert. Diese Intervention hatte keinen Einfluss auf Kardiomyozyten-Größe und Gen-Expression der untersuchten Ratten-EHTs. Im Trend wiesen Ratten-EHTs mit zunehmender Nachlast über die Dauer der Kultur einen geringeren Nicht-Kardiomyozyten-Anteil an der gesamten EHT-Querschnittsfläche auf. T. Werner beschreibt, dass in humanen EHTs (die regulär keine definierten Fibroblasten enthalten) das Zusetzen von Fibroblasten einen beschleunigten Abbau der Fibrin-Matrix bewirkt (Werner 2018). Insofern könnte eine Nachlast-abhängige Modifikation der Fibroblasten-Aktivität die tendenzielle Abnahme des Nicht-Kardiomyozyten-Anteils der EHT-Querschnittsfläche erklären. Bekannt ist, dass kardiale Fibroblasten durch verschiedene Mechanosensoren wie Integrine oder dehnungsempfindliche Ionenkanäle auf erhöhte Druckbelastung des Herzens reagieren können; allerdings synthetisieren Fibroblasten in Folge einer erhöhten Druckbelastung eher vermehrt Proteine der extrazellulären Matrix, als dass sie diese abbauen (Frangogiannis 2019). Da die extrazelluläre Matrix von EHTs (anders als im echten Myokard) zum überwiegenden Teil aus Fibrin besteht, ist es aber durchaus plausibel, dass Fibroblasten hier anders agieren. Immerhin sind Fibroblasten als Teil des Granulationsgewebes, das in Folge von Myokard-Infarkt-Neben entsteht, durchaus in der Lage, Fibringeflechte zu infiltrieren und abzubauen (Dobaczewski et al. 2010)

4.3.2 Intervall-Nachlast-Programm

Zur Stimulation physiologischer Hypertrophie in EHTs wurde außerdem ein Intervall-Nachlast-Programm konzipiert: EHTs wurden über eine Woche hinweg in 3 Minuten andauernden Zyklen hohen und niedrigen Nachlasten ausgesetzt. Der Ansatz, einen dynamischen Nachlast-Stimulus zu verwenden, stützte sich dabei auf Beobachtungen aus dem menschlichen Organismus: Auch wenn (wie in Abschnitt 1.2 angerissen) umstritten ist, inwiefern Nachlast-Stimuli (konzentrische) physiologische kardiale Hypertrophie im Herzen auslösen können, so ist dieser kardiale Phänotyp am ehesten beschrieben bei Gewichthebern und Ringern (Pluim

et al. 2000, Utomi et al. 2013). Im Gegensatz zu Ausdauersportlern wirkt bei diesen Athleten der hämodynamische Stimulus nicht kontinuierlich über einen längeren Zeitraum, sondern eher in kurzen, intensiven Intervallen. Tiermodelle physiologischer kardialer Hypertrophie basieren vor allem auf Interventionen, die eher als Volumenbelastung zu werten sind. Allerdings führte ein Trainingsprogramm, in dem Ratten über 4 Wochen fünfmal wöchentlich 4 Sätze à 10-12 Wiederholungen belasteter Kniebeugen durchführten, zur Entwicklung einer als physiologisch zu wertenden (konzentrischen) kardialen Hypertrophie (Barauna et al. 2005, Barauna et al. 2007). Auch hier führte also keine dauerhafte, sondern eine intermittierende Druckbelastung zur Entwicklung kardialer Hypertrophie. Insofern erschien es möglich, dass auch in Ratten-EHTs ein fluktuierender Nachlast-Stimulus physiologische Hypertrophie induzieren könnte.

Eine einwöchige entsprechende Intervention vermochte allerdings nur in statistisch nicht signifikanten Trends eine Zunahme von normalisierter Kontraktionskraft und Kardiomyozyten-Querschnittsfläche in Intervall-Nachlast-Ratten-EHTs zu bewirken. Hier ist zu erwägen, ob die Interventionsdauer mit lediglich einer Woche zu kurz bemessen war, um die Entwicklung einer physiologischen kardialen Hypertrophie zu provozieren. Selbst die kürzesten Ausdauer- oder Krafttrainingsprogramme, die in Rattenmodellen physiologischer Hypertrophie zum Einsatz kommen, beanspruchen einen Zeitraum von 4 Wochen – gängiger sind aber Interventionszeiträume zwischen 6 und 12 Wochen (Barauna et al. 2005, Wang et al. 2010). Im Menschen führte regelmäßiges Intervall-Ausdauertraining über einen Zeitraum von 3 und 5 Monaten, nicht aber im Zeitraum von 6 Wochen zur Zunahme der Masse des linken Ventrikels, hier scheint sich physiologische Hypertrophie tendenziell also noch langsamer zu entwickeln (Windecker et al. 2002, Nakahara et al. 2015, Mahjoub et al. 2019). Aufgrund geringer Teilnehmerzahlen, variierender Trainingsprotokolle und nicht-verblindeter echokardiographischer Untersuchungen in den Studien ist diese Aussage allerdings eher als vage einzuordnen. In der Konsequenz wäre es trotzdem zu erwägen, den Intervall-Nachlast-Versuch an Ratten-EHTs über einen längeren Zeitraum zu wiederholen.

4.3.3 Inkrementelle Nachlasterhöhung

Als dritte Intervention zur mechanischen Induktion physiologischer kardialer Hypertrophie wurde ein Protokoll erprobt, in dem die EHT-Nachlast binnen einer Kulturwoche schrittweise von 0,9 mN/mm auf 6,8 mN/mm erhöht wurde. Während in Ratten-EHTs in diesem Zeitraum keine Veränderungen von Kardiomyozyten-Größe und Genexpression beobachtet wurden (Rodriguez, Werner, **Becker** et al. 2019), nahm der FSC-A von Kardiomyozyten aus ERC001-EHTs in Folge der Intervention zu, gleichzeitig wurden *NPPB* und *ACTA1* vermehrt exprimiert.

BNP als Genprodukt von *NPPB* ist zwar Teil des fetalen Genprogrammes, fungiert einzeln betrachtet aber auch als kardiales „Stresshormon“: So ist bekannt, dass LäuferInnen mit

zunehmender Laufdauer höhere BNP- bzw. NT-proBNP-Plasma-Spiegel aufweisen, die mit transienten Kontraktilitäts-Störungen korrelieren (Vilela et al. 2015, Donnellan und Phelan 2018). Insofern ließe sich argumentieren, dass die gemessene *NPPB*-Erhöhung nicht zwangsweise Ausdruck pathologischer kardialer Umbauprozesse sein muss.

Eine erhöhte *ACTA1*-Expression in Herzmuskelzellen ist allerdings ein ziemlich deutliches Zeichen pathologischen *Remodelings*: Im Myokard von Patienten, die eine konzentrische oder exzentrische pathologische kardiale Hypertrophie aufweisen, lässt sich vermehrt die skeletale Aktin-Isoform nachweisen (Suurmeijer et al. 2003). Analog wurde durch eine TAC-Operation in Ratten-Myokard die Expression von *ACTA1* stimuliert, durch Ausdauertraining aber nicht (Kemi et al. 2008). Tatsächlich vermochte Ausdauertraining (als klassischer Stimulus physiologischer Hypertrophie) die Steigerung der *ACTA1*-Expression durch arterielle Hypertension (als klassischer Stimulus pathologischer Hypertrophie) in Ratten abzumildern (Carneiro-Júnior et al. 2013). *ACTA1* verhält sich in physiologischer und pathologischer Hypertrophie also nahezu gegensätzlich, die gesteigerte *ACTA1*-Transkription in ERC001-INE-EHTs deutet also auf eine pathologische Natur der angestoßenen biologischen Prozesse hin.

Um die beobachtete Form der kardialen Plastizität noch besser einordnen zu können, wurde zusätzlich zu den Vertretern des fetalen Genprogrammes die Transkription von Genen quantifiziert, die in der Literatur in Nagermodellen physiologischer Hypertrophie kardial differenziert exprimiert wurden (Boström et al. 2010, Waring et al. 2014, Gibb et al. 2017). Dass sich die Transkription von keinem dieser untersuchten Gene (*CITED4*, *CEBPB*, *NFATC2*, *IGF1*, *NRG1*, *BMP10*) in ERC001-INE-EHTs signifikant von Kontroll-EHTs unterschied, stützt die Hypothese, dass die INE-Intervention hier pathologisches *Remodeling* ausgelöst hatte – besonders, weil bis auf *IGF1* alle Gene in sehr schwachen Trends entgegengesetzt dem bei physiologischer Hypertrophie beschriebenem Muster reguliert waren.

