

Aus dem Institut für Pharmakologie  
(Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann)  
Im Zentrum für Pharmakologie und Toxikologie

**Über die Auswirkung mechanischer Last auf die Entwicklung von  
künstlichen Herzgeweben**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Anne Barbara Baltzer

aus  
Rinteln

Göttingen 2014

**Dekan: Prof. Dr. rer. nat. K.H. Kroemer**

**I. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. W.-H. Zimmermann**

**II. Berichterstatter/in: PD Dr.med. Kaomei Guan-Schmidt**

**Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2014**

---

1	Einleitung	1
1.1	Frank-Starling-Mechanismus	1
1.2	Mechanische Last bei der Herzentwicklung	3
1.3	Myokardiale Hypertrophie	4
1.4	Herzinsuffizienz durch mechanische Last	5
1.5	Zell-basierte Therapie	6
1.6	Künstliche Herzgewebe	6
1.7	Embryonale Stammzellen	9
1.8	Aufgabenstellung	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Zellbiologische Methoden	14
2.1.1	Embryonale Mausfibroblasten	14
2.1.2	Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen	15
2.2	<i>In vitro</i> -Differenzierung	16
2.2.1	Kultur in hängenden Tropfen	16
2.2.2	Generierung von <i>Engineered Heart Muscle</i>	18
2.2.3	Kultivierung von EHM	19
2.3	Isometrische Kontraktionskraftmessung	21
2.4	Molekularbiologische Analysen	23
2.4.1	Isolierung von RNA aus EHM	23
2.4.2	Reverse Transkription	23
2.4.3	Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)	24
2.5	Histologische Untersuchung	25
2.5.1	Immunfluoreszenz	25
2.6	Statistische Auswertung	25

---

<b>2.7</b>	<b>Materialien</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Optimierung der <i>Engineered Heart Muscle</i></b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der Entwicklung im 2D- (EB) und 3D- (EHM) Modell</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Entwicklungsrelevante Transkripte im Differenzierungsverlauf</b>	<b>33</b>
<b>3.2.1.1</b>	<b>Transkription in der EB-Kultur</b>	<b>35</b>
<b>3.2.1.2</b>	<b>Transkription in der EHM-Kultur</b>	<b>36</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Histologischer Nachweis der Entwicklung im EHM</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Reifung der Kardiomyozyten in der EB- und EHM-Kultur</b>	<b>40</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Funktionelle Analyse der Entwicklungsreihe</b>	<b>42</b>
<b>3.3</b>	<b>Beeinflussung der kardialen Differenzierung durch mechanische Last</b>	<b>44</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Histologische Untersuchung der strukturellen Veränderung</b>	<b>45</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Transkription kardialer Marker</b>	<b>46</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Funktionelle Analyse</b>	<b>47</b>
<b>3.4</b>	<b>Last im EHM-Modell</b>	<b>49</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Erstes Protokoll zur akuten Minder- und Mehrbelastung</b>	<b>50</b>
<b>3.4.1.1</b>	<b>Analyse lastspezifischer Transkripte: SERCA2a und BNP</b>	<b>51</b>
<b>3.4.1.2</b>	<b>Funktionelle Analyse der be- und entlasteten EHM</b>	<b>52</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Zweites Protokoll zur akuten Belastung</b>	<b>53</b>
<b>3.4.2.1</b>	<b>Analyse der lastspezifischen Transkripte</b>	<b>54</b>
<b>3.4.2.2</b>	<b>Funktionelle Analyse nach 12-stündiger Belastung</b>	<b>55</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Transkription von BNP im Zeitverlauf der mechanischen Belastung</b>	<b>56</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung des mES-Zell-EHM-Protokolls</b>	<b>59</b>

---

<b>4.2</b>	<b>Transkriptionsprofile während der EB- und EHM-Entwicklung</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Reifung in der EB- und EHM-Kultur</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>Beeinflussung der Kardiogenese und Kardiomyozytenreifung durch Last</b>	<b>65</b>
<b>4.5</b>	<b>EHM als Modell für Vor- und Nachlasterhöhung</b>	<b>67</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>71</b>
<b>6.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>6.1.1</b>	<b>Primer und PRC-Bedingungen</b>	<b>73</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Antikörper</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>84</b>

## **1 Einleitung**

In Deutschland führen die Herz-Kreislaufkrankungen die Liste der 10 häufigsten Todesursachen an (Bundesamt für Statistik 2011). Das zum Tod führende Herzversagen tritt spontan nach lange bestehendem Hypertonus oder in Folge einer Herzinsuffizienz oder eines Myokardinfarkts auf. Die häufigste Grunderkrankung des Herz-Kreislaufsystems ist die arterielle Hypertonie. Zuletzt 2006 erhoben waren 30% der 40-65-Jährigen mit arterieller Hypertonie diagnostiziert, bei über 64-Jährigen waren es sogar >50% (Bundesamt für Statistik 2006). Als Folge treten eine kardiale Hypertrophie, Rhythmusstörungen und Ischämien auf. Die klinische Therapie ist heute vielseitig und vor allem präventiv. Treten jedoch Schäden am Myokard auf, sind diese aufgrund des geringen Regenerationspotentials irreversibel (Soonpaa et al. 1994, Bergmann et al. 2009). Ziel der Forschung sollte die Aufklärung des Pathomechanismus der kardialen Belastung sein, um zukünftig den Vor- und Nachlast-bedingten Schäden des Myokards z.B. durch Medikamente vorbeugen zu können.

### **1.1 Frank-Starling-Mechanismus**

Der Herzmuskel ist mit jedem Herzschlag einem ständigen Wechsel an mechanischen Belastungen in Form von Vordehnung, Volumendruck und Entspannung ausgesetzt. Zu Beginn des letzten Jahrhunderts konnten Frank und Starling zeigen, dass das Myokard die Fähigkeit besitzt, eine größere Kontraktionskraft zu erzeugen, wenn das Myokard bedingt durch stärker gefüllte Ventrikel zu Beginn der Herzaktion stärker vorgedehnt ist. Diese Vordehnung erfolgt immer dann, wenn es zum einen zu einer verstärkten Füllung des venösen Systems und somit zu einem stärkeren Bluteinstrom in den Ventrikel kommt. Auch ein erhöhter peripherer Druck, der zu einer verspäteten Öffnung der Aortenklappe und nachfolgend zu einem erhöhten Restvolumen im Ventrikel führt, resultiert in einer vermehrten Vordehnung. Diese beiden Phänomene wurden als Vorlast, erhöhtes venöses Blutvolumen, und Nachlast, erhöhter peripherer Widerstand

definiert. Es existieren verschiedene Theorien des zu Grunde liegenden Mechanismus der Kontraktionskraftsteigerung: (1) Eine erhöhte Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Sensibilität (Allen und Kentish 1985, Moss und Fitzsimons 2002), (2) die kooperative Aktivierung durch eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Gordon et al. 2000) und (3) eine erhöhte Brückenbildung zwischen den kontraktilen Filamenten (Fitzsimons und Moss 1998).

Kalzium wurde bereits 1883 von Sidney Ringer als ein wichtiges Elektrolyt für die Depolarisation und die anschließende Kontraktion von Kardiomyozyten erkannt (Ringer 1883). Kalzium strömt durch spannungsabhängige Dihydropyridin-(L-Typ-) Kalziumkanäle von extrazellulär in die Kardiomyozyten ein und triggert dort die Kalziumfreisetzung aus dem sarkoendoplasmatischen Retikulum. Dieses Kalzium bindet an das Strukturprotein Troponin C, woraufhin das Heterotrimer (Troponin C, I, T) und Tropomyosin die Bindungsstellen des Aktins für die Myosinköpfe freigegeben (Bers 2008). Allgemein anerkannt ist die Theorie, dass das gesteigerte Kontraktionsvermögen der vorgedehnten Zellen durch einen Anstieg der Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Sensibilität bedingt ist (Allen und Kentish 1985, Moss und Fitzsimons 2002). Hier existieren verschiedene Hypothesen zum Mechanismus der erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität. Zum einen wird die inhibitorische Region (Threonin 144) des kardialen Troponin I (Tachampa et al. 2007) und zum anderen die passive Spannung durch Titin (Lee et al. 2010) diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Gordon zeigte, dass unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensibilität auch eine erhöhte intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Kontraktionskraft überproportional steigert. Dieser Effekt wurde als kooperative Aktivierung bezeichnet (Gordon, et al. 2000). Andere Arbeiten zeigen, dass alleine durch stärkere Vordehnung eine intensivierete Brückenbildung zwischen den kontraktilen Filamenten hervorgerufen und somit die Kontraktionskraft gesteigert werden kann (Fitzsimons und Moss 1998).

Jedoch reagiert das Herz nicht nur mechanisch auf den Belastungsanstieg, sondern auch auf transkriptioneller und hormoneller Ebene wurden Alterationen beobachtet. Zum Beispiel wird die Expression der Sarkoendoplasmatischen Retikulum Kalzium ATP-ase (SERCA2a) bei erhöhter Vorlast hochreguliert, wodurch vermehrt von extrazellulär eingeströmtes Kalzium

intrazellulär im Sarkoendoplasmatischen Retikulum (SR) gespeichert wird (Tada et al. 1978). Auf diese Weise kann bei der nächsten Systole mehr Kalzium aus dem SR über den Ryanodinrezeptor, der vom Kalzium-abhängigen L-Typ-Kanal aktiviert wird, freigesetzt werden (McGrew et al. 1989). Diese vermehrte Freisetzung wirkt positiv inotrop (Bavendiek et al. 1996). Nicht nur die Kontraktionskraftsteigerung dient zur Aufrechterhaltung des Kreislaufes, sondern auch die Reduktion des vorhandenen Blutvolumens. Das *brain natriuretic peptide* (BNP) ist ein endokrines Schutzhormon des Herzens, das bei erhöhter Nachlast sehr schnell hochreguliert und freigesetzt wird (Nakagawa et al. 1995). Es sorgt über die renale Elimination von Wasser und Elektrolyten für eine Senkung der Nachlast.

## **1.2 Mechanische Last bei der Herzentwicklung**

Mechanischer Stress ist in der Organogenese ein entscheidender Faktor. Die ersten Kontraktionen des Herzens sind wellenförmige An- und Entspannungszustände des unpaaren Herzschlauchs (Hove et al. 2003). Auf die Zellen wirken sich daher bereits in der Entwicklungsphase Volumenlast, Druck und Scherkräfte aus. Aufgrund des Dehnungsstress durch das Blutvolumen ändern die embryonalen Kardiomyozyten die Form ihres Zytoskeletts und ihre Genexpression (Hove, et al. 2003). Die weitere Ausdifferenzierung in venöse Einfluss- und arterielle Ausflussbahn wird so frühzeitig durch diese Lasteinwirkung beeinflusst (le Noble et al. 2004). Der embryonale Blutkreislauf weist deutliche Unterschiede zum postnatalen Kreislauf auf, da die Lunge der Embryos kaum entfaltet ist und daher nur minimal Blut in den linken Ventrikel ein- und ausfließen kann. Mit dem ersten Atemzug kommt es zur sofortigen Umkehrung des Kreislaufs und zur vollen Entwicklung des linken Ventrikels. Postnatal wird dadurch die linke Herzseite stärker druck- und somit auch dehnungsbelastet, was zu einer einseitigen Hypertrophie führt (Vandenburgh 1996). Die Auswirkung von Last auf die kardiale Entwicklung, Differenzierung und Qualität von Kardiomyozyten auf zellulärer Ebene ist bisher nicht ausreichend untersucht worden, was unter anderem am Mangel adäquater *in vitro*-Modelle zur Analyse Last-assoziiierter



pathophysiologischer Prozesse in Herzmuskelzellen sowie Herzmuskelzellverbänden liegt.

### 1.3 Myokardiale Hypertrophie

Wie für alle Gewebe geltend, kann das Herz auf zwei verschiedene Arten an Größe zunehmen. Die Größenzunahme durch Zellteilung wird Hyperplasie genannt und erfolgt am Herzen bis zum Zeitpunkt der Geburt. Anreize zur Zellteilung erhalten die jungen Kardiomyozyten unter anderem auch durch die Wanddehnung, die durch die Volumenlast bedingt ist (Grossman 1980). Postnatal findet nur bei 50% der Zellen zeitlebens eine weitere Teilung statt (Bergmann, et al. 2009). Trotz der geringen Teilungsrate kommt es physiologischer Weise bis zum jungen Erwachsenenalter zum Herzwachstum. Dieses Wachstum erfolgt durch Hypertrophie, also nicht durch Zellteilung, sondern durch eine Volumenzunahme in Folge von Längenwachstum und intrazellulärer Myofibrillenanreicherung (Parmley und Chuck 1973, Vandeburgh 1996, Schaub et al. 1997).

Das Herz eines gesunden Erwachsenen wiegt durchschnittlich 211 g und hat ein linksventrikuläres enddiastolisches Füllungsvolumen von 101 ml (Morganroth et al. 1975). Steigt der Sauerstoffbedarf aufgrund von intensivem Ausdauersport an, kann das Herz wie jeder Muskel trainiert werden und an Größe und somit an Kraft zunehmen. Es wurden bei diesen Sportlern echokardiographisch (Echo) eine Hypertrophie der linken Ventrikelwand, eine Vergrößerung der linken Ventrikelhöhle und eine Zunahme der linken Ventrikelmasse beobachtet (Shapiro et al. 1985). Pelliccia et al. gingen davon aus, dass es ein Limit für die kardiale Hypertrophie durch sportliche Aktivität gibt. Sie zeigten, dass von 947 Sportlern 98% eine Ventrikelwanddicke <13 mm zeigten. Eine Wanddicke >16 mm konnte nicht gemessen werden und sprach am ehesten für eine myokardiale Erkrankung wie z.B. die Hypertrophe Kardiomyopathie (HCM). Ein weiteres Merkmal der

physiologischen Herzhypertrophie ist die symmetrische Wandverdickung bei gleichzeitiger Zunahme des linken Ventrikelvolumens (Pelliccia et al. 1991). Häufiger treten jedoch pathologische Hypertrophien auf, die durch eine arterielle Hypertonie zu einer Herzinsuffizienz führen. Aufgrund des Anstiegs des peripheren Widerstands kommt es zu einer chronischen Nachlasterrhöhung, gegen die das Herz anpumpen muss. Dabei werden vermehrt fibrotische Umbauprozesse und eine unstrukturierte Anordnung von Sarkomeren beobachtet (Swynghedaw 1999). Zusätzlich scheint es durch die pathologische Hypertrophie zu einem Wechsel vom adulten zu einem fetalen Genexpressionsprofil zu kommen (Izumo et al. 1988). Als Folge kann es zu irreversiblen Schäden des Myokards kommen, was zur Funktionseinschränkung bis hin zum Funktionsverlust führen kann (Grossman 1980, Thiedemann et al. 1983).