Auch wenn die Kontraktilität der ERC001-INE-EHTs nicht bewertbar ist, weil alle Messungen während der Intervention unter modifizierter Nachlast vorgenommen wurden, zeichnet sich ab, dass die INE-Intervention in diesen EHTs wohl eine Form pathologischer kardialer Hypertrophie induziert hat. Darauf deutet auch die Kongruenz der Genexpressions-Muster von ERC001-AE-EHTs (welche einem eindeutig pathologischen Nachlast-Stimulus ausgesetzt wurden) und ERC-001-INE-EHTs hin. Unklar bleibt, weshalb eine Nachlast-Erhöhung auf maximal 6,8 mN/mm eher eine Hypertrophie in ERC001-EHTs induzierte als die AE-Intervention, die eine kräftigere und schnellere Steigerung der Last auf über 10 mN/mm beinhaltet. Mögliche Erklärungen wären im Abschnitt 4.1.2 geschilderte differenzierungsabhängige Unterschiede zwischen EHT-Generationen. Außerdem wurden die

ERC001-INE-EHTs bei kontraktile Messungen in der Piezo-Stage mittels einer selbstgebauten LED-Platte beleuchtet, die in einem anderen Experiment durch Erhitzung des EHT-Mediums zu einem kompletten kontraktile Funktionsverlust der EHTs geführt hatte (Daten nicht gezeigt). Ein nachträglich eingebauter Dimmer sollte diesem Effekt vorbeugen – trotzdem lässt sich nicht ausschließen, dass die INE -EHTs durch geringe, hitzebedingte Funktionseinbußen eventuell sensibler auf Nachlast reagierten als regulär beleuchtete EHTs. Ein Mechanismus, der spekulativerweise unabhängig von allgemeinen Zellschäden zu diesem Hitze-Effekt beitragen könnte, wäre die temperaturbedingte Aktivitätssteigerung verschiedener Hitzeschockproteine, die erwiesenermaßen die Entwicklung pathologischer kardialer Hypertrophie befördern (Tamura et al. 2019, Yoon et al. 2019).

4.3.4 Insulin/IGF-1-Signalling als Limitation des EHT als Modell Nachlast-induzierter physiologischer Hypertrophie

Keiner der im Rahmen dieser Arbeit erprobten Nachlast-Stimuli vermochte die Entwicklung einer physiologischen Form kardialer Hypertrophie in Ratten- oder hiPSC-CM-basierten EHTs zu induzieren. Die Begründung dafür könnte in der systemischen Komponente physiologischer kardialer Umbauprozesse liegen. Der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF-1) ist einer der zentralen Botenstoffe in der Entwicklung physiologischer kardialer Hypertrophie, welcher seine Effekte im Wesentlichen über die IGF-1-Rezeptor-vermittelte Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges bewirkt (Shimizu und Minamino 2016, Nakamura und Sadoshima 2018). IGF-1 wird (zumindest von Ausdauersportlern) zwar auch im Herzen synthetisiert (Serneri et al. 2001), primär erfolgt die Freisetzung allerdings aus der Leber und wird dort durch das Wachstumshormon (GH) stimuliert (Rassow 2016). Die Freisetzung von GH aus dem Hypophysenvorderlappen wird wiederum durch Krafttraining gesteigert (Kraemer et al. 2017). Krafttraining als prototypischer Stimulus Nachlast-induzierter physiologischer kardialer Hypertrophie entfaltet seine Wirkung also höchstwahrscheinlich nicht nur auf mechanische bzw. hämodynamische Weise, sondern auch durch Aktivierung der Wachstumshormon-Achse. Da diese Komponente kardialer Plastizität in EHTs offensichtlich nicht vorhanden ist, könnte ihr Fehlen das ausbleibende Ansprechen von EHTs auf Stimuli aus dem spekulativ „physiologischen“ Nachlast-Spektrum erklären.

Andererseits wäre es auch möglich, dass in regulär kultivierten EHTs die durch IGF-1 regulierten Signalwege durch im Medium vorhandenes Insulin überstimuliert sind. Insulin ist ein Peptidhormon, das neben metabolischen Prozessen auch Zellwachstum reguliert (Deutzmann 2016). Die Insulinkonzentration im menschlichen Plasma ist starken Schwankungen unterworfen, bewegt sich aber i.d.R. zwischen 0,2 ng/ml und 1,2 ng/ml. Im EHT-Medium liegt Insulin mit 10 µg/ml also in einer Konzentration vor, die das physiologische Maß um ein Viel(tausend)faches überschreitet. Aufgrund der hohen strukturellen Analogie

zwischen Insulin und IGF-1 ist Insulin in der Lage, den IGF1-Rezeptor (IGF1R) zu aktivieren – die EC_{50} liegt dabei je nach Publikation zwischen 1,9 $\mu\text{g/ml}$ und über 5,1 $\mu\text{g/ml}$ (Slieker et al. 1997, Sciacca et al. 2010, Sommerfeld et al. 2010). Dementsprechend wäre also eine Aktivierung des IGF1R von EHT-Kardiomyozyten durch im Medium enthaltenes Insulin vorstellbar – allerdings ist unklar, inwieweit die Insulinkonzentration im Inneren des EHTs der Insulinkonzentration im Nährmedium entspricht. Trotzdem bleibt zu erwägen, ob eine dauerhafte Aktivierung zentraler Signalwege physiologischer kardialer Hypertrophie durch Insulin verhindert, dass durch mechanische Interventionen „zusätzliche“ Hypertrophie ausgelöst wird.

Generell bleibt also offen, ob und unter welchen Medienbedingungen die Entwicklung physiologischer kardialer Hypertrophie durch mechanische Stimuli in EHTs provoziert werden kann. Einige vorläufige Versuche bezüglich des Einflusses verschiedener Medium-Zusammensetzungen auf Kardiomyozyten-Zellgröße wurden bereits unternommen – die Ergebnisse dieser Versuche finden sich im Anhang dieser Arbeit.

4.4 Kraft-Nachlast-Beziehung

Verschiedene Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass eine Steigerung der EHT-Nachlast eine Steigerung der gemessenen Kontraktionskraft bewirkte, während die Silikonfuß-Auslenkung sank. Diese Veränderungen der Kontraktilität traten häufig ohne begleitende biologische Veränderungen auf (Abschnitt 3.5.1) und waren, sofern überprüfbar, bei Senkung der Nachlast reversibel (Abschnitt 3.6). Es ist also von einem direkten Zusammenhang zwischen applizierter Nachlast und gemessener Kontraktionskraft auszugehen. Die Erhöhung der Kontraktionskraft mit zunehmender Nachlast stand in keinem eindeutigen Zusammenhang zu ungewollten EHT-Längenveränderungen und trat in vollem Umfang sofort nach der Nachlast-Erhöhung auf – Frank-Starling-Mechanismus und Anrep-Effekt schieden als Erklärung des Phänomens insofern mit großer Wahrscheinlichkeit aus.

4.4.1 Vergleichbarkeit der Kontraktilitäts-Analyse am EHT

Die Auslenkung der Silikonfüße entlang der Kontraktionsachse der EHTs weist einen linearen Zusammenhang zur auf sie einwirkenden Kraft auf (Sörensen 2013; Rodriguez, Werner, **Becker** et al. 2019). Im Bereich der typischerweise durch EHTs verursachten Auslenkungen verhalten sich die Silikonfüße dementsprechend wie einfache, linear ansprechende Federn. Es gilt also: $F = d \times k$, wobei F die Kontraktionskraft, d die Video-optisch gemessene Auslenkung und k die Silikonfuß-Steifigkeit als Federkonstante repräsentiert. Leider lässt sich diese Form der Kontraktilitäts-Analyse nicht ohne Weiteres mit klassischen Mess-Ansätzen der Herzmuskelphysiologie vergleichen, um so die beobachtete Kraft-Nachlast-Beziehung einzuordnen: Isolierte Herzmuskel-Präparate (z.B. Papillarmuskeln) werden üblicherweise zwischen einem (starrten) Kraftaufnehmer und einem Motor eingespannt, welcher die Länge des Muskels kontrolliert („Längenregulator“). Messungen von Kontraktionen mit Nachlast finden dabei wie folgt statt: Der Muskel durchläuft eine Anspannungsphase bei unveränderter Länge (isometrisch), bis der Kraftaufnehmer eine definierte Kraft („Nachlast“) registriert – dann erst ermöglicht der Längenregulator, dass der Muskel isotonisch (bei gleichbleibender Kraft bzw. Spannung) kontrahiert. Der mechanische Widerstand wird also dynamisch so abgesenkt, dass sich die Muskelspannung (=auf den Muskelquerschnitt normalisierte Kraft) während der Verkürzung nicht ändert. Nach einer isometrischen Entspannungsphase dehnt der Längenregulator den Muskel anschließend wieder auf die gewünschte Ausgangslänge bzw. Vorlast (Han et al. 2019). Dieser Ablauf deckt sich prinzipiell mit der mechanischen Herzaktion im intakten Organ: Auch hier folgt während der Systole auf eine isometrische Anspannungsphase eine Auswurfphase mit (allerdings auxotoner) Muskelverkürzung, es folgen isometrische Entspannung und Dehnung während der Ventrikel-Füllung in der Diastole (Hoth und Wischmeyer 2021). Im EHT hingegen laufen die komplette (messbare) Kontraktion und Relaxation auxoton ab, eine Aufgliederung in einen isometrischen und einen isotonischen

Anteil entfällt. Insofern ist es doppelt schwer, Kontraktilitätsdaten aus EHT-Messungen mit Daten aus isolierten Muskeln oder intakten Herzen zu vergleichen: Zum einen wird in den beschriebenen klassischen Ansätzen nicht (explizit) gemessen, wie sich das auxotone Kontraktionsverhalten von Myokard verändert, wenn durch die Kontraktion verschiedene Lasten geringer Trägheit bewegt werden müssen, wie es im EHT der Fall ist. Zum anderen decken sich die „Nachlast“-Begriffe nur bedingt: Während „Nachlast“ klassischerweise eine „Kraft-Schwelle“ bezeichnet, die durch isometrische Anspannung überwunden werden muss, um eine verkürzende Kontraktion zu ermöglichen, so bezeichnet die „Nachlast“ im EHT-Modell die Steifigkeit der Silikonfüße, die (nach Überwindung der vernachlässigbaren Trägheit der Silikonhalterung) die auxotone Kontraktion der EHTs erschwert.

4.4.2 Nachlast und Kontraktilität in anderen Messsystemen

Obwohl sich die Begrifflichkeiten und Messmodalitäten in der klassischen Herzmuskelphysiologie und in EHT-Kontraktilitätsmessungen nicht vollständig decken, sollen trotzdem einige ähnliche, wenn auch nicht gänzlich vergleichbare Beobachtungen aufgeführt werden. So führt bei gleichbleibender Ausgangslänge die Erhöhung der „Nachlast“ in isolierten Papillarmuskeln zu einer geringeren Verkürzung des Muskels während der isotonen Anspannungsphase (Han et al. 2019) – ähnlich also der abnehmenden Silikonfuß-Auslenkung bei zunehmender Nachlast in EHTs. Vergleichbare Versuche in intakten Herzen durchzuführen ist methodisch aufwändig: Während sich Vorlast und Nachlast im isolierten Muskel gut getrennt modifizieren lassen, bewirkt im intakten Herzen eine erhöhte Nachlast durch ein reduziertes Schlagvolumen und ein erhöhtes endsystolisches Volumen eine erhöhte Vorlast des nächsten Schlages – Vor- und Nachlast sind hier also verknüpft (Klabunde 2011). Diese Problematik umging die Arbeitsgruppe um E. Braunwald und E.H. Sonnenblick, indem sie über einen Drei-Wege-Hahn ein druckkontrolliertes Flüssigkeitsreservoir an die Aorta anschlossen. Durch das Umlegen des Hahns während der Diastole konnte bei gleichbleibenden diastolischen Bedingungen die Auswirkungen verschiedener Nachlast-Zustände auf die systolische Herzaktion untersucht werden. Auch hier zeigte sich, dass mit zunehmender Nachlast die im Myokard gemessene Spannung (also auch Kontraktionskraft) zunahm, während sich das Schlagvolumen (und damit die Verkürzung des Muskels) verringerte (Ross et al. 1966). Alles in allem decken sich die im EHT bei zunehmender Nachlast beobachteten kontraktilen Veränderungen also mit Beobachtungen aus anderen, wenn auch schwer direkt vergleichbaren Messansätzen.

4.4.3 Kopplung von Nachlast und Kontraktionskraft

Die Fähigkeit, bei höherer Nachlast größere Kraft während der Kontraktion aufbauen zu können, ist für das schlagende Herz *in vivo* essenziell: Schließlich trägt dieser Mechanismus (zusätzlich zum Frank-Starling-Mechanismus) dazu bei, dass bei steigender Nachlast die

Pumpfunktion aufrechterhalten werden kann, weil nur durch zusätzliche Anspannung des Myokards überhaupt Blut gegen die Nachlast ausgeworfen wird. Eine mögliche Erklärung für die Kopplung von Kontraktionskraft an externe Last liefert die strukturelle Veränderung des Myosin-Filaments. Mit zunehmender isometrisch entwickelter Kraft verlassen nämlich im Laufe der Kontraktion immer mehr Myosin-Köpfchen als „Motor“ der Muskelkontraktion ihre „abgeschaltete“, flach an das Filament angelegte Konfiguration und sind so in der Lage, zur Kraftentwicklung beizutragen. Auch wenn dieser Mechanismus bisher lediglich im Skelettmuskel beschrieben ist (Linari et al. 2015), könnte er erklären, wie das Myokard im Herzen in der Lage ist, seine Kontraktionskraft der aktuellen Nachlast Schlag für Schlag anzupassen.

4.4.4 Optimierte Kontraktilitäts-Analyse in EHTs

Unabhängig davon, wie der Zusammenhang zwischen Nachlast und gemessener Kontraktionskraft in EHTs zu deuten oder zu erklären ist, steht fest: Wenn die Kontraktilität von EHTs verschiedener Versuchsgruppen methodisch sauber verglichen werden soll, müssen die entsprechenden Messungen bei gleichen Nachlastbedingungen stattfinden. Um dies bei Nutzung der Piezo-Stage zu ermöglichen, müssten die nicht-magnetischen beweglichen Silikonfüße der verwendeten Halterungen so versteift werden, dass sie die gleiche Nachlast ausüben wie die magnetischen Silikonfüße. Ein erster Versuch, in dem 2 mm lange Abschnitte eines Polystyren-Stäbchens in den (bisher nicht versteiften) Silikonfuß eingeführt wurden, war vielversprechend – die Ergebnisse finden sich im Anhang an diese Arbeit. Eine andere Möglichkeit wäre, die Kontraktilität von EHTs isometrisch zu messen. Solche Messungen wären Video-optisch nicht durchzuführen, da keine Auslenkung der Silikonfüße messbar ist – hier müsste also mit Kraftaufnehmern gearbeitet werden. Leonard et al. haben solch ein System bereits verwendet, um die Kontraktilität von EHTs zu vergleichen, die bei unterschiedlichen statischen Nachlasten kultiviert wurden (2018).

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche demonstrieren, dass sich kardiale Plastizität in ihrem breiten Spektrum nicht ohne weiteres in den etablierten EHT-Formaten modellieren lässt. ERC001-EHTs reagierten immerhin deutlicher auf pathologische Nachlast-Stimuli als bisher untersuchte hiPSC-CM-basierte EHTs, zum ersten Mal überhaupt ließ sich in humanen EHTs zelluläre Hypertrophie nachweisen. Dies könnte die Grundlage bilden für weitere Experimente, die durch Co-Kultur mit anderen Zelltypen oder eine längere Interventionsdauer die Bedingungen im humanen EHT den in pathologisch belasteten menschlichen Myokard herrschenden Bedingungen angleichen würden; möglicherweise ließe sich so ein hiPSC-CM-basiertes Modell Nachlast-induzierter pathologischer kardialer Hypertrophie etablieren.

Ob durch Nachlast stimulierte Ratten- oder hiPSC-CM-basierte EHTs als Modell physiologischer kardialer Hypertrophie fungieren könnten, ist unklar – keine der drei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interventionen vermochte die Entwicklung eines entsprechenden kardialen Phänotypen zu provozieren. Die Kontraktilitätsmessungen sollten in Zukunft unter standardisierten Nachlast-Bedingungen stattfinden, um verbesserte Kontraktilität als Teil physiologischer Hypertrophie sicherer erkennen zu können. Insbesondere beim Intervall-Nachlast-Versuch erscheint eine verlängerte Interventionsdauer als vielversprechender Ansatz, physiologische kardiale Hypertrophie in EHTs zu provozieren.

Die Belastung, die Herzinsuffizienz als Folge pathologischer Hypertrophie noch immer für PatientInnen darstellt, verdeutlicht den Bedarf nach neuen Modellen kardialer Plastizität zum besseren Verständnis derselben. Die Entwicklung solcher Modelle für komplexe biologische Prozesse ist (wie diese Arbeit zeigt) keinesfalls einfach – allerdings zeigt sich nun deutlicher, wo die Stärken von EHTs als Modell kardialer Plastizität liegen und wo Verbesserungen nötig sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Herzinsuffizienz ist eine der drei häufigsten kardiovaskulären Todesursachen in Deutschland. Häufig liegen der Herzinsuffizienz krankhafte Umbauprozesse in Form einer pathologischen kardialen Hypertrophie zugrunde. Das entgegengesetzte, oft als Gegenspieler fungierende Extrem kardialer Plastizität stellt die physiologische Hypertrophie dar. Um kardiale Plastizität in Zukunft therapeutisch besser beeinflussen zu können, sind Modelle vonnöten, die ein besseres Verständnis beider Extreme ermöglichen.

Nachlast ist ein hämodynamischer Stimulus, der im intakten Herzen sowohl physiologische als auch pathologische Hypertrophie induzieren kann. Dieser Stimulus lässt sich auf künstliches Herzmuskelgewebe (EHT) übertragen, indem die Steifigkeit des Materials modifiziert wird, welches das EHT beim Kontrahieren verformen muss.

Die starke Erhöhung der Nachlast von hiPSC-CM-basierten EHTs auf über 10 mN/mm bewirkte die vermehrte Expression einiger fetaler (und mit pathologischer kardialer Hypertrophie assoziierter) Gene und eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft. Eine Zunahme der Kardiomyozyten-Größen war jedoch weder in histologischen Messungen noch in einer eigens etablierten und validierten durchflusszytometrischen Messmethode nachweisbar. Es ließen sich also einige Aspekte, keinesfalls aber ein Vollbild pathologischer kardialer Hypertrophie modellieren.