#### **1.4 Herzinsuffizienz durch mechanische Last**

Die Ätiologie der Herzinsuffizienz ist in bis zu 50% der Fälle eine arterielle Hypertonie (Ho et al. 1993). Kang et al. zeigten, dass die aufgrund von Hypertension hypertrophierten Kardiomyozyten eine signifikant erhöhte Sensibilität gegenüber Apoptose-induzierenden Faktoren haben. Weiterhin zeigten sie, dass Kardiomyozyten der Ratte bei einer anfänglichen Herzinsuffizienz ein proapoptotisches Genprofil aktivierten (Kang et al. 2004). Die Herzinsuffizienz wird anhand klinischer Symptome, z.B. Atemnot bei Belastung und in Ruhe und anhand einer Skala der *New York Heart Association* (NYHA I-IV) eingeteilt. Alternativ kann eine Einteilung anhand des *American College of Cardiology* und der *American Heart Association* (Stage A-D) vorgenommen werden (Ahmed 2003). Unabhängig von den Einteilungen versterben 50% aller Herzinsuffizienzpatienten innerhalb von vier Jahren (Sinescu und Axente 2011). Die Prognose entspricht der eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (Prasse et al. 2010). Als prognostisches Mittel hat sich unter anderem die BNP-Plasmakonzentration erwiesen, da sie einen charakteristischen Anstieg proportional zum Ausmaß einer Herzinsuffizienz zeigt (Siedner et al. 2003). Die heutigen therapeutischen Strategien der myokardialen Erkrankungen bestehen aus zwei unterschiedlichen Ansätzen: (1) Schutz vor neurohumoraler

Überstimulation durch z.B. Betaadrenorezeptorenblocker und (2) mechanische Entlastung des Herzens durch z.B. Diuretika aber auch mechanische Unterstützungssysteme (Garbade et al. 2011). Darüber hinaus besteht allerdings eine große Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Therapieansätze, auch um kausal den Pathomechanismus umkehren zu können.

### **1.5 Zell-basierte Therapie**

Das Regenerationspotential des Myokards ist zu gering um einen akuten Myokarddefekt zu ersetzen. Aus diesem Grund wurden *in vitro*-Verfahren seit Mitte der 80-iger Jahre entwickelt, um künstliche Herzgewebe oder -zellen zu gewinnen und mit Hilfe dieser den Funktionsverlust zu ersetzen (Zimmermann et al. 2002a, Zimmermann et al. 2006a). Zum Beispiel wurden *in vitro* Zellen gezüchtet, um sie dann in das infarzierte Areal zu injizieren und den regenerativen Heilungsprozess zu initiieren oder das Gewebe direkt zu ersetzen. Die Technik der kardialen Revitalisierung durch Zellinjektion basiert auf dem Prinzip, dass die Zellen durch Integration in das vorhandene Narbengewebe stabilisierend wirken und durch elektromechanische Kopplung die Kontraktilität erhöhen. Für dieses Verfahren des Gewebeersatzes durch das Wachstum organfremden Materials wurden verschiedenste Zellpopulationen verwendet: (1) neonatale und fetale Kardiomyozyten (Muller-Ehmsen et al. 2002), (2) Skelettmuskelzellen (Taylor et al. 1998), (3) Knochenmarkzellen (Orlic et al. 2001), sowie (4) Vorläuferzellen (Assmus et al. 2002). Eine Funktionsverbesserung wurde in allen Versuchen beobachtet. Eine weitere Möglichkeit der Zell-basierten Therapie ist das *Tissue Engineering*.

### **1.6 Künstliche Herzgewebe**

Ab 1985 wurde der Begriff des *Tissue Engineering* von der *National Science Foundation* geprägt. Diese Medizin machte es sich zum Ziel, aus

Zellen oder Gewebefragmenten mit Hilfe der Prinzipien und Methoden der Ingenieurwissenschaften biologisch funktionelle Konstrukte herzustellen, die als Ersatzgewebe dienen können. Das Bestreben der Forschung, ein komplettes und funktionelles Organ zu schaffen, bleibt aufgrund der molekularbiologischen und mechanischen Komplexität der Herzentwicklung bis auf weiteres unerfüllt. Stattdessen konzentrierte sich die Wissenschaft auf das Refunktionalisieren des geschädigten Myokards durch Injektion von Zellen mit kardiogenem Potential oder Überbrückung des Gewebes mit *in vitro*-generiertem Myokard (Eschenhagen et al. 2002, Muller-Ehmsen, et al. 2002, Zimmermann, et al. 2006a).

Ein erfolgreicher Ansatz ist die Implantation von *in vitro*-kultivierten Geweben auf das Infarktareal. Der evidente Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, das Gewebe vor der Implantation auf Qualität und Funktion überprüfen zu können. Schon während der Kultivierung können morphologische und funktionelle Eigenschaften beobachtet und untersucht werden. So können ineffizient differenzierte und nicht funktionelle Gewebe schon vor der Implantation selektioniert werden, wodurch das Ergebnis der Implantation verbessert würde. Zur Gewinnung von künstlichen Herzgeweben haben sich drei Herstellungsverfahren etabliert: (1) Die Besiedlung von vorgefertigten synthetischen oder biologischen Gerüsten mit Kardiomyozyten (Radisic et al. 2007), (2) die Förderung einer spontanen myokardialen Formierung in einem kardiogenen Milieu aus Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren und Kardiomyozyten (Zimmermann et al. 2000, Soong et al. 2012), sowie (3) die Stapelung von Einzelschichtkulturen (Shimizu et al. 2002).

Mit Hilfe aller drei Methoden gelang das Generieren von spontan kontrahierenden dreidimensionalen Gewebekonstrukten (Zimmermann, et al. 2006a). Allerdings zeigten sich deutliche funktionelle Unterschiede bei den Methoden. So konnten die Konstrukte, bei denen sich die Kardiomyozyten spontan angeordnet und ausgerichtet haben, eine hundertfach höhere Kraft entwickeln als die Konstrukte mit einem vorgeformten Gerüst. Dies ist möglicherweise eine Konsequenz der Rigidität der verwendeten Trägermaterialien (Natriumalginat, Calciumgluconat, Polymilch- oder Polyglykolsäuren) (Zimmermann et al. 2004). Ein Nachteil, den

diese synthetischen Materialien gemeinsam haben, ist das eingeschränkte Vermögen der Sauerstoff- und Metabolitendiffusion zur Versorgung des Gewebes mit resultierenden hypoxischen Bedingungen. In der von Shimizu et al. (2002) beschriebenen Methode des kardialen *Tissue Engineering* entwickelte sich aus übereinander gelagerten Einzellschichtkulturen ein dreidimensionales Konstrukt, das nach Implantation eine Verbesserung der Herzfunktion und Vaskularisierung zeigte.

In der Arbeitsgruppe von Eschenhagen und Zimmermann wurde seit 1995 ein weiteres *Tissue Engineering* Verfahren zur Herstellung von *Engineered Heart Muscles* (EHM) entwickelt. Das Grundprinzip dieser Methode ist die spontane Anordnung der neonatalen Kardiomyozyten um das sich ebenfalls spontan aggregierende Kollagen Typ 1 und die Bildung einer funktionellen Muskeleinheit. Das Protein Kollagen Typ 1 ist der Hauptbestandteil der biologischen extrazellulären Matrix und bietet daher ein physiologisches Milieu (Ou et al. 2011). Ein weiterer wichtiger Aspekt, der in diese Methode integriert wurde, ist die Ausübung von mechanischem Stress auf das kardiale Gewebe. Dieser soll die physiologische Dehnung während der Herzentwicklung sowie die spätere Volumenbelastung imitieren und ist essentiell für die *in vitro*-Reifung der Kardiomyozyten. Zunächst erfolgte die Herstellung von EHM aus embryonalen Hühnerkardiomyozyten und neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die neonatalen Kardiomyozyten sind im Hinblick auf den Reifegrad der Zellen eine gute Zellquelle, jedoch ist die Ausbeute an EHM nicht optimal. Aus 30 Rattenherzen konnten 30 EHM mit jeweils  $2,5 \times 10^6$  Zellen generiert werden (Zimmermann et al. 2002b). In Implantationsstudien konnte gezeigt werden, dass die EHM *in vivo* nicht nur vital blieben, sondern zu einer linksventrikulären Funktionsverbesserung führten. Dieser Erfolg wurde unter anderem durch die Tatsache erklärt, dass es zur einer Vaskularisierung des Gewebes kam (Didié 2004, Zimmermann et al. 2006b). Da EHM zukünftig unter anderem auf infarzierte Herzareale transplantiert werden sollen, sind die EHM aus nicht humanen neonatalen Kardiomyozyten aufgrund der HLA-Unverträglichkeit keine Option. Humane neonatale Zellen sind momentan technisch unmöglich. Nach der Etablierung der Methode für embryonale Hühnerkardiomyozyten sowie neonatale Mäuse- und Rattenkardiomyozyten

wurden 2006 erfolgreich EHM aus embryonalen Stammzellen hergestellt (Rogge 2007). Wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard wurden sowohl in EHM aus neonatalen Kardiomyozyten wie auch aus embryonalen Stammzellen gefunden (Zimmermann, et al. 2006b, Rogge 2007, Soong, et al. 2012).

## 1.7 Embryonale Stammzellen

Befindet sich der Embryo im 100-200-Zellstadium, wird er als Blastozyste bezeichnet. Die Zellen der inneren Blastozystenmasse werden als pluripotent bezeichnet, da sie sich in jedes der drei Keimblätter, Ekto-, Meso- und Endoderm, entwickeln können. 1981 konnten Evans und Kaufmann erstmalig pluripotente murine embryonale Stammzellen (mES-Zellen) aus dem Embryoblast isolieren (Evans und Kaufman 1981). Die humanen embryonalen Stammzellen (hES-Zellen) konnten 1998 erfolgreich von Thomson isoliert werden (Thomson und Marshall 1998). Unter geeigneten Kulturbedingungen bleiben diese ES-Zellen undifferenziert und unbegrenzt teilungsfähig. Ein weiterer Vorteil der embryonalen Stammzellen ist, dass sie im Gegensatz zu adulten Stammzellen ein konstantes und reges kardiales Differenzierungspotential aufweisen (Doetschman et al. 1985). Auch für humane embryonale Stammzellen konnte ein hohes kardiales Potential gezeigt werden (Kehat et al. 2001). Ähnlich wie in der *in vivo*-Entwicklung aggregieren die Stammzellen in kugelige Zellverbände und differenzieren dort aus. Diese Zellaggregate werden Embryoid Körper (EB) genannt und bilden sich sowohl in den 2D- als auch in den 3D-Kulturen. Während des Differenzierungsprozesses exprimieren die späteren Kardiomyozyten ein der *in vivo*-Entwicklung entsprechendes Transkriptionsprofil (Boheler et al. 2002).

Neben der molekularen Differenzierung zu Kardiomyozyten ist der tatsächliche Reifegrad der Zellen von großer Bedeutung für die weiteren Verwendungsoptionen. Funktionelle Aspekte wurden mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Reifung der in der ES-Zellkultur gewonnenen Kardiomyozyten der

fetaler Kardiomyozyten entspricht (Mummery et al. 2003). Zur Erueierung des Reifegrades eignet sich im Nagermodell das Strukturprotein  $\alpha$ -Myosin Schwere Kette ( $\alpha$ -MHC) (Tiburcy et al. 2011). Im Verlauf des Reifungsprozesses wird das embryonale Strukturprotein  $\beta$ -MHC durch  $\alpha$ -MHC ersetzt, so dass der Quotient aus den exprimierten mRNA-Mengen Rückschlüsse auf das Entwicklungsstadium zulässt (Mahdavi et al. 1984, de Groot et al. 1989, Sanchez et al. 1991). Embryonal ist der Quotient, aufgrund der hohen  $\beta$ -MHC-Expression deutlich kleiner eins, während neonatale Kardiomyozyten einen Quotienten von ca. 20 zeigen (Didie et al. 2013). Im Menschen ist das Verhältnis aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC während der Entwicklung genau entgegengesetzt und im adulten Herzen findet sich hauptsächlich  $\beta$ -MHC (Gorza et al. 1984, Everett 1986). Hier ist eine relative und auch absolute Zunahme von  $\beta$ -MHC ein Reifeparameter. Bisher wurden in EHM hauptsächlich junge, unreife Zellen in immunhistochemischen Untersuchungen nachgewiesen. Sie wiesen eine geringe und unregelmäßige Verteilung der quergestreiften Fasern auf (Hescheler et al. 1997). Der strukturelle Aufbau adulter Kardiomyozyten zeigte hingegen ein gut organisiertes Synzytium mit parallelen kontraktile Elementen für eine effizientere Kontraktionsfähigkeit. Daher bleibt der Reifungsprozess der aus der ES-Zellkultur gewonnenen Kardiomyozyten zu optimieren. Für die Herstellung von EHM sind verschiedene Differenzierungsstadien der ES-Zellen denkbar: (1) unselektionierte undifferenzierte ES-Zellen oder (2) enddifferenzierte vorselektionierte Kardiomyozyten.

Eine Möglichkeit der Gewinnung von differenzierten Kardiomyozyten ist die Kultivierung von undifferenzierten ES-Zellen im Bioreaktor. Die eingesetzten Stammzellen exprimieren als enddifferenzierte Kardiomyozyten einen spezifischen kardialen Marker, das Strukturprotein  $\alpha$ -MHC. An den Promotor dieses kardialen Markers wurde durch transgenetische Modifikation eine Neomycin-Resistenz gekoppelt, so dass nun nach Zugabe des Antibiotikums Geneticin nur Zellen überleben konnten, die  $\alpha$ -MHC und damit gleichzeitig die Resistenz gegen das Antibiotikum exprimierten (Klug et al. 1996). Weiterhin ist die Differenzierung zu diesem Zeitpunkt makroskopisch durch die beginnenden Kontraktionen der Zellverbände zu beobachten (Rogge 2007). Für die Bioreaktor-Methode wurden

die Zellen in 250-500 ml Differenzierungsmedium gegeben und unter ständigem Rühren in Suspension gehalten. Wie auch in der Hängende-Tropfen-Kultur bilden sich EBs aus, die einzelne KM-Kolonien enthalten. In der ersten Studie konnten in einer 250-ml-Rührflasche nach Kultivierung einer KM-selektionierbaren mES-Zell-Linie  $14 \times 10^6$  Zellen gewonnen werden (Zandstra et al. 2003). 2009 konnten unter optimierten Bedingungen in einer 500-ml-Rührflasche während einer 16-tägigen Kultur aus  $50 \times 10^6$  eingesetzten ES-Zellen  $24 \pm 7 \times 10^6$  Kardiomyozyten gewonnen werden. Aus reinen Kardiomyozyten ließen sich jedoch keine EHM gewinnen, sondern erst durch die Zugabe von 25% Nicht-Kardiomyozyten (Christalla 2009). Ein Vorteil dieser Methode für spätere Verwendungszwecke ist die Möglichkeit, die Qualität der Kardiomyozyten überprüfen zu können, bevor sie in den Gewebeverbund gegeben werden. Außerdem kann so eine exakte Kardiomyozytenanzahl eingesetzt werden. Ein Nachteil ist, dass die Zellreifung ohne eine kardiogene Nische erfolgt und vom Umfeld der Entwicklung einer zweidimensionalen EB-Kultur ähnelt. Zusätzlich verursacht jeder Manipulationsschritt in der Weiterverarbeitung Fehlerquellen und erschwert so die Standardisierung des Herstellungsprozesses.

Die andere Möglichkeit ist die Herstellung von EHM aus undifferenzierten ES-Zellen. Die ES-Zellkultur von undifferenzierten ES-Zellen ist innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte so optimiert worden, dass Zellqualität und -quantität sehr gut kalkulierbar und kaum limitiert sind. Dieser Umstand macht die Weiterverarbeitung zu EHM sehr gut plan- und standardisierbar. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei der Herstellung der EHM aus ES-Zellen keine weiteren Zellpopulationen wie z.B. Fibroblasten benötigt werden, wodurch die Umsetzung der Experimente nur von einer Zellquelle abhängt (Rogge 2007). Ein weiterer Aspekt, der hier eine große Bedeutung hat, ist, dass die Differenzierung und der Reifungsprozess der Zellen in einer embryoähnlichen Umgebung stattfinden und daher am ehesten Übereinstimmungen mit der *in vivo*-Entwicklung haben. Zu den entscheidenden Faktoren gehört, dass die Zellen umgeben sind von Kollagen Typ I und nichtkardialen Zellen, die parakrine Mediatoren ausschütten. Weiterhin sind die differenzierenden Zellen einer mechanischen Belastung ausgesetzt, die die



Herzmuskeldehnung durch das Blutvolumen imitiert. Die Auswirkung auf die Qualität des Reifegrads der Kardiomyozyten bleibt zu klären.

## 1.8 Aufgabenstellung

Die heutige klinische Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen ist im Falle einer Myokardschädigung und besonders im Falle einer Herzinsuffizienz nur durch eine Herztransplantation kurativ. Diese Therapieoption kann nur einem sehr geringen Patientenanteil geboten werden, da Angebot und Bedarf weit auseinander klaffen. Im Bereich kardiologischer Grundlagenforschung hat sich daher ein Schwerpunkt im Bereich des *Tissue Engineerings* entwickelt mit dem Ziel der alternativen Herzmuskelgewinnung. Viele Aspekte der Differenzierung zu Kardiomyozyten und der Reifung der Zellen sind noch ungeklärt und müssen identifiziert werden, um die *in vitro*-Generierung von funktionellem und reifem Herzmuskelgewebe zu ermöglichen. *Engineered Heart Muscle* (EHM) aus undifferenzierten murinen embryonalen Stammzellen bieten die Möglichkeit, die Entwicklung im Gewebeverbund zu untersuchen, eventuell essentielle Entwicklungsschritte zu erkennen sowie die Auswirkung von mechanischer Last zu untersuchen. Die Untersuchung der EHM nach Kulturende erfolgte mittels mRNA-Analysen, Histologie und Kontraktionskraftmessungen.

Die These dieser Promotion lautet, dass Änderungen von Vor- und Nachlast zu spezifischen Änderungen von kontraktilem Parametern, Morphologie und Expression kardialer Marker in künstlichen Herzgeweben führen.

Folgende Aspekte sind im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden:

- 1) Optimierung des EHM-Protokolls.
- 2) Beschreibung und Charakterisierung der Herzgewebeentwicklung *in vitro*.
- 3) Rolle der mechanischen Last auf die Herzentwicklung.
- 4) Etablierung von Vor- und Nachlastmodellen.

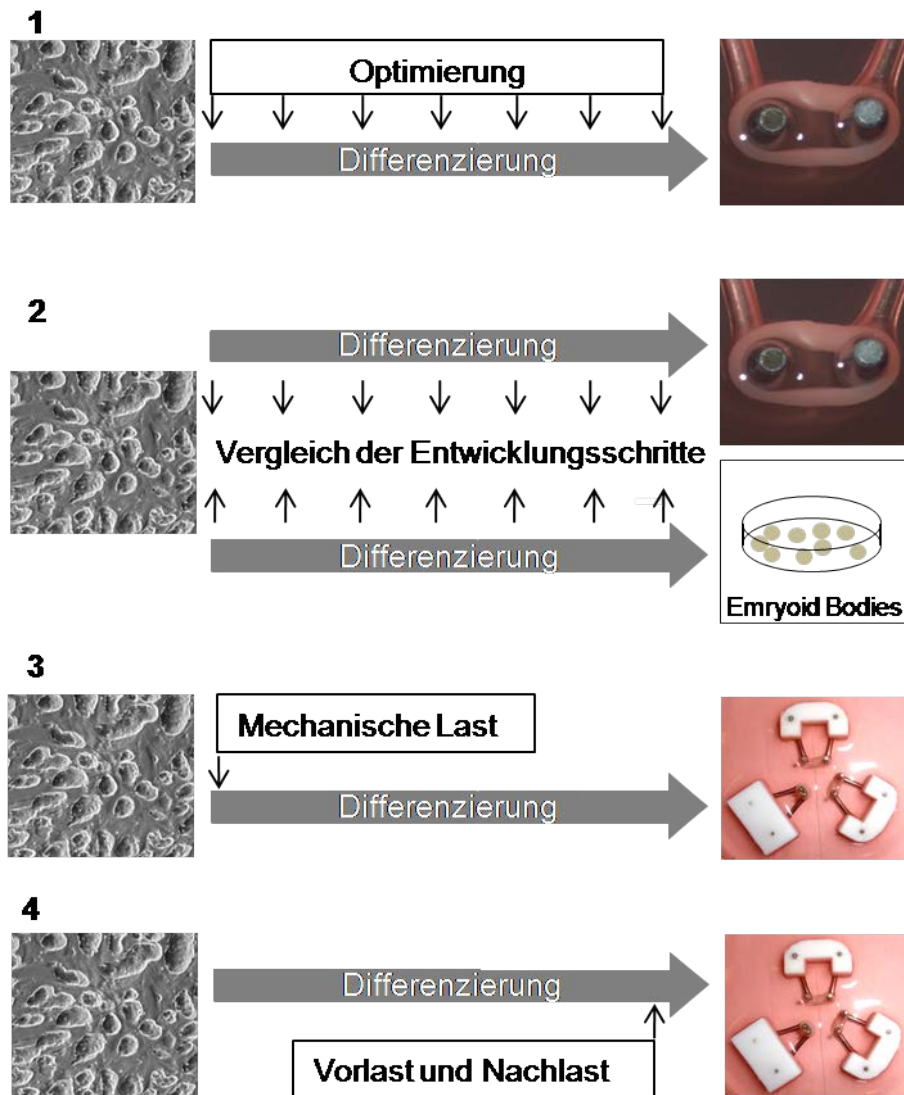


Abb.1: Schematische Darstellung der Aufgabenstellung.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **2.1.1 Embryonale Mausfibroblasten**

Primäre embryonale Fibroblasten der Maus (MEF) wurden unter sterilen Bedingungen aus 13-16 Tage alten Mausembryonen (Stamm: NMRI [*Naval Medical Research Institute*]) präpariert. Hierzu wurde den Embryonen der Kopf abgetrennt, die blutbildenden Organe sowie das Herz entnommen und verworfen. Die restlichen Gewebe wurden in Trypsinlösung (Difco; 0,2% in PBS) mechanisch durch Rühren mit Glaskugeln vereinzelt (35 min, RT). Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an MEF-Medium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (4 min, 4 °C, 1000 x g) und in MEF-Medium resuspendiert.

Die vereinzelt Fibroblasten wurden auf Gewebekulturschalen ausplattiert und mit MEF-Medium kultiviert. Subkonfluente Zellen wurden zweifach nach jeweils 2 bis 4 Tagen im Verhältnis 1:3 geteilt. Hierzu wurden die MEF mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA (0,25%) pro 150-mm-Schale für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Triturieren vereinzelt und anschließend mit dem doppelten Volumen MEF-Medium zur Inaktivierung des Trypsins aufgenommen. Nach Pelletierung der Zellen (4 min, 4 °C, 1000 x g) wurden diese in MEF-Medium resuspendiert und anschließend ausplattiert.

Um eine weitere Zellteilung der MEF zu verhindern, wurden die Zellen für zwei bis drei Stunden mit Mitomycin C (MMC; 10 µg/ml MEF-Medium) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,25%) wurden diese Zellen zunächst vereinzelt und auf mit Gelatine-bezogenen (0,1%) Zellkulturschalen ausgebracht (50.000 MEF/cm<sup>2</sup>). Teilungsinaktivierte Fibroblasten konnten für 5-7 Tage kultiviert werden (37 °C, 7% CO<sub>2</sub>). Alternativ wurden die inaktivierten MEF in Einfriermedium durch Senkung

der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß eingefroren und in flüssigem Stickstoff oder bei -80 °C bis zur späteren Verwendung gelagert.

**MEF-Medium:** DMEM (Gibco #11960044), 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% nicht essentielle Aminosäuren (NEAA), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

**Einfriermedium:** 50% MEF-Medium, 40% FCS, 10% DMSO

### **2.1.2 Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen**

Die transgenen embryonalen Stammzellen der Linie A6 Neo-R besitzen eine Neomycin-Resistenz, die an den  $\alpha$ -MHC-Promotor gekoppelt ist, diese Zelllinie wurde von Rogge 2007 im Rahmen einer Dissertation hergestellt (Rogge 2007). Die undifferenzierten ES-Zellen wurden auf mit Mitomycin C inaktivierten MEF kultiviert (37 °C, 7% CO<sub>2</sub>). Die Zellkulturgefäße (Nunc®; Nunclon Delta) wurden zuvor mit 0,1%iger Gelatinelösung beschichtet. Die subkonfluenten ES-Zellen wurden alle zwei Tage abhängig von der Zelldichte im Verhältnis 1:3 bis 1:8 geteilt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA (0,25%) supplementiert und dann 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Vereinzelung der Zellen wurde durch vorsichtiges Triturieren mit einer Pasteurpipette unter mikroskopischer Kontrolle erreicht. Anschließend wurde der Trypsin-Verdau mit dem doppelten Volumen an Stammzell-Medium gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (4 min, 4 °C, 1000 x g). Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnten die ES-Zellen wieder in SZ-Medium resuspendiert und erneut ausplattiert werden (Verhältnis 1:3-1:8). Der Zellkulturmediumwechsel fand täglich statt.

**SZ-Medium:** DMEM (Gibco #42430025), 15% FCS, 1.000 U/ml LIF, 2 mM L-Glutamin, 1 x NEAA, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1 mM Na<sup>+</sup>-Pyruvat, 1 x Nukleosidmix (30 µM Adenosin, 30 µM Guanosen,

30  $\mu$ M Cytidin, 30  $\mu$ M Uridin, 10  $\mu$ M Thymidin) und  
100  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol

Zum Einfrieren wurden die undifferenzierten Zellen in PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (0,25%) von den MEFs abgelöst. Das Trypsin wurde durch die Zugabe der doppelten Menge an SZ-Medium inaktiviert. Durch Zentrifugation wurden die ES-Zellen pelletiert und mit 4,5 ml SZ-Medium/100 mm Schale resuspendiert. Darauf wurden die Zellen tropfenweise in das eisgekühlte Einfriermedium aufgenommen. Die Temperatur der Zellen wurde mit 1 °C/h in Isopropanol-Einfriergefäßen gesenkt.

Einfriermedium: 50% SZ-Medium, 40% FCS und 10% Dimethylsulfoxid;  
(DMSO)

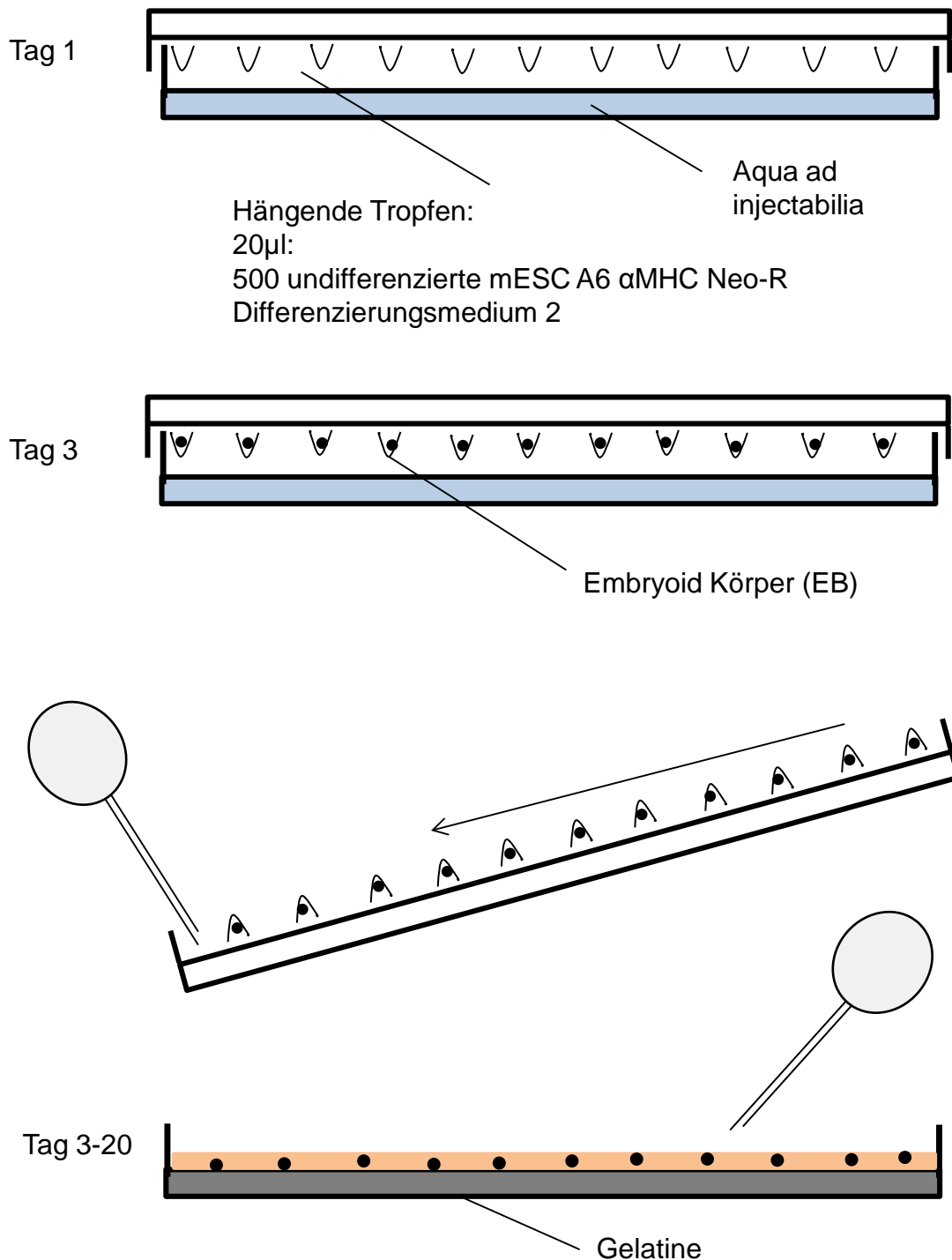
Das Auftauen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war. Dann wurde die Zellsuspension in 9 ml SZ-Medium oder mindestens dem dreifachen Volumen aufgenommen und durch zweimaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 x g, 4 min, 4 °C), das Pellet in 10 ml SZ-Medium resuspendiert und die Zellen anschließend auf inaktivierten MEF in einer 10-cm-Schale ausplattiert.