Um die Entstehung physiologischer Hypertrophie zu provozieren, wurden drei verschiedene Nachlast-Stimuli erprobt: Auf neonatalen Ratten-Kardiomyozyten basierende EHTs wurden bei konstanter Nachlast zwischen 0,6 mN/mm und 2,1 mN/mm kultiviert. Eine Zunahme der Zellgröße war hier nicht nachweisbar, lediglich der Anteil extrazellulärer Matrix am EHT nahm tendenziell etwas ab. Ein Intervall-Nachlast-Programm, in dem die Nachlast in Zyklen zwischen 0,9 mN/mm und 6,8 mN/mm fluktuierte, bewirkte in Ratten-EHTs im Trend eine Zunahme der Kardiomyozyten-Größe und der relativen Kontraktionskraft. Eine inkrementelle Erhöhung der Nachlast von 0,9 mN/mm auf 6,8 mN/mm bewirkte in hiPSC-CM-basierten, nicht aber in Ratten-EHTs, eine Zunahme der Kardiomyozyten-Größe und der Expression fetaler Gene – hier war also eher eine pathologische Form kardialer Hypertrophie induziert worden.

Es gelang dementsprechend für keine der beiden Formen kardialer Plastizität, ein vollwertiges, Nachlast-basiertes EHT-Modell zu etablieren. Die Ergebnisse der Versuche an hiPSC-CM-basierten EHTs lassen allerdings hoffen, dass diese in Zukunft durch weitere Modifikationen als Modell-„Organismus“ pathologischer kardialer Hypertrophie nutzbar werden.

SUMMARY

Heart failure is one of the major cardiovascular causes of death in the Western world. In many cases, heart failure is at least partly caused by a type of adverse remodeling of the myocardium known as pathologic cardiac hypertrophy. At the other extreme of cardiac plasticity is physiologic cardiac hypertrophy, often dubbed the “Athlete’s Heart”, which is considered benign or even beneficial. To steer cardiac plasticity in a therapeutic manner, new models of either type of cardiac hypertrophy are needed to gain a better understanding of the underlying biological mechanisms.

Afterload is a hemodynamic stimulus which may induce physiologic hypertrophy as well as pathologic hypertrophy in the human heart in a dose-dependent manner. Changes in afterload can be applied to Engineered Heart Tissue (EHT) by changing the stiffness of the silicone post that constitutes the resistance to the EHTs’ spontaneous beating.

In hiPSC-CM-based EHTs, a strong afterload increase exceeding 10 mN/mm caused a pronounced loss of contractile force and an increased transcription of some genes associated with pathologic cardiac hypertrophy (“fetal genes”). However, this intervention did not induce any change in cardiomyocyte size as measured by microscopy and flow cytometry. Therefore, hiPSC-CM-based EHTs were not displaying all key features of pathologic cardiac hypertrophy investigated and are currently a rather incomplete model of said type of cardiac plasticity.

Three different afterload regimens were employed to potentially induce physiologic hypertrophy in EHTs. Rat-CM-based EHTs cultivated at static afterloads ranging from 0.6 mN/mm to 2.11 mN/mm did not display any afterload-related changes in cardiomyocyte-size. The share of EHT-cross-sectional area occupied by extracellular matrix showed a non-significant decreasing trend with increasing afterload. Rat EHTs were also subjected to an interval afterload regimen, which imposed loads cycling between 0.6 mN/mm and 6.85 mN/mm on the EHTs. Compared to controls, these EHTs showed a non-significant trend towards higher cardiomyocyte cross-sectional area and higher normalized contractile force. A stepwise increase in afterload from 0.6 mN/mm to 6.85 mN/mm induced cardiomyocyte hypertrophy and re-expression of fetal genes in hiPSC-CM-based EHTs. Accordingly, the type of remodeling observed demonstrates a tendency to be pathological.

An EHT-based model of cardiac plasticity could not be (fully) established neither for physiological nor for pathological cardiac hypertrophy. However, further modifications to the techniques and protocols used may render EHTs as a more powerful platform for modeling cardiac plasticity in the future.

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AE	<i>Afterload Enhancement</i> ; Nachlasterhöhung durch Einbringen von Edelstahl-Drahtklammern
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CT	<i>Cycle of Threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i> ; künstliches Herzmuskelgewebe
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FSC-A	<i>Forward Scatter – Area under the Curve</i> ; Vorwärtsstreuung
FSC-H	<i>Forward Scatter – Height</i> ; Vorwärtsstreuung, höchste Signal-Intensität
FSC-W	<i>Forward Scatter – Width</i> ; Vorwärtsstreuung, Signal-„Breite“
HBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
hEHT	„humanes“ EHT; EHT auf Basis von hiPSC-CM
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion

HFrEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
hiPSC	Humane induzierte pluripotente Stammzellen
hiPSC-CM	Aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten
INE	Inkrementelle Nachlast-Erhöhung
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phytoerythrin
rEHT	„Ratten“-EHT; EHT auf Basis von neonatalen Rattenherzzellen
RNA	Ribonucleinsäure
T3	Triiodthyronin
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alves, J. P., et al. (2014). Resistance training improves hemodynamic function, collagen deposition and inflammatory profiles: experimental model of heart failure. PloS one **9**(10)
- Barauna, V. G., et al. (2005). CARDIOVASCULAR ADAPTATIONS IN RATS SUBMITTED TO A RESISTANCE-TRAINING MODEL. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology **32**(4)
- Barauna, V. G., et al. (2007). Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. Clin Med Res **5**(2)
- Barry, S. P., et al. (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **40**(10)
- Becker, B., et al. (2020). Magnetic Adjustment of Afterload in Engineered Heart Tissues. J Vis Exp(159)
- Boeddinghaus, J. (2014). Funktionelle Optimierung und Ausreifung von künstlichem Herzmuskelgewebe durch kontinuierliche elektrische Stimulation. Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie Hamburg. Hamburg, Universität Hamburg. **Doktor der Medizin**.
- Boluyt, M. O., et al. (1995). The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. Eur Heart J **16**
- Boström, P., et al. (2010). C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. Cell **143**(7)
- Brandt, R., et al. (2018). Aortenstenose. In: Duale Reihe Innere Medizin. K. Arastéh, H.-W. Baenkler, C. Bieber et al., Georg Thieme Verlag.
- Breckwoldt, K., et al. (2017). Differentiation of cardiomyocytes and generation of human engineered heart tissue. Nat Protoc **12**(6)
- Brodie, B. R., et al. (1976). Combined hemodynamic-ultrasonic method for studying left ventricular wall stress: Comparison with angiography. The American Journal of Cardiology **37**(6)
- Carneiro-Júnior, M. A., et al. (2013). The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining. Journal of Molecular and Cellular Cardiology **57**
- Cattadori, G., et al. (2018). Exercise and heart failure: an update. ESC heart failure **5**(2)
- Chang, K. C., et al. (1997). Thyroid hormone improves function and Ca²⁺ handling in pressure overload hypertrophy. Association with increased sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and alpha-myosin heavy chain in rat hearts. J Clin Invest **100**(7)
- Cingolani, H. E., et al. (2013). The Anrep effect: 100 years later. Am J Physiol Heart Circ Physiol **304**(2)

- Cooper, G. and R. J. Tomanek (1982). Load regulation of the structure, composition, and function of mammalian myocardium. Circulation Research **50**(6)
- Deutsche Herzstiftung e.V (2020). 32. Deutscher Herzbericht 2020. Frankfurt. **32**.
- Deutzmann, R. (2016). Insulin. In: Duale Reihe Biochemie. J. Rassow, K. Hauser, R. Deutzmann and R. Netzker, Georg Thieme Verlag.
- Dobaczewski, M., et al. (2010). The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol **48**(3)
- Donnellan, E. and D. Phelan (2018). Biomarkers of Cardiac Stress and Injury in Athletes: What Do They Mean? Current Heart Failure Reports **15**(2)
- Dorn, G. W., 2nd, et al. (2003). Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. Circ Res **92**(11)
- Eisner, D. A. (2021). Pseudoreplication in physiology: More means less. J Gen Physiol **153**(2)
- Eschenhagen, T., et al. (1997). Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. Faseb j **11**(8)
- Frangogiannis, N. G. (2019). The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. Circ Res **125**(1)
- Franzén-Dahlin, Å., et al. (2010). Quality of life in chronic disease: a comparison between patients with heart failure and patients with aphasia after stroke. Journal of clinical nursing **19**(13-14)
- Gibb, A. A., et al. (2017). Exercise-Induced Changes in Glucose Metabolism Promote Physiological Cardiac Growth. Circulation **136**(22)
- Givan, A. L. (2011). Flow cytometry: an introduction. Methods Mol Biol **699**
- Han, J. C., et al. (2019). Solving a century-old conundrum underlying cardiac force-length relations. Am J Physiol Heart Circ Physiol **316**(4)
- Hansen, A., et al. (2010). Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. Circ Res **107**(1)
- Henschen, S. (1899). Skilanglauf und Skiwettlauf. Eine medizinische Sportstudie. Mitt Med. Klin. Uppsala (Jena) **2**
- Hill, D. W. and S. D. Butler (1991). Haemodynamic responses to weightlifting exercise. Sports Med **12**(1)
- Hirt, M. N., et al. (2012). Increased afterload induces pathological cardiac hypertrophy: a new in vitro model. Basic Res Cardiol **107**(6)
- Hoth, M. and E. Wischmeyer (2016). Frank-Starling-Mechanismus. In: Duale Reihe Physiologie. J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann et al., Georg Thieme Verlag.
- Hoth, M. and E. Wischmeyer (2021). Druck-Volumen-Veränderungen während des Herzzyklus. In: Duale Reihe Physiologie. J. Behrends, J. Bischofberger, R. Deutzmann et al., Georg Thieme Verlag KG.
- Iemitsu, M., et al. (2001). Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(6)