## **2.2 *In vitro*-Differenzierung**

### **2.2.1 Kultur in hängenden Tropfen**

In den hängenden Tropfen bilden die Stammzellen Embryoid Körper (EB) aus, in denen es zur Ausdifferenzierung der Stammzellen kommt. Hierzu wurden  $625 \times 10^3$  undifferenzierte Stammzellen in 25 ml Differenzierungsmedium 2 resuspendiert und in 20- $\mu$ l-Tropfen mit jeweils 500 Zellen in den Deckel einer 15-cm-Schale ausplattiert. Das Austrocknen der Tropfen wurde durch Hinzugeben von 25 ml Aqua ad injectabilia auf den Boden der Kulturschale verhindert. Nach

drei Kulturtagen konnten die EBs mit 6 ml Differenzierungsmedium 2 gelöst und zur weiteren Kultur auf gelatinierte 10-cm-Schalen überführt werden.



**Abb.2: Embryoid Körper-Kultur.** Die Stammzellen werden drei Tage in hängenden Tropfen kultiviert und dann auf Gelatine ausplattiert.

### 2.2.2 Generierung von *Engineered Heart Muscle*

In autoklavierbare Glaskulturschalen ( $\varnothing$  6 cm) wurden je vier Silikonschläuche ( $\varnothing$  1 mm, etwa 80% Schalenhöhe) eingeklebt. Über diese Schläuche wurden Teflonscheiben ( $\varnothing$  10,6 mm) gestülpt und die Schalen 5 mm hoch mit Silikon aufgegossen. Nach Aushärten des Silikons wurden die Teflonscheiben entfernt, so dass vier Vertiefungen von 10,6 mm Durchmesser mit einem zentralen Docht entstanden. Über die Silikondochte wurden Silikonschläuche mit einem Durchmesser von 4 mm gesetzt, wodurch vier ringförmige Gussformen mit einem Innendurchmesser von 4 mm sowie einem Außendurchmesser von 10,6 mm entstanden. Das Fassungsvermögen betrug  $\sim$  450  $\mu$ l pro Aussparung. Die Kulturschalen wurden ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert.

Die kultivierten embryonalen Stammzellen wurden mit 10 ml PBS gereinigt und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA (0,25%) für 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Hierdurch wurden Zell-Zellkontakte gelöst und durch zusätzliches, vorsichtiges Triturieren mit einer Glaspipette ließen sich die Stammzellen sehr gut vereinzeln. Daraufhin wurden die Zellen durch eine kurze Zentrifugierung pelletiert (4 min, 4 °C, 1000 x g) und das Pellet in 40 ml Stammzellmedium aufgenommen, um die Zellzahl durch Auszählung mit einer Neugebauer Zählkammer bestimmen zu können. Für die Herstellung eines EHM wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Schließlich wurden die Zellen erneut pelletiert und in dem für die Anzahl der EHM benötigten Volumen Differenzierungsmedium resuspendiert und auf Eis gelagert.

Alle zur Herstellung der EHM notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Kollagens zu verhindern. Es wurde immer die gleiche Pipettierreihenfolge eingehalten. Kollagen Typ 1 (eigene Herstellung aus Rattenschwänzen) wurde vorgelegt und volumengleich mit 2x DMEM-Medium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemisches wurde mit NaOH (0,1 N) neutralisiert, was durch einem Farbumschlag von zitronengelb zu rosa kontrolliert werden konnte. Erst nach der Neutralisierung wurden die Zellen dem Kollagengemisch hinzugefügt. Nach gründlichem

Triturieren wurden zügig 450 µl der EHM-Mischung in jede Vertiefung zwischen Silikonwand und Silikonschlauch der autoklavierten Kulturschalen pipettiert. Diese Mischung wurde für eine Stunde bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub> inkubiert, um eine leichte Aushärtung des Kollagen-Zell-Gemisches zu erreichen. Danach war das Gemisch so stark kondensiert und gefestigt, dass 6 ml Differenzierungsmedium pro Kulturschale hinzu gegeben wurden. Der erste Mediumwechsel erfolgte 24 h nach der EHM-Gießung.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHM:

Kollagen Typ 1 (4,5 mg/ml)	392 µl (0,4 mg/EHM)
2x Medium	478 µl
NaOH (0,1 N)	86 µl
Zellsuspension	844 µl

2x Medium: 5 ml 10x-DMEM, 5 ml Pferdeserum, 1 ml CEE, 200 U/ml Penicillin und 200 µg/ml Streptomycin mit Aqua ad injectabilia auf 25 ml aufgefüllt

Differenzierungsmedium: Iscove Medium (Biochrom #F0465), 20% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% NEAA, 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin, 100 µM 2-Mercaptoethanol, 0,55 mM Ascorbinsäure

### 2.2.3 Kultivierung von EHM

Am dritten Tag nach der EHM-Gießung wurden die Geweberinge mit Hilfe von autoklavierten Pinzetten und Pipettenspitzen aus den Gussformen herausgehoben und auf eine statische Dehnungsapparatur (Strecher) überführt. Diese konnten mit den Pipettenspitzen geweitet werden. In dieser Arbeit wurden drei Dehnungszustände mit verschiedenen Belastungszeiten untersucht.



Halterdistanz	Innenumfang
3 mm	10,7 mm
6 mm	16,7 mm
9 mm	22,7 mm

**Tab.1: Dehnungsbedingungen für die Differenzierungskultur und den akuten Belastungsversuch.**

Die Weitung der beiden Metallbügel wurde in dieser Arbeit gezielt variiert. Im folgenden Ergebnissteil wird jedes Protokoll und die dazugehörige Belastungsform vorgestellt. Daher wird an dieser Stelle für die spezielle EHM-Kultur auf Abbildung 5, Abbildung 18, Abbildung 22 und Abbildung 25 verwiesen.

Zur Kultivierung der EHM eigneten sich sehr gut 6-Well-Platten mit einem EHM pro Well. Es wurden 6 ml Differenzierungsmedium dazu gegeben und bis zum Kulturtag 11 fand in zweitägigem Abstand ein Mediumwechsel statt. Ab Kulturtag 11 war die Differenzierung der Stammzellen so weit vorangeschritten, dass mit der Selektion begonnen werden konnte. In der verwendeten Stammzelllinie A6 Neo-R (Rogge 2007) wurde an den  $\alpha$ -MHC-Promoter eine Neomycin-Resistenz gekoppelt. Somit waren alle Zellen, die  $\alpha$ -MHC exprimierten, resistent gegen Geneticin 418. Da  $\alpha$ -MHC ein von Kardiomyozyten spezifisch exprimiertes Strukturprotein ist, konnten mit Hilfe von Geneticin 418 gezielt Kardiomyozyten von Nicht-KM selektioniert werden (Abbildung 3).

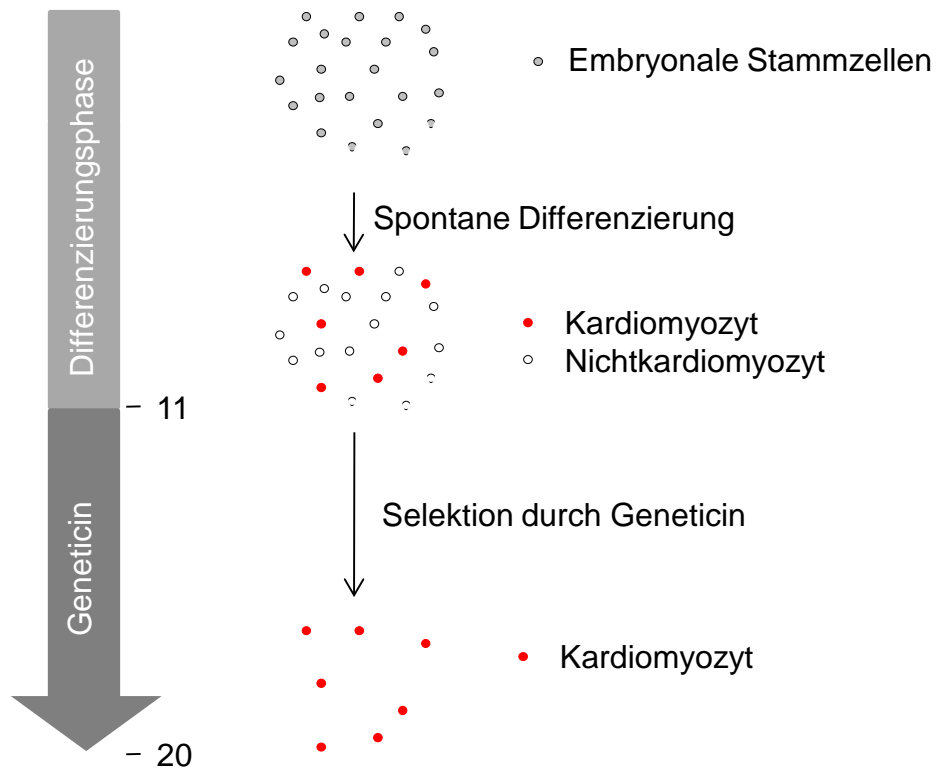
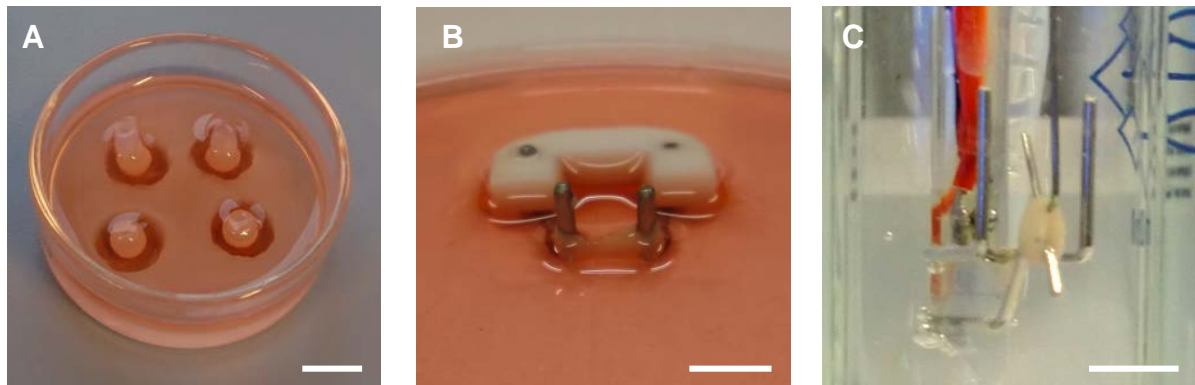


Abb.3: Positivselektion von  $\alpha$ -MHC Neo-R Kardiomyozyten.

Geneticin wurde dem Differenzierungsmedium in einer Konzentration von 200 $\mu$ l/ml beigemischt. Das Medium wurde ab Tag 11 im dreitägigen Abstand gewechselt. An Tag 20 der Kultivierung konnten die EHM entweder in flüssigem Stickstoff für weitere Analysen weggefroren oder zur isometrischen Kontraktionsmessung verwendet werden.

### 2.3 Isometrische Kontraktionskraftmessung

Die Kontraktionskraft wurde an Kulturtag 20 der EHM-Kultivierung gemessen. Hierfür wurden die EHM von der Halteapparatur gelöst und mit Hilfe zweier Pipettenspitzen auf die Kontraktionskraftmessanlage überführt und eingespannt. (Abbildung 4C)



**Abb.4: EHM im Kulturverlauf.** A: EHM in der Gußform Kulturtag 1-3. B: EHM auf der Dehnungsvorrichtung Kulturtag 3-20. C: EHM eingespannt in der isometrischen Kontraktionskraftmessanlage. Maßstab A,C: 1 cm; B: 0,5 cm

Die EHM befanden sich während der Messung in einer temperierten (37 °C) Tyrodelösung (0,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) bei pH 7,4, der durch die Begasung mit Carbogen (95%  $\text{CO}_2$ , 5%  $\text{O}_2$ ) erreicht wurde. In der Äquilibrationsphase (20 Minuten) wurde mit der Stimulation (4 Hz, 30 mA, 5 ms Pulsbreite) begonnen. Um die Kontraktionskraft optimal messen zu können, wurden die EHM bis zu einem stabilen Kraftniveau vorgedehnt. Die Kontraktionskraft wurde durch eine Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelt, beginnend mit 0,2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und steigend bis zu einem Maximum von 2,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Um eine ausreichende Adaption an die jeweilige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu gewährleisten, fanden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Interventionen im definierten Zeitabstand statt.

Die Erfassung der Daten erfolgte über ein PC-gestütztes Biomonitoring-System (BMON, Ingenieurbüro G. Jäckel, Hanau). Die Messverstärker wurden vor jeder Messung kalibriert. Die Ausgabe der minimalen und maximalen Kraft erfolgte durch die Messsoftware als Mittelwert einer Sekunde. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler Kraft und der Grundspannung (minimale Kraft) errechnet. Nach dem Experiment wurden die EHM in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tyrode-Lösung:                    119,8 mM NaCl,     5,4 mM KCl,     0,2-2,8 mM  $\text{CaCl}_2$ ,  
    1,05 mM  $\text{MgCl}_2$ , 22,6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 0,42 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  
    5,05 mM Glucose,            0,05 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$             und  
    0,28 mM Ascorbinsäure

## 2.4 Molekularbiologische Analysen

### 2.4.1 Isolierung von RNA aus EHM

Gesamt-RNA aus EB- und EHM-Kulturen wurde mittels TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) isoliert. Die EHM wurden mit Hilfe des Tissue-Lysers (Qiagen) in 600 µl TRIzol<sup>®</sup> homogenisiert, mit 120 µl Chloroform vermischt und für 15 sec geschüttelt (Vortex, Peqlab). Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei Raumtemperatur (RT) wurden die Proben zur Beschleunigung der Phasenauffrennung zentrifugiert (15 min, 4 °C, 12.000 x g). Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 300 µl Isopropanol versetzt, kurz geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA pelletiert (10 min, 4 °C, 12.000 x g) und in 600 µl 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 7.500 x g) erfolgte die Trocknung des RNA-Pellets (5-10 min bei RT). Das RNA-Pellet wurde je nach Größe in 10-20 µl DEPC-Wasser (0,1% SDS in H<sub>2</sub>O) gelöst und 10 min bei 56 °C zur Lösung von RNA-Doppelsträngen erwärmt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt (Nano-Drop, Thermo-Scientific). Die RNA-Qualität wurde durch das Verhältnis von 260 nm/280 nm bestimmt und hatte einen durchschnittlich Wert von 1,8-2,0. Eine optische Dichte (OD) von 1 entsprach einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

### 2.4.2 Reverse Transkription

1 µg RNA wurde mittels Reverser Transkriptase (RT) und unter Verwendung von Oligo(dt)-Primern in cDNA umgeschrieben. Da nur mRNA-Moleküle umgeschrieben werden sollten, wurden Oligo(dt)-Primer verwendet, die gezielt den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Pipettierschritte wurden gemäß der Herstellerangaben des *SuperScript II RNase H Reverse Transkriptase Kits* (Invitrogen) angewendet. Die cDNA wurde in *Diethylpyrocarbonated* (DEPC)-Wasser verdünnt (1:5) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.4.3 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer PCR mit einem ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit wurde mittels SYBR-Green<sup>®</sup> Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green<sup>®</sup>, Applied Biosystems) durchgeführt.

Das Prinzip der SYBR-Green-PCR basiert auf einem sequenzunspezifischen Einbau des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green<sup>®</sup> in den DNA-Doppelstrang während der DNA-Amplifikation. Es erfolgte die Messung der Fluoreszenzzunahme mit jedem PCR-Zyklus. Im Anschluss an einen SYBR-Green-PCR-Lauf wurde immer eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen. Dabei können durch einen graduellen Temperaturanstieg unspezifische Produkte wie Primerdimere und DNA-Kontaminationen in den Proben festgestellt werden.

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Calsequestrin (Casq2) wurden als interner Standard verwendet. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des *SYBR-Green PCR-Master Mix* (Applied Biosystems). Die verwendeten Primersequenzen und das verwendete PCR-Programm sind im Anhang in Tab.1 aufgeführt. Alle Messungen wurde als Dreifachbestimmung mit der ABI PRISM 7900HT *Sequence Detection System Software*, Version 2.1.2 analysiert. Die mRNA-Menge wurde über den Verleich der relativen Ct-Werte unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt (Livak und Schmittgen 2001). Dafür wurden die Casq2- oder GAPDH-Ct-Werte von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert ( $\Delta Ct$ ). Der Mittelwert der  $\Delta Ct$ -Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen Ct-Wert abgezogen, wodurch  $\Delta\Delta Ct$ -Werte entstanden. Nach Aufhebung des natürlichen Logarithmus ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) konnte die relative Änderung der Transkriptionskonzentration bezogen auf die Kontrollgruppe dargestellt werden.

## 2.5 Histologische Untersuchung

### 2.5.1 Immunfluoreszenz

Die EHM wurden nach Beendigung der Kultivierung in PBS gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 4%iger Formaldehydlösung (FA; pH 7,4) fixiert. Die fixierten Gewebe wurden einen Tag mit Tris-Puffer (1xTBS) gewaschen und über Nacht in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der nachfolgenden Antikörperfärbung zu vermeiden. Am darauf folgenden Tag wurden die EHM erneut mit TBS gewaschen und dann erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für drei Tage (bei 4 °C). Nach ganztägigem Waschen mit TBS wurden dann die entsprechenden sekundären Antikörper über Nacht dazugegeben. Zuletzt wurden die EHM für zwei Tage bei 4 °C und unter ständiger Bewegung mit TBS gewaschen. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die EHM auf Objektträgern mit Mowiol 4-88 (Hoechst) eingedeckelt. Verwendete primäre und sekundäre Antikörper sowie deren eingesetzte Konzentration sind im Anhang Tab.2 aufgeführt. Die Zellkerne wurden mittels 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1 µg/ml) angefärbt. Die morphologischen Untersuchungen erfolgten per konfokaler Laserscanningmikroskopie.

10xTBS-Puffer: 0,05 M Trishydroxymethylaminmethan *ultra pure* (TBS),  
0,15 M NaCl, pH 7,4 eingestellt mit HCl

Blocklösung: 10% Ziegenserum, 1% BSA, 0,5% Triton X-100 in TBS

## 2.6 Statistische Auswertung

Die Daten werden als arithmetischer Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) präsentiert. Mit „n“ wurde die Anzahl der Tiere bzw. Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem Student t-Test

für unverbundene Stichproben ermittelt. Bei direktem Vergleich von mehr als zwei Versuchsgruppen wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA gefolgt von einem Dunnett oder Tukey *post-hoc* Test durchgeführt. Alle Analysen wurden mit der *GraphPad Software* durchgeführt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurden als signifikant angenommen.

## 2.7 Materialien

Substanzen:

- Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn
- Ascorbinsäure, Merck, Deutschland
- Bovie Serumalbumin (BSA), Sigma Chemical Co., USA
- Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ), Merck, Deutschland
- Carbogengas (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), Linde AG, Deutschland
- Chicken embryo extract, Hühnerembryonenextrakt, CEE, eigene Herstellung
- Chloroform, Merck, Deutschland
- 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), Sigma, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deutschland
- DMEM, Gibco-BRL, Deutschland
- D-PBS, Gibco, Deutschland
- Ethanol, Apotheke Roth, Deutschland
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; Titriplex<sup>®</sup> III, Merck, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FCS), PAA, Deutschland
- Formalin Solution Roti Histofix 4%, Carl Roth, Deutschland
- Gelatine, Sigma, Deutschland
- Geneticinsulfat (G418), Gibco, Deutschland
- Glucose, Merck, Deutschland

- Glutamin (100x=200 mM), Gibco, Deutschland
- Hydrochlorid (HCL), Merck, Deutschland
- Iscove Medium, Biochrom
- ( $\pm$ )-Isoprenalin-HCL, Sigma Deutschland
- Isopropanol, Merck, Deutschland
- Insulin-Transferrin-Selen (ITS+1), Sigma, Deutschland
- Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Merck, Deutschland
- Leukemia Inhibitory Factor (LIF),  $10^7$  U/ml, Esgro Chemicon, Deutschland
- Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ), Merck, Deutschland
- Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ ), Merck, Detuschland
- Methanol, Merck, Deutschland
- MEM, non-essential amino acids, Gibco, Deutschland
- 2-Mercaptoethanol, Gibco, Deutschland
- Mitomycin C, Sigma, Deutschland
- Mowiol 4-88, Calbiochem, Deutschland
- Natriumpyruvat, Gibco, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (100x;P/S), Gibco-BRL, Deutschland
- Pferdeserum, Gibco-BRL, Detuschland
- *SuperScript<sup>®</sup> II Rnase H Reverse Transkriptase Kit*, Invitrogen, Deutschland
- *SYBR-Green<sup>®</sup> PCR-Master Mix*, Applied Biosystems, Deutschland
- Tirjodthyronin, Sigma, Deutschland
- Triton X-100, Fluka, Deutschland
- Trizol<sup>®</sup>, Invitrogen, Deutschland
- Trypsin/EDTA, Gibco, Deutschland

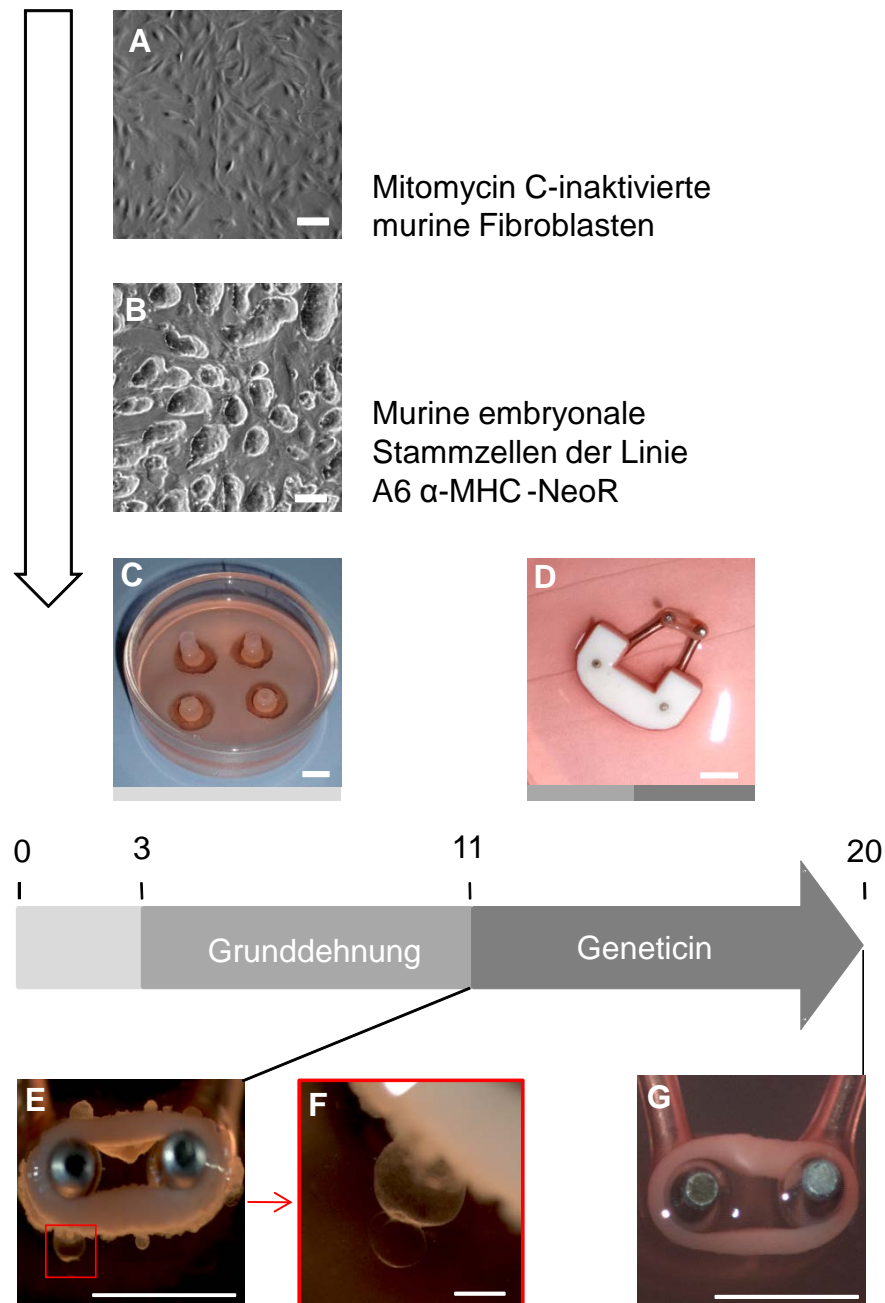


### **3 Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ca. 700 *Engineered Heart Muscle* (EHM) aus murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) hergestellt. Mit einer Kulturschale von 10 cm Durchmesser können im Durchschnitt 10 EHM mit jeweils  $1,5 \times 10^6$  Zellen hergestellt werden. Zur Untersuchung lastinduzierter physiologischer und pathologischer Herzmuskelentwicklung musste zunächst das Protokoll optimiert und die Entwicklung und Kardiogenese im EHM untersucht werden.

#### **3.1 Optimierung der *Engineered Heart Muscle***

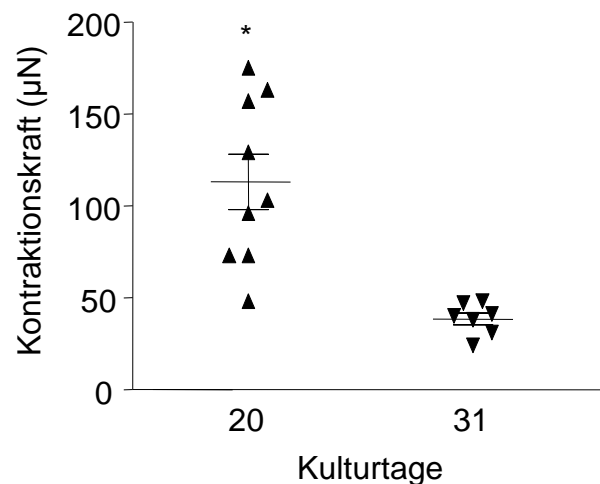
Für diese Arbeit wurde ein *Engineered Heart Muscle* Protokoll wie in Abbildung 5 dargestellt verwendet. Die Zellkultur und Generierung der Zelllinie mES A6  $\alpha$ -MHC-NeoR sowie die myokardiale Selektion im EHM-Modell basierten auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Rogge 2007). Modifikationen zu den Vorarbeiten waren die Herstellung der EHM ohne die Zugabe von Engelbreth-Holm-Swarm Tumor Matrix (Matrigel®) zur extrazellulären Matrix (EZM), die Supplementierung des Mediums und die zeitliche Abfolge des Mediumwechsels. Orientierende Versuche der Arbeitsgruppe zeigten bereits gut kondensierende und schlagende EHM ohne Matrigel®-Zugabe und die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten EHM zeigten im historischen Vergleich keine Änderung der EHM-Entwicklung oder funktionelle Verluste. Die Testung der jeweiligen Supplemente (Ascorbinsäure und Insulin, Transferrin, Selen und Trijodthyronin (T3)) erfolgte in Co-Kultur ohne die jeweils andere Testsubstanz. Der Erfolg wurde zunächst mit Hilfe von Kontraktionskraftmessungen ermittelt.



**Abb.5:Protokoll der Generierung von *Engineered Heart Muscle* aus A6  $\alpha$ -MHC NeoR Stammzellen** . Zunächst erfolgte die Plattierung von Mitomycin C-inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten (A). Dann konnten die ES-Zellen ausgesiedelt und unter Erhalt der Pluripotenz vermehrt werden (B). Nach der ausreichenden Vermehrung erfolgte die Herstellung von EHM aus den pluripotenten Stammzellen in den Gussformen (C). Es folgte die 3-tägige Kondensationsphase und die anschließende Überführung auf die Dehnungsapparaturen (Beladung; D) An Kulturtag 11 wurde die Positivselektion mit Geneticin begonnen. EHM vor Selektionsbeginn mit Zystenbildung und nach abgeschlossener Selektion an Kulturtag 20 (E-G). Maßstab: A,B: 80  $\mu$ m; C,D,E,G: 5 mm; F: 500  $\mu$ m

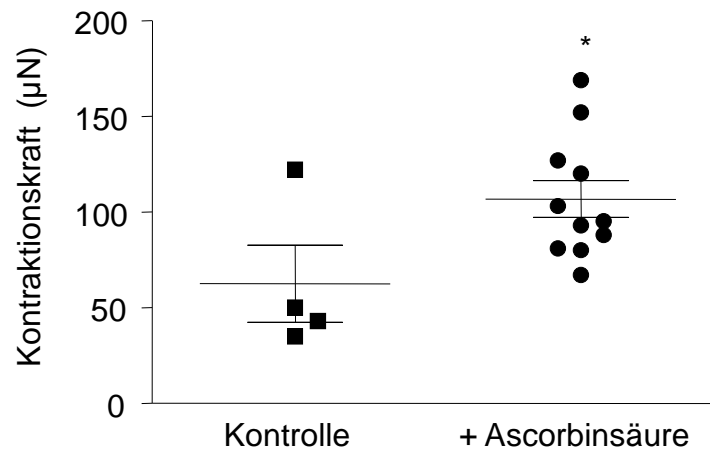
Die Herstellung und die Kultur von *Engineered Heart Muscle* erfolgte nach erfolgreicher mES-Zellkultur unter Zugabe eines Kollagen Typ 1-Hydrogels, eines