- Ito, H., et al. (1991). Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. Circulation Research **69**(1)
- Ito, H., et al. (1994). Endothelin ETA receptor antagonist blocks cardiac hypertrophy provoked by hemodynamic overload. Circulation **89**(5)
- Jopling, C., et al. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. Nature **464**(7288)
- Kampaktsis, P. N., et al. (2017). The role and clinical implications of diastolic dysfunction in aortic stenosis. Heart **103**(19)
- Kemi, O. J., et al. (2008). Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. J Cell Physiol **214**(2)
- Klabunde, R. (2011). Cardiovascular physiology concepts, Lippincott Williams & Wilkins.
- Koitabashi, N., et al. (2011). Pivotal role of cardiomyocyte TGF- β signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload. J Clin Invest **121**(6)
- Kraemer, W. J., et al. (2017). Recovery responses of testosterone, growth hormone, and IGF-1 after resistance exercise. Journal of Applied Physiology **122**(3)
- LaCombe, P., et al. (2021). Physiology, Afterload Reduction. In: StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.
- Laurent, L. C., et al. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. Cell Stem Cell **8**(1)
- Leonard, A., et al. (2018). Afterload promotes maturation of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in engineered heart tissues. Journal of Molecular and Cellular Cardiology **118**
- Leung, F. P., et al. (2008). Exercise, Vascular Wall and Cardiovascular Diseases. Sports Medicine **38**(12)
- Linari, M., et al. (2015). Force generation by skeletal muscle is controlled by mechanosensing in myosin filaments. Nature **528**(7581)
- Lister, R., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature **471**(7336)
- Litwin, S. E., et al. (1995). Serial Echocardiographic-Doppler Assessment of Left Ventricular Geometry and Function in Rats With Pressure-Overload Hypertrophy. Circulation **91**(10)
- Mahjoub, H., et al. (2019). Cardiac remodeling after six weeks of high-intensity interval training to exhaustion in endurance-trained men. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **317**(4)
- Meerson, F. Z. (1962). Compensatory hyperfunction of the heart and cardiac insufficiency. Circ Res **10**
- Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure (2011). The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. European Heart Journal **33**(14)

- Möbius-Winkler, S., et al. (2016). Coronary Collateral Growth Induced by Physical Exercise: Results of the Impact of Intensive Exercise Training on Coronary Collateral Circulation in Patients With Stable Coronary Artery Disease (EXCITE) Trial. Circulation **133**(15)
- Morganroth, J. and B. J. Maron (1977). The athlete's heart syndrome: a new perspective. Ann N Y Acad Sci **301**
- Mosqueira, D., et al. (2018). CRISPR/Cas9 editing in human pluripotent stem cell-cardiomyocytes highlights arrhythmias, hypocontractility, and energy depletion as potential therapeutic targets for hypertrophic cardiomyopathy. European Heart Journal **39**(43)
- Nadruz, W. (2015). Myocardial remodeling in hypertension. J Hum Hypertens **29**(1)
- Nakahara, H., et al. (2015). Low-Frequency Severe-Intensity Interval Training Improves Cardiorespiratory Functions. Medicine & Science in Sports & Exercise **47**(4)
- Nakamura, M. and J. Sadoshima (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. Nat Rev Cardiol **15**(7)
- Naylor, L. H., et al. (2008). The athlete's heart: a contemporary appraisal of the 'Morganroth hypothesis'. Sports Med **38**(1)
- Oka, T., et al. (2014). Angiogenesis and Cardiac Hypertrophy. Circulation Research **114**(3)
- Okamoto, K. and K. Aoki (1963). Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. Japanese Circulation Journal **27**(3)
- Opie, L. H., et al. (2006). Controversies in ventricular remodelling. Lancet **367**(9507)
- Palmer, B. M. (2005). Thick Filament Proteins and Performance in Human Heart Failure. Heart Failure Reviews **10**(3)
- Parry-Williams, G. and S. Sharma (2020). The effects of endurance exercise on the heart: panacea or poison? Nat Rev Cardiol
- Pelliccia, A., et al. (2002). Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. Circulation **105**(8)
- Pfister, R. (2019). Herzinsuffizienz. In: Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung : 2019 : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. G.-. Herold. Köln, De Gruyter: 209-222.
- Pluim, B. M., et al. (2000). The Athlete's Heart. Circulation **101**(3)
- Prisant, L. M. (2005). Hypertensive heart disease. J Clin Hypertens (Greenwich) **7**(4)
- Querdel, E., et al. (2021). Human Engineered Heart Tissue Patches Remuscularize the Injured Heart in a Dose-Dependent Manner. Circulation
- Rassow, J. (2016). IGF-1 (Insulin-like growth factor 1). In: Duale Reihe Biochemie. J. Rassow, K. Hauser, R. Deutzmann and R. Netzker, Georg Thieme Verlag.
- Rassow, J. (2016). Transkriptionsfaktor HIF-1. In: Duale Reihe Biochemie. J. Rassow, K. Hauser, R. Deutzmann and R. Netzker, Georg Thieme Verlag.

- Rodriguez, M. L., et al. (2019). A magnetics-based approach for fine-tuning afterload in engineered heart tissues. ACS Biomater Sci Eng **5**(7)
- Ross, J., et al. (1966). Contractile State of the Heart Characterized by Force-Velocity Relations in Variably Afterloaded and Isovolumic Beats. Circulation Research **18**(2)
- Sano, M., et al. (2007). p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. Nature **446**(7134)
- Schulze, M. (2019). Kardiomyozyten aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen - Untersuchungen zur Reliabilität im 3D-Format und Anwendung als biologischer Schrittmacher. Fachbereich Chemie. Schulze, M., Universität Hamburg. **PhD**.
- Schwarzer, M. (2016). Chapter 8 - Models to Investigate Cardiac Metabolism. In: The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism. M. Schwarzer and T. Doenst. Boston, Academic Press: 103-122.
- Sciacca, L., et al. (2010). Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. Diabetologia **53**(8)
- Serner, G. G. N., et al. (2001). Increased Cardiac Sympathetic Activity and Insulin-Like Growth Factor-I Formation Are Associated With Physiological Hypertrophy in Athletes. Circulation Research **89**(11)
- Shapiro, H. M. (2005). Practical flow cytometry, John Wiley & Sons.
- Shimizu, I. and T. Minamino (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. J Mol Cell Cardiol **97**
- Simpson, P., et al. (1982). Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. Circulation Research **51**(6)
- Skalak, R. and C. F. Fox (1988). Tissue engineering : proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988, Granlibakken, Lake Tahoe, California, Alan R. Liss.
- Sliker, L. J., et al. (1997). Modifications in the B10 and B26–30 regions of the B chain of human insulin alter affinity for the human IGF-I receptor more than for the insulin receptor. Diabetologia **40**(2)
- Sommerfeld, M. R., et al. (2010). In Vitro Metabolic and Mitogenic Signaling of Insulin Glargine and Its Metabolites. PloS one **5**(3)
- Sörensen, N. A. (2013). Entwicklung eines Herzhypertrophiemodells *in vitro* basierend auf künstlichem Herzmuskelgewebe, Universität Hamburg. **Doktor der Medizin**.
- Statistisches Bundesamt (2020). Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauferkrankungen, Statistisches Bundesamt,.
- Statistisches Bundesamt (2020). Tiefgegliederte Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und -patienten (Datensatzstruktur) 2018. tiefgegliederte-diagnosedaten-5231301187015.xlsx, Statistisches Bundesamt,.
- Suurmeijer, A. J., et al. (2003). α -Actin isoform distribution in normal and failing human heart: a morphological, morphometric, and biochemical study. The Journal of Pathology **199**(3)