Nährmediums und Natronlauge zur Neutralisierung der sauren Kollagensuspension (0,1% Essigsäure). Das Gemisch wurde zügig in die Gusschalen gegeben, bereits nach einer Stunde zeigte sich eine leichte Kondensation des Zellgemisches. Im Verlauf der folgenden drei Tage kondensierten die EHM zu einem Gewebering, der dem zentralen Silikonröhrchen anlag. Nach drei Tagen war das Gewebe ausreichend verdichtet und konnte auf die Platzhalter mit Dehnungsvorrichtung übertragen werden. Die Differenzierung der Stammzellen konnte an Hand der Zystenbildung beobachtet und beurteilt werden (Abbildung 5, Bild: E, F). Ab Kulturtag 11 zeigten sich erste lokale Kontraktionen. Mit der mikroskopisch gesicherten Differenzierung zu Kardiomyozyten wurde dann ab dem elften Kulturtag die Selektion der Kardiomyozyten begonnen. Der Erfolg der Selektion ließ sich an Hand der Ablösung der Zysten verfolgen (Abbildung 5, G). In den Vorarbeiten zeigten sich erste kohärente Kontraktionen nach 31 Kulturtagen, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten EHM zeigten nach 20 Kulturtagen kohärente Kontraktionen. Daher wurden hier bereits Kontraktionskraftmessungen durchgeführt. Die Kultur wurde anschließend auf 20 Kulturtage verkürzt, da es zu einem Kraftverlust von 63% nach weiteren 11 Kulturtagen (31) kam (Abbildung 6)



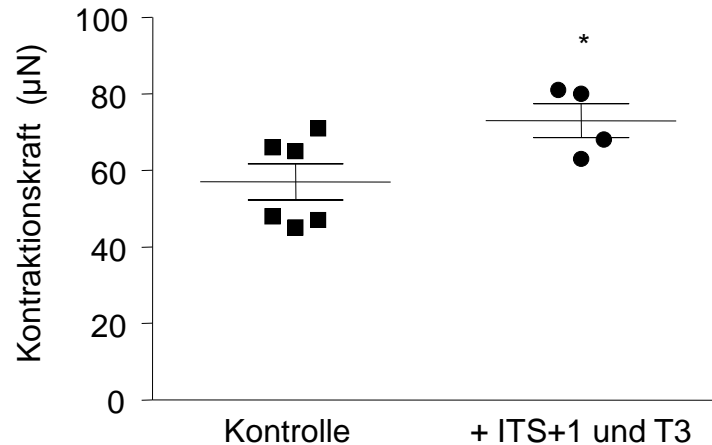
**Abb.6: Maximale Kontraktionskraft von EHM nach 20 und 31 Kulturtagen.** Die EHM-Kultur erfolgte für 20 und 31 Tage und wurde mit Ascorbinsäure (0,55 mM) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Kontraktionskraftmessung unter isometrischen Bedingungen bei 37°C und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. Auf der Ordinate ist die isometrische Kontraktionskraft in µN dargestellt. Die Abszisse bezeichnet die Versuchsgruppen (Kulturtag 20: n=9; Kulturtag 31: n=7). \*p<0,05 vs. Kulturtag 31 (zweiseitiger t-Test; unverbundene Stichproben)

Die Kultur der Kardiomyozyten wurde in diesem Protokoll leicht modifiziert, da statt des wöchentlichen Wechsels des Nährmediums nun ein Wechsel bei jeder Zugabe von Geneticin in einem dreitägigen Abstand erfolgte. Auch vor Beginn der Selektion an Kulturtag 11 erfolgte ein zweitägiger Wechsel des Mediums im Gegensatz zum wöchentlichen Mediumwechsel. Weiterhin erfolgte die Optimierung des Differenzierungsmediums. Bereits in der zweidimensionalen *Embryoid Body*-Kultur konnte gezeigt werden, dass es bei Zugabe von Ascorbinsäure (AS, Vitamin C) zum Kulturmedium zu einer signifikanten Anreicherung von Kardiomyozyten kam (Takahashi et al. 2003). Analog dazu zeigten mit Ascorbinsäure kultivierte EHM eine signifikante Kontraktionskraftsteigerung von 42% gegenüber den EHM, die in Ascorbinsäure-freiem Medium kultiviert wurden (Abbildung 7).



**Abb.7: Maximale Kontraktionskraft von EHM nach Kultur mit und ohne Ascorbinsäure.** EHM-Kulturen wurden für 20 Tage mit oder ohne Ascorbinsäure (0,55 mM) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Kontraktionskraftmessung unter isometrischen Bedingungen bei 37°C und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. Auf der Ordinate ist die isometrische Kontraktionskraft in µN dargestellt. Die Abszisse bezeichnet die Versuchsgruppen (Kontrolle: n=4; Ascorbinsäure: n=11). \*p<0,05 vs. Kontrolle (zweiseitiger t-Test; unverbundene Stichproben)

Vorarbeiten haben gezeigt, dass auch die Zugabe von Insulin, Transferrin, Selen, Linolensäure und Albumin in 1%iger Konzentration (ITS + 1) und des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin (T3) die Kontraktionskraft von murinen EHM verbessert (Armbrüster 2008). Analog zeigte sich im EHM-Modell aus embryonalen Stammzellen, dass die Supplementierung mit ITS + 1 und T3 zu einer Steigerung der Kontraktionskraft der EHM von 22% führte (Abbildung 8).



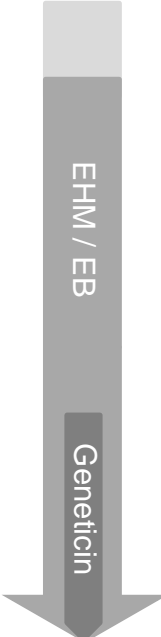
**Abb.8: Maximale Kontraktionskraft von EHM nach Kultur mit und ohne ITS+1/T3.** EHM-Kulturen wurden für 20 Tage mit oder ohne Zugabe von 1% ITS+1 (Insulin: 10 µg/ml, Transferrin: 5,5 µg/ml, Selen: 5 ng/ml, 0,5 mg/ml Albumin, 4,7 µg/ml Linolensäure) und T3 (1 nM) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Kontraktionskraftmessung unter isometrischen Bedingungen bei 37 °C und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. Auf der Ordinate ist die isometrische Kontraktionskraft in µN dargestellt. Die Abszisse bezeichnet die Versuchsgruppen (Kontrolle: n=6; ITS + 1 und T3: n=4). \*p<0,05 vs. Kontrolle (zweiseitiger t-Test, unverbundene Stichproben).

Alle weiteren EHM-Kulturen wurden aufgrund der deutlichen Kraftsteigerung unter der Zugabe von Ascorbinsäure mit dieser durchgeführt. Auf die zusätzliche Supplementierung mit ITS + 1 und T3 wurde aufgrund des geringen Effekts im Vergleich zu Ascorbinsäure verzichtet.

### 3.2 Charakterisierung der Entwicklung im 2D- (EB) und 3D- (EHM) Modell

Die Entwicklung der Kardiomyozyten im EHM wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend untersucht. Die Aufschlüsselung der transkriptionellen, histologischen und funktionellen Entwicklung wurde nach dem o.g. Protokoll durchgeführt. Um eine Parallele zu den Vorarbeiten von Rogge ziehen zu können, wurden zusätzliche EHM (n=7) für die funktionelle Analyse ebenfalls 31 Tage lang kultiviert. Für die besser Vergleichbarkeit der analysierten Entwicklungsschritte erfolgte eine parallel laufende Kultur von murinen embryonalen Stammzellen in einer zweidimensionalen Kulturform, den *Embryoid Bodies* (EB). Die murinen Stammzellen wurden zunächst für 3 Tage in hängenden Tropfen kultiviert und bildeten in dieser Phase die *Embryoid Bodies* (Abbildung 2). Boheler et al. zeigten,

dass die in einer EB-Kultur differenzierten *in vitro*-Kardiomyozyten während der Entwicklung bezüglich des Transkriptionsprofils eine große Ähnlichkeit mit den *in vivo*-differenzierten Kardiomyozyten aufwiesen (Boheler, et al. 2002). Anders als in den Versuchen von Boheler wurden die EBs hier nach der 3-tägigen Kultur in den hängenden Tropfen nicht für weitere 3-5 Tage in eine Suspensionskultur gegeben, sondern direkt auf Gelatine-bezogene Kulturschalen ausplattiert. Daraufhin wurden sie adhärent und für weitere 17 Tage kultiviert. Auf diese Weise fand die Manipulation der Zellen zum gleichen Zeitpunkt mit denen im EHM statt. Die Kultur und Kulturzeit konnte durch dieses Vorgehen unter den gleichen Bedingungen erfolgen.



Kulturtag	Entwicklungsschritt
0	Stammzellkultur
3	EB-Kultur: Ende der hängenden Tropfen-Phase, Ausplattierung EHM-Kultur: Abschluss der Kondensierungsphase, Überführung auf die Halteapparaturen
6	EB-Kultur: kontrahierende EBs EHM-Kultur: Zystenbildung
9	Fortschritt der Differenzierung
11	Beginn der Selektion von Kardiomyozyten
16	EHM-Kultur: Erste kontrahierende EHM
20	Kulturende

Tab.2: Auflistung der relevanten Entwicklungsschritte.

### 3.2.1 Entwicklungsrelevante Transkripte im Differenzierungsverlauf

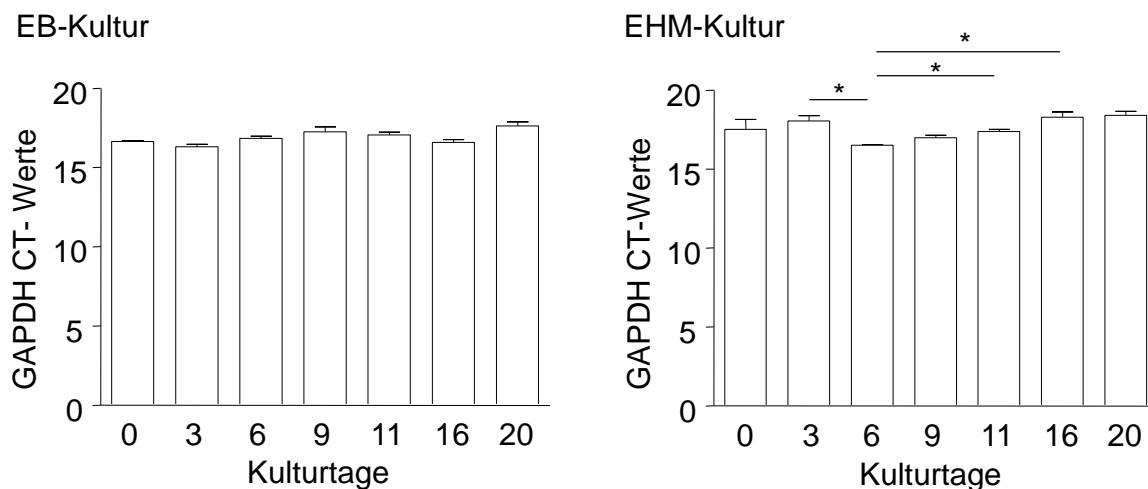
Die Entwicklung der Gewebe kann zum Beispiel auf der Ebene der Transkripte beobachtet werden. Hierfür ist eine enge zeitliche Verknüpfung der Probenentnahme zu den relevanten Entwicklungsschritten entscheidend. Daher erfolgte an 7 Tagen der Entwicklung, wie in Tabelle 2 (s.o.) erläutert, die

Probenentnahme (n=4). Diese Proben wurden auf die Marker Oct-3/4, Brachyury, Nkx2.5 und  $\alpha$ -MHC untersucht.

Oct-3/4	Stammzellmarker im Blastozystenstadium
Brachyury	Mesodermaler Marker
Nkx2.5	Frühkardialer Marker
$\alpha$ -MHC	Kardiales Strukturprotein

**Tab.3: Auflistung der entwicklungsrelevanten Marker und deren spezifische Zugehörigkeit.**

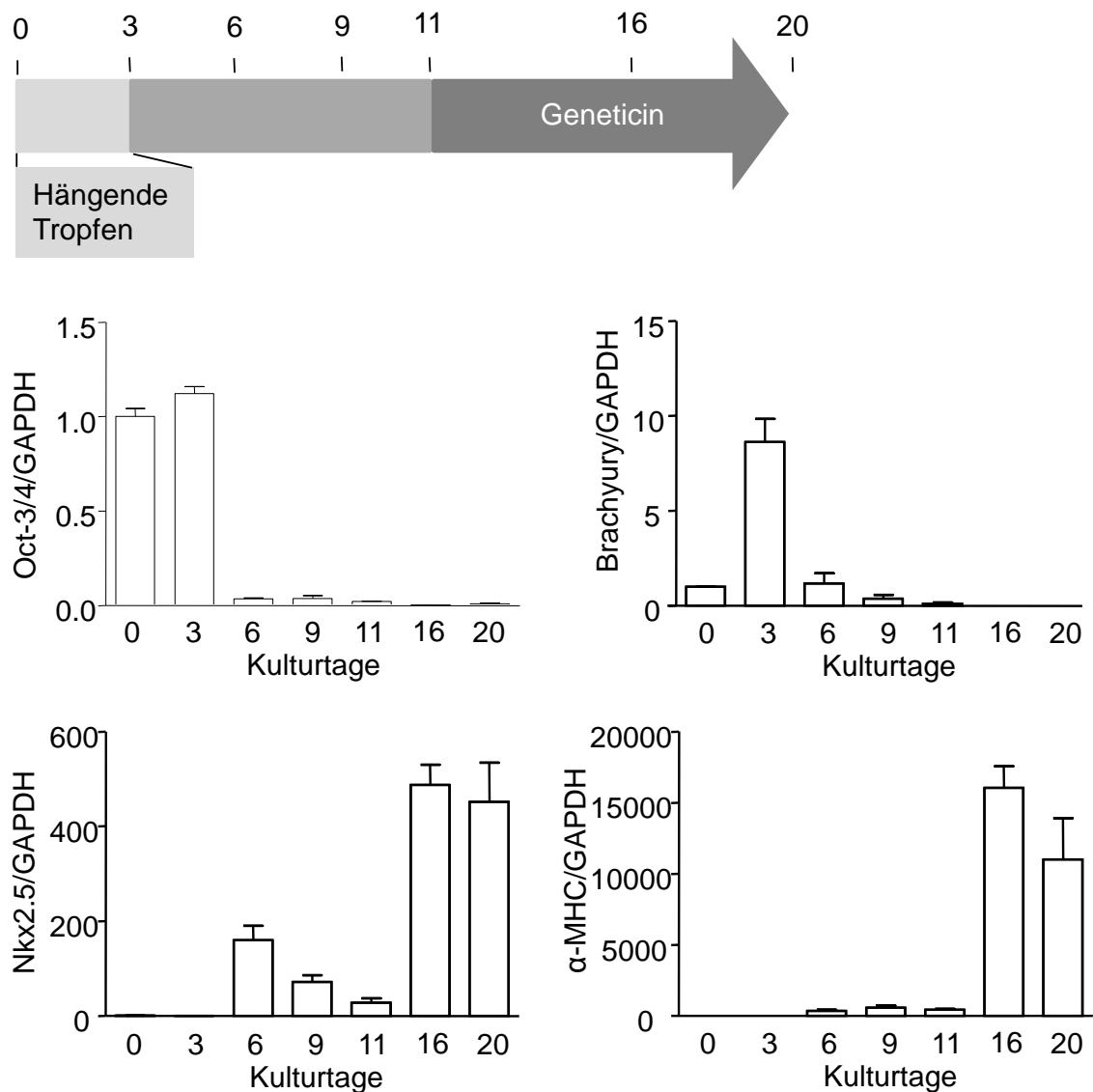
Zur Auswertung der Transkription wurden alle Marker auf die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert (Abbildung 9). Diese unterliegt kaum entwicklungsbiologischen Schwankungen und gilt daher als günstiges Referenzgen zur Standardisierung von mRNA-Expressionsanalysen (Murphy und Polak 2002).