- Tamura, S., et al. (2019). Heat-shock protein 90 modulates cardiac ventricular hypertrophy via activation of MAPK pathway. J Mol Cell Cardiol **127**
- Tarnavski, O., et al. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. Physiological genomics **16**(3)
- Tomanek, R. J. and G. I. Cooper (1981). Morphological changes in the mechanically unloaded myocardial cell. The Anatomical Record **200**(3)
- Tzur, A., et al. (2011). Optimizing optical flow cytometry for cell volume-based sorting and analysis. PloS one **6**(1)
- Urhausen, A., et al. (2004). Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? Heart **90**(5)
- Utomi, V., et al. (2013). Systematic review and meta-analysis of training mode, imaging modality and body size influences on the morphology and function of the male athlete's heart. Heart **99**(23)
- Verboven, M., et al. (2019). High intensity training improves cardiac function in healthy rats. Scientific reports **9**(1)
- Vilela, E. M., et al. (2015). BNP and NT-proBNP elevation after running--a systematic review. Acta Cardiol **70**(5)
- Wang, Y., et al. (2010). Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. Physiological research **59**(5)
- Waring, C. D., et al. (2014). The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. European Heart Journal **35**(39)
- Weinberger, F., et al. (2017). Engineering Cardiac Muscle Tissue: A Maturing Field of Research. Circ Res **120**(9)
- Werner, T. R. (2018). Humanes künstliches Herzgewebe aus mehreren Zelltypen zur Untersuchung kardialer Hypertrophie, Universität Hamburg. **PhD**.
- Williams, B., et al. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). European Heart Journal **39**(33)
- Windecker, S., et al. (2002). Effect of endurance training on coronary artery size and function in healthy men: an invasive followup study. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology **282**(6)
- Yancy, C. W., et al. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. Circulation **128**(16)
- Yoon, S., et al. (2019). Inhibition of heat shock protein 70 blocks the development of cardiac hypertrophy by modulating the phosphorylation of histone deacetylase 2. Cardiovasc Res **115**(13)

Yurinskaya, V., et al. (2017). A comparative study of U937 cell size changes during apoptosis initiation by flow cytometry, light scattering, water assay and electronic sizing. Apoptosis **22**(10)

Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2021). Datenbankabfrage mit Schätzung der Inzidenz, Prävalenz und des Überlebens von Krebs in Deutschland auf Basis der epidemiologischen Landeskrebsregisterdaten.

Zhou, P. and W. T. Pu (2016). Recounting Cardiac Cellular Composition. Circ Res **118**(3)

Ziaeian, B. and G. C. Fonarow (2016). Epidemiology and aetiology of heart failure. Nature reviews. Cardiology **13**(6)

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

Becker B, Rodriguez ML, Werner TR, Stenzig J, Eschenhagen T, Hirt MN (2020) „Magnetic Adjustment of Afterload in Engineered Heart Tissues.“ *Journal of Visualized Experiments* (159)

Rodriguez ML, Werner TR, **Becker B**, Eschenhagen T, Hirt MN (2019) „A magnetics-based approach for fine-tuning afterload in engineered heart tissues.“ *ACS Biomaterials Science and Engineering*; 5(7):3663-3675.

8 DANKSAGUNGEN

Ich danke Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Überlassung des Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen und für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation.

PD Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Marc Hirt danke ich für seine sehr (sehr!) gute Betreuung mit viel Klugheit, Humor und Gelassenheit. Ich versuche, mir von allem ein Scheibchen abzuschneiden. Vieles habe ich von Marc gelernt – ich hoffe, dass mir der große Mann mit den großen Händen noch ein paar Gelegenheiten gibt, etwas (Zweirad-)Expertise zurückzugeben.

Für seine exzellente Forschungsunterstützung (nicht nur) am Durchflusszytometer und seine mindestens genauso exzellenten Flachwitze in allen anderen Situationen danke ich Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Justus Stenzig. Ich freue mich auf zukünftige gemeinsame Weiterbildungen im Hoch- und Tiefstapeln!

Ich danke Jutta Starbatty für ihre großartige Unterstützung in allen praktischen Dingen der Forschung, aber auch für vier Tage Sonnenschein jede Woche. Gern habe ich neben dir gegessen!

Bei Dr. Tessa Werner und Dr. Marita L. Rodriguez möchte ich mich für die äußerst produktive und angenehme interkontinentale Zusammenarbeit (über drei Zeitzonen hinweg!) bedanken.

Dr. Bärbel Maria Ulmer danke ich, dass sie meine Bemühungen zur Zellgrößenmessung mit Motivation, Arbeitszeit und ihrem Blut unterstützt hat.

Bei allen anderen DoktorandInnen und MitarbeiterInnen des Instituts bedanke ich mich für eine schöne und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die es so – glaube ich – selten gibt. Euch alle namentlich zu erwähnen würde hier den Rahmen sprengen, aber ohne Euch wäre die Zeit nicht halb so schön und der Alltag nicht halb so nett gewesen.

Großer Dank gebührt Kristin Hartmann von der Mauspathologie Core Facility, die den histologischen Anteil dieser Arbeit ermöglicht hat. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Elke Hammer vom Interfakultären Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung Greifswald, mit der ich als kluger und gastfreundlicher Kooperationspartnerin gerne zusammengearbeitet habe.

Bei meinen Eltern und Marina bedanke ich mich für die umfassende Betreuung in allem, was nicht (direkt) mit Wissenschaft zu tun hat.

9 LEBENSLAUF

10 ANHANG

10.1 Versuche zu verschiedenen Medium-Kompositionen

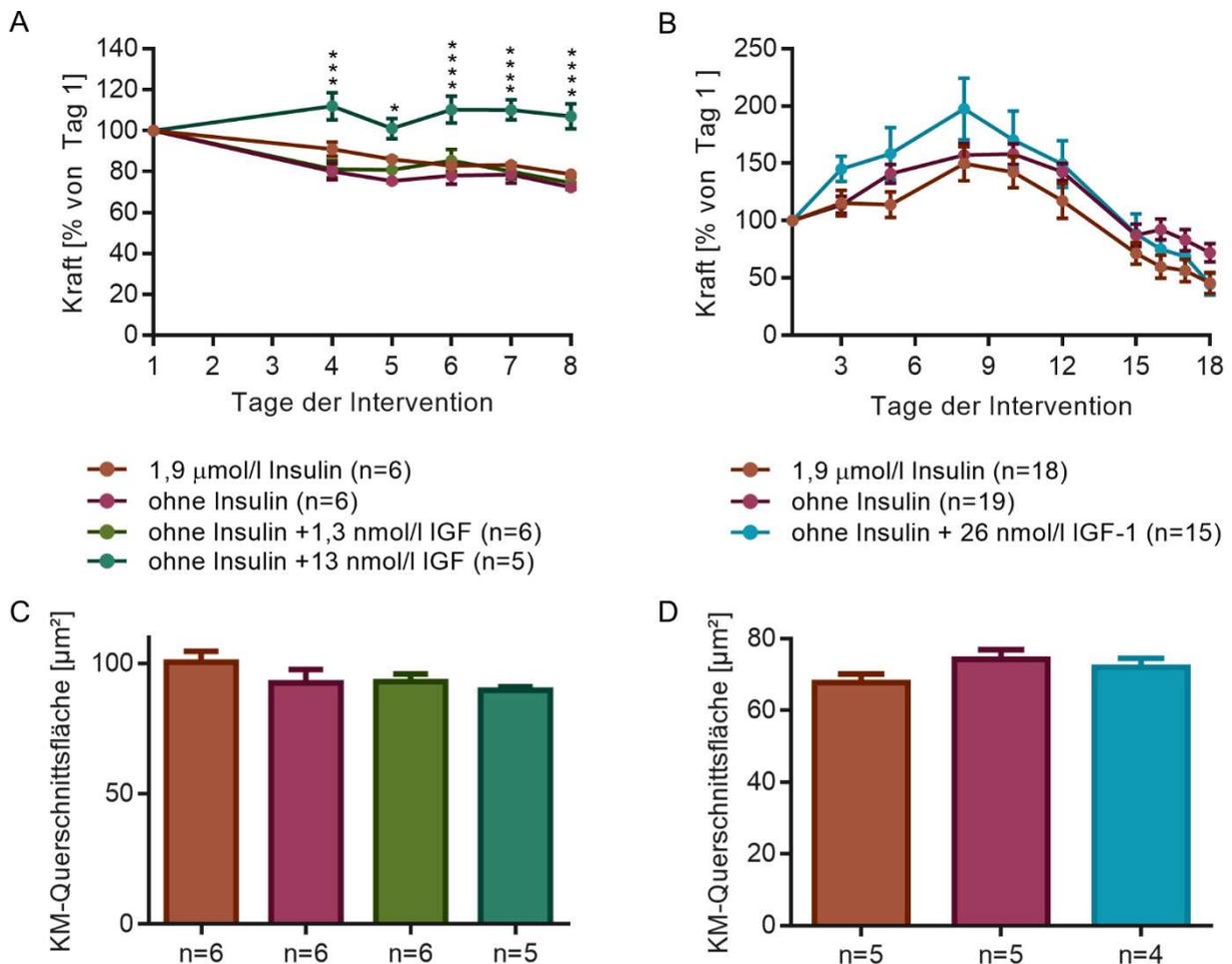


Abb. 9.1: Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen auf Kontraktilität und Zellgröße in Ratten-EHTs. (A) und (B) stellen die auf den ersten Tag der Intervention normalisierten Kontraktionskräfte von Ratten-EHTs dar, deren serumfreies Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Insulin und IGF-1 supplementiert wurde. Die mittlere Kraft am ersten Versuchstag betrug in Experiment (A) je nach Versuchsgruppe 0,3 mN bis 0,35 mN, in Experiment (B) lag sie für alle Gruppen bei 0,22 mN. Für (A) wurde der Einfachheit halber die **geringste** Signifikanz visualisiert, mit der sich die Versuchsgruppe „ohne Insulin + 13 nmol/l IGF“ von den drei anderen Gruppen unterschied. In (C) bzw. (D) werden die histologisch bestimmten Kardiomyozyten-Querschnittsflächen aus EHTs des in (A) bzw. (B) abgebildeten Versuchs dargestellt. Die Anzahl „n“ bezeichnet die Zahl der analysierten EHTs; pro EHT wurden 50 Kardiomyozyten vermessen.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Zusammensetzung des EHT-Mediums auf die gemessene Kontraktilität und Kardiomyozyten-Zellgröße hatte, wurde in mehreren Versuchen das serumfreie Medium von Ratten-EHTs mit unterschiedlichen Konzentrationen von Insulin bzw. IGF-1 versetzt. 1,9 $\mu\text{mol/l}$ Insulin entspricht dabei der Konzentration, die im „Standard“-EHT-Medium verwendet wird. Im ersten Versuch wiesen Ratten-EHTs, die während der Intervention in Abwesenheit von Insulin, allerdings unter dem Einfluss von 13 nmol/l IGF-1 kultiviert wurden, höhere Kontraktionskräfte auf als EHTs der anderen Versuchsgruppen. Auf