**Abb.9: Transkription von GAPDH im 2D- und 3D-Entwicklungsverlauf.** Auf den Ordinaten sind die Schwellenwertzyklen (CT) der Fluoreszenzmessung für die GAPDH aufgetragen. Auf den Abszissen sind die Kulturstage aufgetragen (n=4/Zeitpunkt),  $p < 0.05$  3 vs. 6, 6 vs. 16, und 20; (ANOVA mit post hoc Test nach Bonferroni).

### 3.2.1.1 Transkription in der EB-Kultur

Die Proben des Kulturtages 0 entstammen dem Stammzellpool, der am selben Tag zur Herstellung von EHM und den hängenden Tropfen verwendet wurde. Daher sind die Ausgangswerte der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion für die beiden folgenden Abbildungen an Kulturtag 0 die Gleichen (Abbildung 10,11).



**Abb.10: Transkription entwicklungsrelevanter Marker im EB-Modell.** Der Pfeil zeigt den Zeitverlauf und die Tage der Probengewinnung auf. Die Proben an Kulturtag 0 wurden aus undifferenzierten Stammzellen vor Beginn der hängenden Tropfen-Kultur gewonnen. Dargestellt sind alle Marker normalisiert auf GAPDH, (n=4/Zeitpunkt)

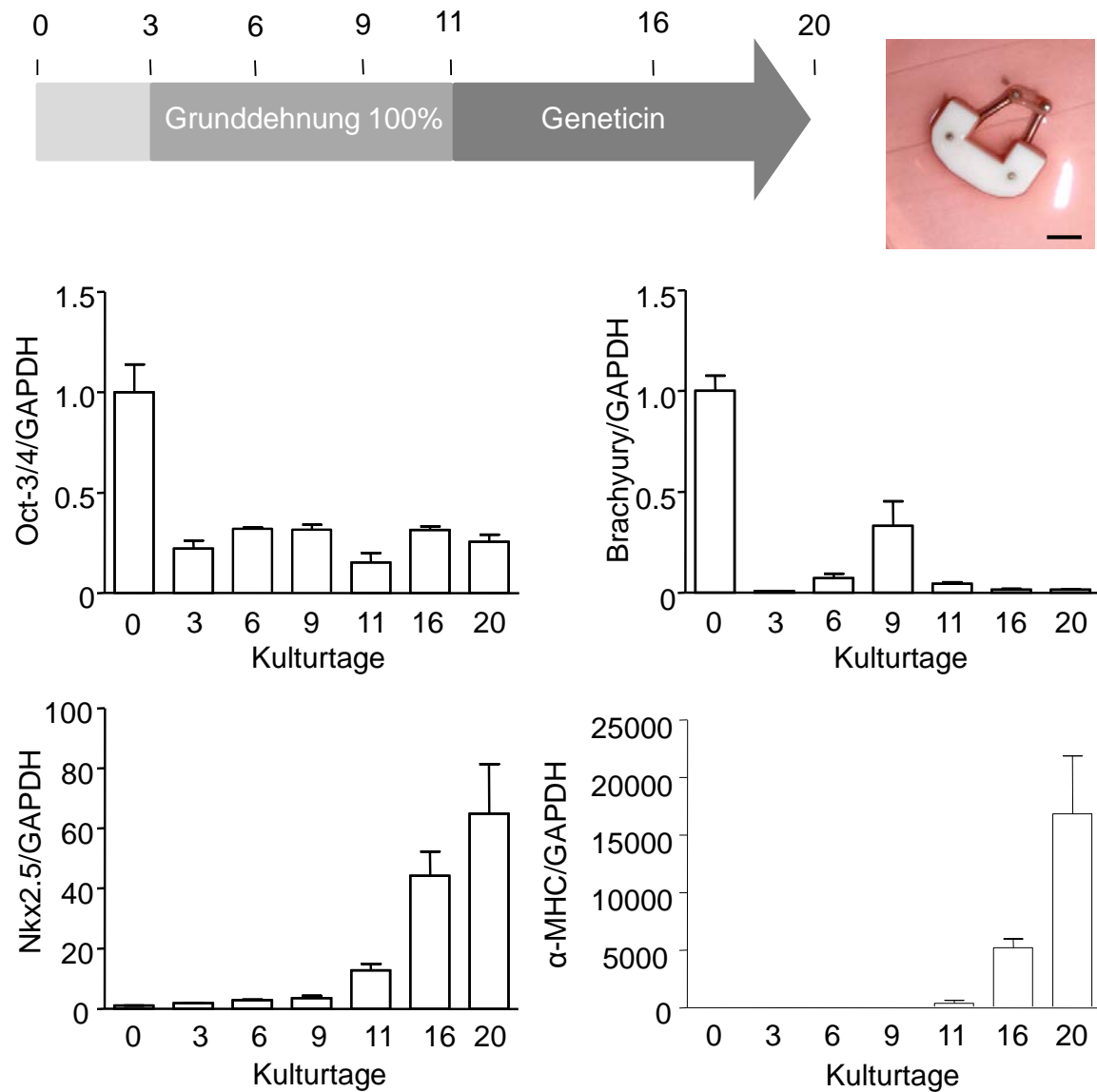
Die Transkription des Stammzellmarkers Oct-3/4 reduzierte sich zu Beginn der Differenzierung und nahm mit fortlaufender Kultur ab. Das Transkriptionsmaximum



von Brachyury zeigte sich am Kulturtag 3. Nkx2.5. zeigte zunächst eine transiente Mehrexpression mit einem Gipfel an Kulturtag 6 sowie einen erneuten Anstieg mit einem Maximalwert ab Kulturtag 16.  $\alpha$ -MHC war ab Kulturtag 6 nachweisbar mit einem starken Anstieg nach Selektionsbeginn (Kulturtag 16).

### 3.2.1.2 Transkription in der EHM-Kultur

Die gleiche Untersuchung erfolgte für das EHM-Modell. Wie auch im EB-Modell nahm die Oct-3/4-Transkription an Kulturtag 3 auf ein Viertel der reinen Stammzellkultur (Kulturtag 0) ab, wurde jedoch bis zum Ende der Untersuchung auf einem messbaren Niveau transkribiert. Brachyury war im Vergleich zur 2D-Kultur in EHM deutlich niedriger exprimiert, mit einem transienten Gipfel aus allerdings niedrigem Expressionsniveau an Kulturtag 9. Der frühkardiale Marker Nkx2.5 wies eine gleichmäßig geringe Transkription bis Kulturtag 9 auf und stieg ab Kulturtag 11 rapide an. Einer ähnlichen Entwicklung folgte die Transkription von  $\alpha$ -MHC, hier allerdings wurde die größte Zunahme einen Zeitabschnitt später (Kulturtag 16) gemessen. In ihrem Verlauf zeigten die Transkriptionsprofile der EB- und EHM-Kultur starke Ähnlichkeiten.



**Abb. 11: Transkription entwicklungsrelevanter Marker im EHM-Modell.** Der Pfeil zeigt den Zeitverlauf und den Zeitpunkt der Probengewinnung. Die Proben an Kulturtag 0 wurden aus undifferenzierten Stammzellen vor Beginn der EHM-Herstellung gewonnen. Alle Marker wurden auf GAPDH normalisiert. (n=4/Zeitpunkt, Maßstab: 5 mm)

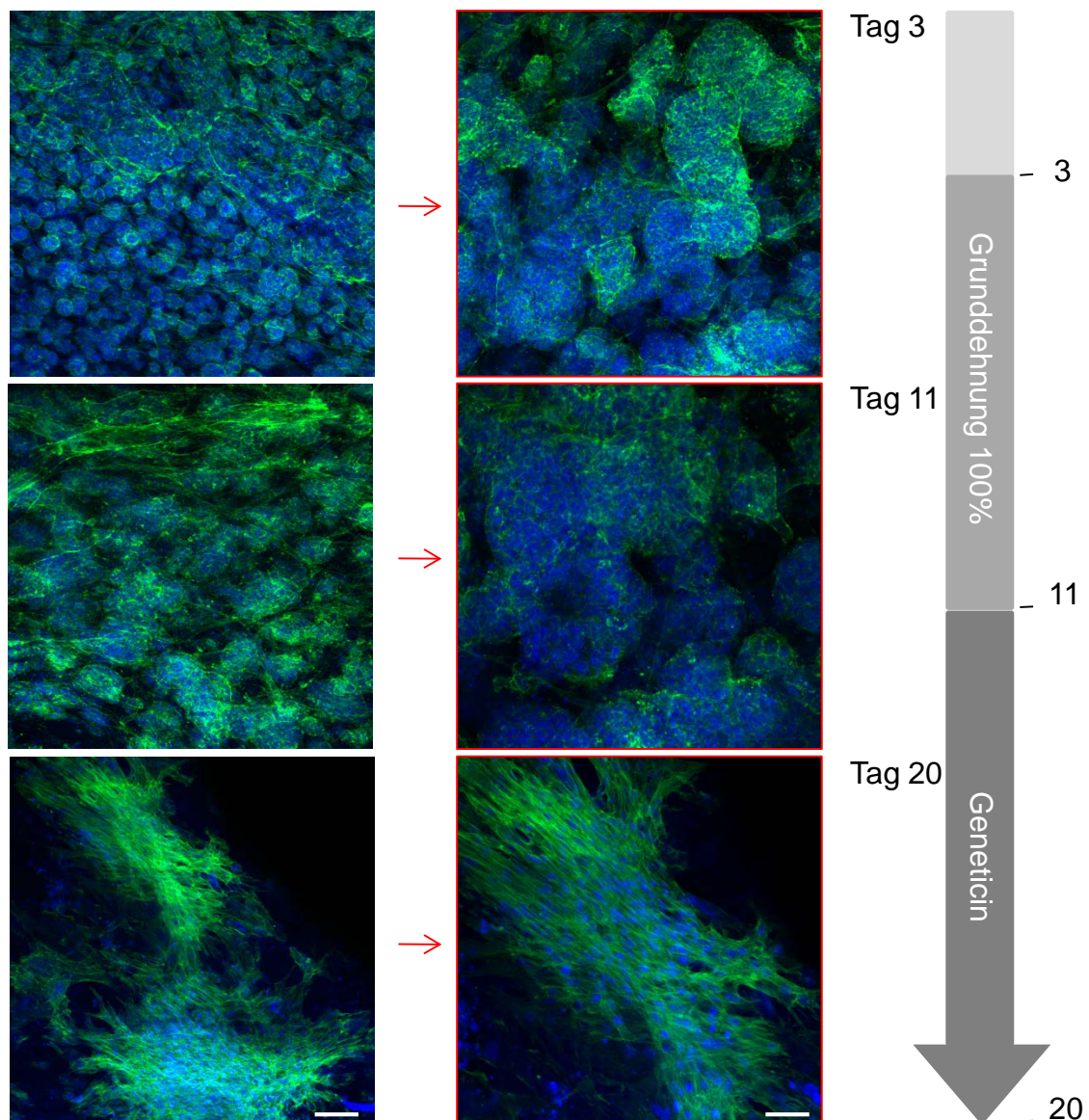
### 3.2.2 Histologischer Nachweis der Entwicklung im EHM

Für die Untersuchung der histologischen Entwicklung wurden Proben aus dem Pool der Stichtage vor folgenden Interventionen gewählt (Tabelle 4).

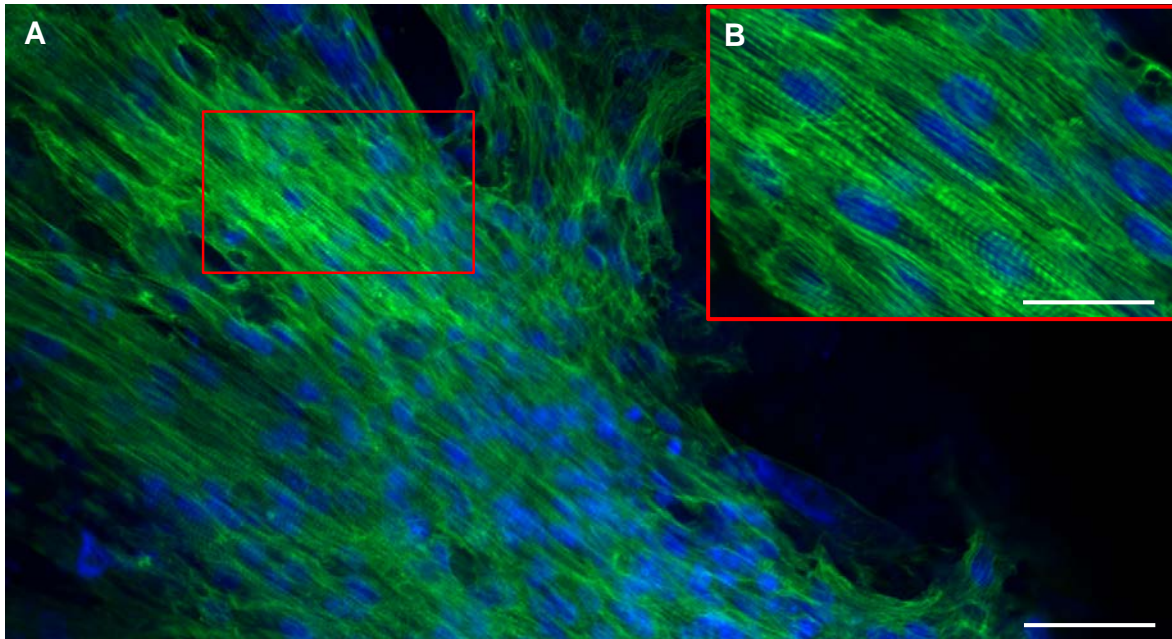
Kulturtag 3	Überführung auf statische Strecher
Kulturtag 11	Beginn der Positivselektion mit Geneticin
Kulturtag 20	Kulturrende

**Tab. 4: Stichtage der Probenentnahme zur histologischen Untersuchung**

Zur Darstellung der Organisation und Anordnung im EHM wurden Zellkerne mit Dapi und Aktin mit Phalloidin 488 immunfluoreszierend markiert (Abbildung 12). Im Verlauf der Entwicklung verringerte sich das Dapi-Signal stark. Im Übergang von Kulturtag 3 auf Kulturtag 11 zeigte sich eine deutliche Kondensierung einzelner EBs und das gleichzeitige Auftreten kleiner zellfreier Areale. Mit Beginn der Selektion wiesen die Proben eine Auflockerung der Zelldichte in den EBs auf, sowie große zellfreie Areale, in denen es nicht zur kardialen Differenzierung kam. Das Phalloidin 488-Signal wurde stetig intensiver. Während an Kulturtag 3 nur vereinzelt Aktin an den Randbereichen der EBs vorkam, bildete es an Kulturtag 20 ein komplexes, quergestreiftes Netzwerk (Abbildung 13).