die in den EHTs gemessenen Zellgrößen hatte die Zusammensetzung des Mediums gemäß Abb. 9.1 (C) keinen Einfluss. Basierend auf der Hypothese, dass eine Exposition von nur einer Woche zu kurz und eine IGF-1-Konzentration von 13 nmol/l zu niedrig war, um einen Effekt auf die Kardiomyozyten-Größe zu beobachten, wurde ein zweiter Versuch konzipiert. Während der 18-tägigen Intervention unterschieden sich die Kräfte der EHTs der verschiedenen Versuchsgruppen kaum – allerdings wiesen alle EHTs eine Abnahme der Kontraktionskraft ab Tag 8 auf, die möglicherweise auf den andauernden Serum-Entzug zurückzuführen sein könnte. Auch in dieser längeren Intervention vermochte keine der Medium-Zusammensetzungen eine (relative) Kardiomyozyten-Hypertrophie zu provozieren.

10.2 Steifere Magnet-Silikonhalterungen

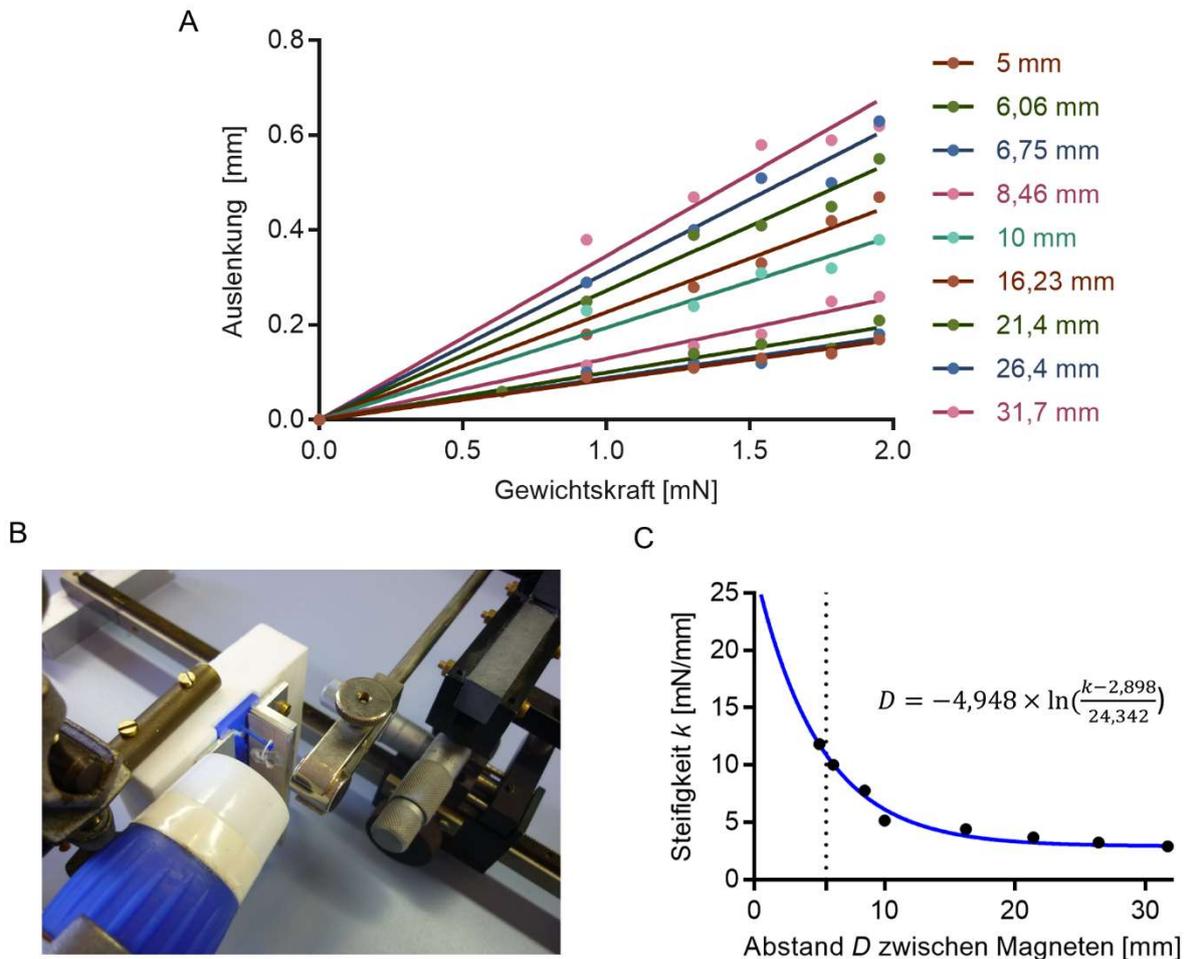


Abb. 9.2: Zusammenhang zwischen Magnet-Abstand und Silikonfuß-Steifigkeit für steifere magnetische EHT-Kulturhalterungen. (A) Lineare Zusammenhänge zwischen Gewichtskraft der angehängten Kalibrierungslast und Silikonfuß-Auslenkung bei 8 verschiedenen Magnet-Abständen D zwischen 5 mm und 32 mm. (B) Messstand zur optischen Bestimmung der Silikonfuß-Steifigkeit bei definiertem Magnet-Abstand. (C) Nicht-linearer Zusammenhang zwischen Magnet-Abstand D und Silikonfußsteifigkeit k . Die gestrichelte Linie markiert den minimalen Magnet-Abstand D , der bei Verwendung der *Piezo-Stage* erzielt werden kann.

Um den Umfang der mithilfe der *Piezo-Stage* modellierbaren Nachlast-Zustände zu erweitern, wurde ein neuer Typus einer magnetischen Silikonhalterung hergestellt. Als Basis wurden Halterungen mit einer Steifigkeit von 2,1 mN/mm verwendet – die Basis-Halterungen, die in den restlichen Versuchen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen, wiesen lediglich eine Steifigkeit von 0,6 mN/mm auf. Der restliche Herstellungsprozess gemäß Abschnitt 2.6.3.1 blieb unverändert, so wurden auch hier 5 kleine zylindrische Magneten in die Silikonfüße eingeführt. Ein so modifizierter Silikonfuß wurde horizontal eingespannt, im Anschluss wurden verschiedene Testgewichte mit Massen bis 157 mg ans äußerste Ende des Silikonfußes gehängt und die resultierende Auslenkung des Fußes optisch gemessen (Abb. 9.2 (B) zeigt den beschriebenen Messstand). Die Bilder wurden mittels einer vergrößernenden USB-Kamera aufgenommen, das ebenfalls abgelichtete Millimeterpapier ermöglichte die digitale Skalierung. Dieser Vorgang wurde wiederholt für 8 verschiedene definierte Distanzen zwischen dem

magnetischen Silikonfuß und einem Magneten, der identisch mit den in der *Piezo-Stage* verwendeten Magneten war. So konnten (wie in Abb. 9.2 (A) ersichtlich) 8 verschiedene lineare Regressions-Funktionen gebildet werden, deren Steigungs-Kehrwert für je einen definierten Magnet-Abstand D die resultierende Steifigkeit k repräsentierte. Ausgehend von diesen 8 Steifigkeitswerten wurde eine nichtlineare Regressionsfunktion extrapoliert (GraphPad Prism Version 6, „*One Phase Decay*“-Funktion), die in Abb. 9.2 (C) abgebildet ist. Die aus der Regressionsanalyse resultierende Funktion, die den Zusammenhang zwischen Magnet-Abstand D und Silikonfuß-Steifigkeit k für diesen steiferen Typ magnetischer EHT-Kulturhalterungen beschreibt, findet sich ebenfalls in Abb. 9.2 (C).

Mittels des beschriebenen steiferen Typus von magnetischer EHT-Silikonhalterung lassen sich Nachlasten zwischen 2,9 mN/mm und 10 mN/mm bei Verwendung der *Piezo-Stage* realisieren. Somit reicht das Nachlast-Spektrum auch bis in einen Bereich, der in Ratten-EHTs pathologische Umbauprozesse auslöst. Allerdings „rutschten“ in einem ersten Versuch an den steiferen magnetischen Silikonhalterungen kultivierte EHTs im Verlauf der ersten zwei Wochen an den Silikonfüßen nach oben – ob die Halterungen also tatsächlich ohne weitere Modifikationen einsetzbar sind, bleibt unklar.

10.3 Versteifung der Kontroll-Silikonfüße an magnetischen Halterungen

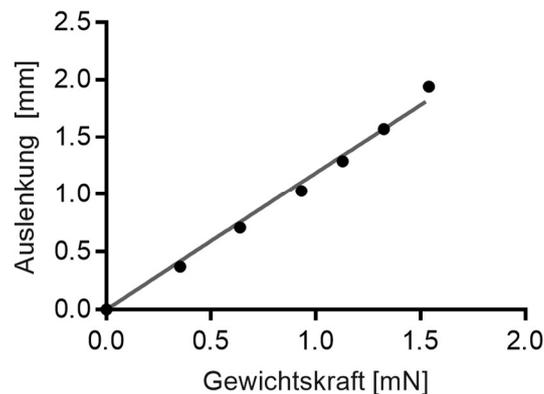


Abb. 9.3: Bestimmung der Steifigkeit eines mit Polystyren-Stäbchen verstärkten Silikonfußes. Abgebildet sind die beim Anhängen verschiedener Testgewichte gemessenen Auslenkungen eines verstärkten „weißen“ Silikonfußes (basale Steifigkeit 0,6 mN/mm). Die dunkelgraue Linie stellt die über die Messwerte extrapolierte lineare Regressionsfunktion dar, deren Steigungs-Kehrwert der Steifigkeit des Silikonfußes entspricht.

Eine Problematik bei der Verwendung der magnetischen Silikon-Halterungen im Rahmen von *Piezo-Stage*-Experimenten stellte der basale Nachlastunterschied zwischen beiden Versuchsgruppen dar: Durch die fünf eingeführten zylinderförmigen Magnete wurden die entsprechend behandelten Silikonfüße auf 0,9 mN/mm versteift, während die Kontroll-EHTs lediglich bei 0,6 mN/mm Nachlast kultiviert wurden. Um diese basale Diskrepanz der Nachlast aufzuheben und Kontraktilitätsmessungen in Zukunft vergleichbarer zu machen, wurden 2 mm lange Abschnitte eines Modellbau-Polystyren-Stäbchens mit einem Durchmesser von 0,4 mm in einen unbehandelten, hohlen Silikonfuß eingeführt. Anschließend wurden verschiedene Plexiglas-Testgewichte an den horizontal ausgerichteten Fuß gehängt und die resultierende Auslenkung optisch gemessen (siehe Abb. 9.2 A für den Aufbau des Messstandes). Wie aus Abbildung 9.3 ersichtlich, bestand zwischen Gewichtskraft und gemessener Auslenkung ein nahezu linearer Zusammenhang. Der Kehrwert der linearen Regressionsfunktion, die diesen Zusammenhang beschreibt, entspricht der Steifigkeit k des Polystyren-Zylinder-verstärkten Silikonfußes. Diese Steifigkeit k wurde hier mit 0,84 mN/mm bemessen. Für zukünftige Versuche könnte also mittels dieser Versteifung die Diskrepanz zwischen der basalen Nachlast von Interventions- und Kontroll-EHTs von 0,3 mN/mm auf 0,06 mN/mm gesenkt werden, was die Vergleichbarkeit von Kontraktilitätsmessungen deutlich erhöhen würde.

In der praktischen Anwendung war problematisch, dass beim Zuschneiden der Polystyren-Abschnitte mittels eines *Cutters* häufig „unsaubere“ Enden entstanden. Diese „unsauberen“ Enden zeigten eine Tendenz, sich im Silikonfuß gegeneinander zu verschieben und so den eigentlich geraden Silikonfuß zu verformen. Diese Problematik ließe sich wahrscheinlich durch Verwendung eines besser geeigneten Schneidewerkzeugs oder durch ein Abfeilen der Enden umgehen.

10.4 Statistische Auswertung zu Abb. 3.10

3.10 (A) Kräfte an verschiedenen steifen Silikonhalterungen kultivierter humaner EHTs über die Dauer der Kultur, zweifaktorielle Varianzanalyse			
Varianzquelle	Anteil an der Gesamtvariation [%]	P-Wert	Signifikanzniveau
Interaktion	12	< 0,0001	****
Zeit	51	< 0,0001	****
Nachlast	23	< 0,0001	****
3.10 (A) Multiple Vergleiche			
Versuchsgruppen	Mittlerer Kraftunterschied [mN]	Signifikanzniveau	
Tag 6			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,028	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,0044	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,024	ns	
Tag 8			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,051	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,025	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,028	ns	
Tag 10			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,06	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,052	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,12	*	
Tag 13			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,07	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,096	*	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,21	****	
Tag 15			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,093	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,14	**	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,3	****	
Tag 17			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,076	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,16	***	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,35	****	
Tag 20			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,054	ns	
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,16	***	
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,34	****	
Tag 22			
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,06	ns	

k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,21	****
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,44	****
Tag 24		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,091	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,24	****
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,49	****
Tag 27		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,11	*
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,32	****
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,64	****
Tag 29		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,13	**
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,36	****
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,72	****
Tag 31		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,16	***
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,44	****
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,83	****

3.10 (B) Kräfte an verschiedenen steifen Silikonhalterungen kultivierter Ratten-EHTs über die Dauer der Kultur, zweifaktorielle Varianzanalyse

Varianzquelle	Anteil an der Gesamtvariation [%]	P-Wert	Signifikanzniveau
Interaktion	4,6	< 0,0001	****
Zeit	38	< 0,0001	****
Nachlast	24	< 0,0001	****

3.10 (B) Multiple Vergleiche

Versuchsgruppen	Mittlerer Kraftunterschied [mN]	Signifikanzniveau
Tag 6		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,00093	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,0045	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,017	ns
Tag 8		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,074	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,069	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,17	*
Tag 10		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,081	ns

k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,15	*
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,35	****
Tag 13		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,11	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,21	**
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,47	****
Tag 15		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,14	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,22	**
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,45	****
Tag 17		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,12	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,22	**
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,54	****
Tag 20		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,075	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,25	***
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,41	****
Tag 24		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,14	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,32	****
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,42	****
Tag 27		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,055	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,22	**
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,35	****
Tag 31		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,092	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,25	***
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,44	****

3.10 (C) Auslenkung an verschiedenen steifen Silikonhalterungen kultivierter humaner EHTs über die Dauer der Kultur, zweifaktorielle Varianzanalyse

Varianzquelle	Anteil an der Gesamtvariation [%]	P-Wert	Signifikanzniveau
Interaktion	0,65	0,0734	ns
Zeit	72	< 0,0001	****
Nachlast	2,8	0,0289	*

3.10 (C) Multiple Vergleiche		
Versuchsgruppen	Mittlerer Unterschied der Auslenkung [mm]	Signifikanzniveau
Tag 6		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,027	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,013	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,011	ns
Tag 8		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,037	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,034	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,062	ns
Tag 10		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,033	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,046	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,066	ns
Tag 13		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,027	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,049	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,077	ns
Tag 15		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,041	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,039	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,073	ns
Tag 17		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,005	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,058	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,091	ns
Tag 20		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,034	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,081	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,13	**
Tag 22		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,041	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,067	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,12	**
Tag 24		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,0045	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,052	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,1	*

Tag 27		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,004	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,027	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,089	ns
Tag 29		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,018	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,0021	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,065	ns
Tag 31		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,051	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,052	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,021	ns

3.10 (D) Auslenkung an verschieden steifen Silikonhalterungen kultivierter Ratten-EHTs über die Dauer der Kultur, zweifaktorielle Varianzanalyse

Varianzquelle	Anteil an der Gesamtvariation [%]	P-Wert	Signifikanzniveau
Interaktion	2,3	0,0186	*
Zeit	48	< 0,0001	****
Nachlast	6,5	0,0004	***

3.10 (D) Multiple Vergleiche

Versuchsgruppen	Mittlerer Unterschied der Auslenkung [mm]	Signifikanzniveau
Tag 6		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,000028	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	-0,0012	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	-0,0048	ns
Tag 8		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,056	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,02	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,022	ns
Tag 10		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,019	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,074	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,11	ns
Tag 13		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,032	ns

k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,058	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,094	ns
Tag 15		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,014	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,072	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,12	ns
Tag 17		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,0097	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,11	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,15	*
Tag 20		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,036	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,064	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,2	***
Tag 24		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	-0,041	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,095	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,23	****
Tag 27		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,073	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,12	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,25	****
Tag 31		
k=0,60 mN/mm vs. k=0,80 mN/mm	0,016	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=1,24 mN/mm	0,07	ns
k=0,60 mN/mm vs. k=2,11 mN/mm	0,17	**

11 EIDESSTAATLICHE 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: 