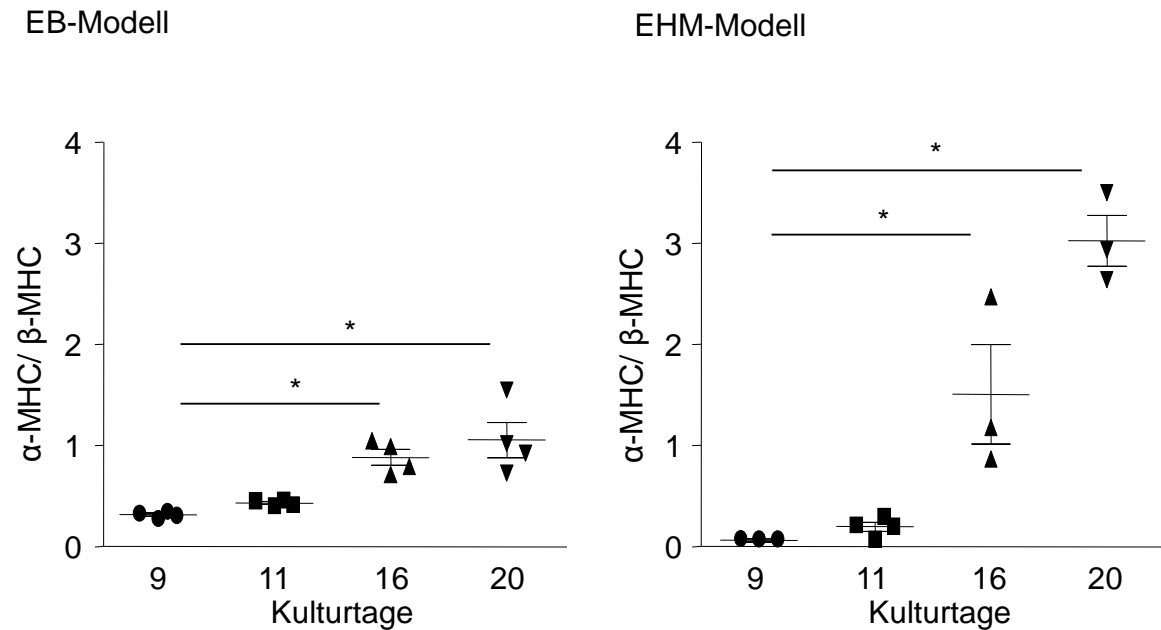
**Abb. 12: Histologische Analyse von EHM im Kulturverlauf.** Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. Filamentäres Aktin wurde mit Phalloidin-488 (grün) markiert. Maßstäbe: 200  $\mu\text{m}$  (linke Bildspalte), 20  $\mu\text{m}$  (rechte Bildspalte).



**Abb. 13: Querstreifung in der Detailaufnahme Kulturtag 20.** Färbung: Phalloidin-488 und Dapi; Maßstab A: 20  $\mu\text{m}$ , B: 10  $\mu\text{m}$

### 3.2.3 Reifung der Kardiomyozyten in der EB- und EHM-Kultur

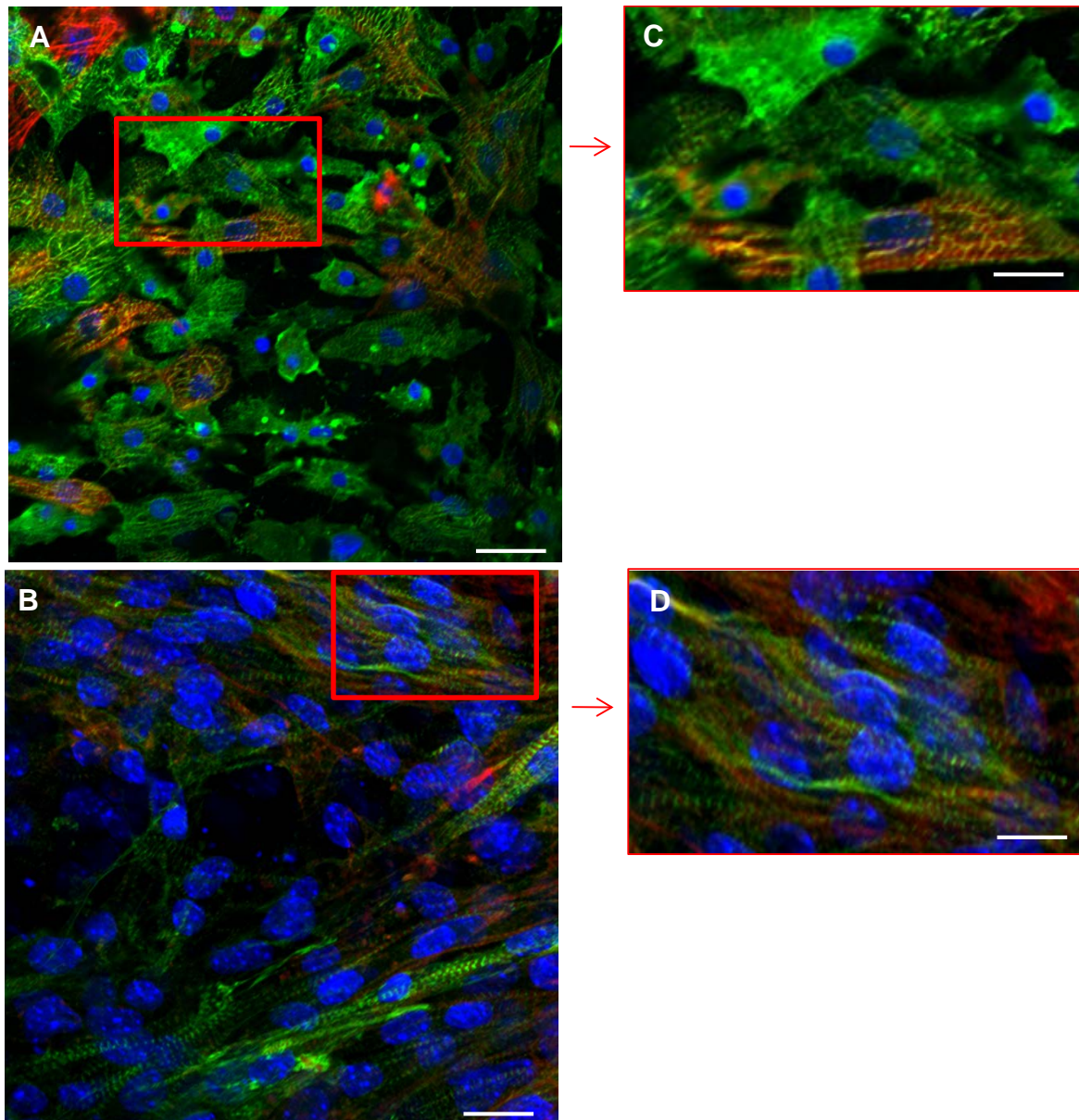
Zur Analyse der Gewebereifung wurde die mRNA-Expression von  $\alpha$ -MHC als sogenannte adulte MHC-Isoform in der Maus und  $\beta$ -MHC als sogenannte fetale MHC-Isoform in der Maus quantitativ verglichen. Eine Abnahme des  $\beta$ -MHCs im Verhältnis zu  $\alpha$ -MHC spricht für den fortschreitenden Reifungsprozess eines fetalen zu einem adulten Kardiomyozyten. Hier wurden die mittleren CT-Werte nach Aufhebung des natürlichen Logarithmus von  $\alpha$ -MHC auf  $\beta$ -MHC bezogen. Das  $\alpha$ -MHC/ $\beta$ -MHC-Verhältnis deutete in beiden Modellen auf einen Reifungsprozess hin (Abbildung 14). Im EHM-Modell zeigte der Quotient eine stärker Zunahme der  $\alpha$ -MHC-Transkription als in dem EB-Modell.



**Abb. 14: Alpha- und Beta-MHC-Quotient im EB- und EHM-Modell während der Entwicklung.** Auf der Ordinate sind die  $\alpha$ -MHC/ $\beta$ -MHC-Quotienten aufgetragen. EB-Modell: 9, 11, 16, 20 und EHM-Modell 11: n=4; EHM-Modell 9, 16, 20: n=3, \* $p < 0,05$  vs. Kulturtag 9 (ANOVA mit post hoc Test nach Dunnett).

Adulte murine Kardiomyozyten sind langgestreckte Zellen mit typischerweise einem oder zwei Zellkernen. Die kardiomyozytären Funktionseinheiten sind in Form von Sarkomeren organisiert und stellen sich histologisch nach Färbung typischer sarkomerischer Strukturproteine (z.B. Aktin, Aktinin und Myosin) durch gleichmäßige Querstreifung dar. Kardiomyozyten sind durch End-zu-End-Verbindungen (sogenannte Glanzstreifen) in einem funktionellen Synzytium organisiert. In der Histologie zeigte sich nach Fluoreszenzmarkierung von filamentärem Aktin besonders im EHM-Modell eine ausgeprägte Querstreifung (Abbildung 15, B). Aktinpolymere sind auf der einen Seite unter anderem über das Molekül Aktinin in der Z-Scheibe verankert. Auch in der EB-Kultur zeigte sich eine klare Sarkomerstruktur, allerdings weniger gerichtet als im EHM-Modell (Abbildung 15, A und C).



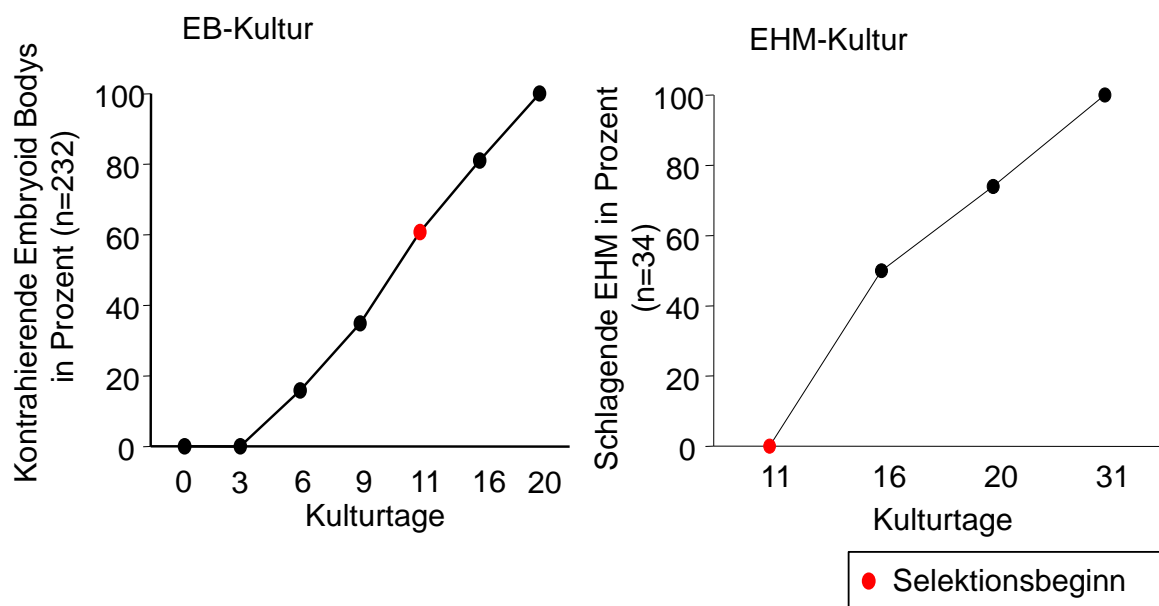


**Abb. 15: Histologische Reifung im EB- und EHM-Modell mit Detailaufnahmen.** Kulturtag 20-Proben wurden mit Phalloidin 546 (rot), Anti- $\alpha$ -Aktinin (grün) und Dapi (blau) markiert. Maßstab A: 20  $\mu$ m, B: 10  $\mu$ m; C: 8  $\mu$ m; D: 7  $\mu$ m

### 3.2.4 Funktionelle Analyse der Entwicklungsreihe

Eine erfolgreiche Differenzierung zu Kardiomyozyten resultierte in kontrahierenden Arealen in den EBs. Zur funktionellen Analyse wurden alle Kulturen an den Stichtagen mikroskopisch kontrolliert und die kontrahierenden Areale beziehungsweise EHM gezählt. In der EB-Kultur konnten an Kulturtag 4 erste schlagende EBs beobachtet werden. Bis zum Beginn der Selektion mit Geneticin

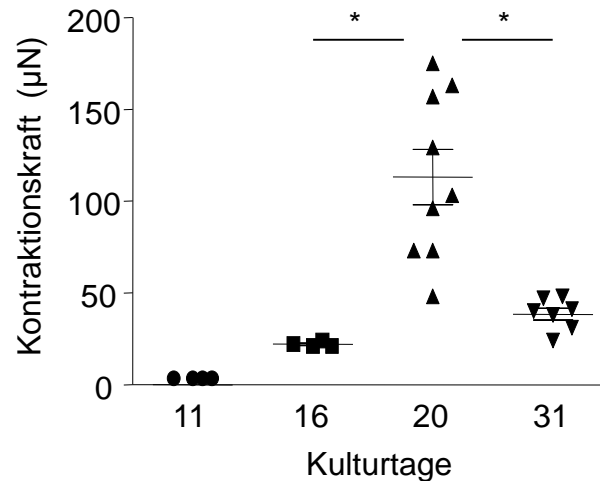
zeigten 60% aller EBs (n=232) eine spontane kardiale Differenzierung. Nach Selektionsbeginn zeigten alle EBs, die noch Kontakt zur Kulturschale hatten, Kontraktionen. Im EHM-Modell wurden bis Kulturtag 11 keine kontrahierenden Areale festgestellt, im Intervall zwischen Kulturtag 11 und Kulturtag 16 zeigten sich oberflächliche EBs. An Kulturtag 16 schlugen 50% (n=34) der EHM. Das Resultat der Differenzierung im EHM waren 77% schlagende EHM an Kulturtag 20 und 100% schlagende EHM an Kulturtag 31.



**Abb. 16: Mikroskopische Funktionsanalyse der EB- und EHM-Kultur.** Auf den Ordinaten ist der prozentuale Anteil kontrahierender EBs bzw. EHM dargestellt. Auf der Abszisse ist der Kulturtag der mikroskopischen Analyse vermerkt. Der Graph für die EHM-Kultur beginnt erst mit Kulturtag 11, da zu einem früheren Zeitpunkt keine Kontraktionen gesehen wurden. EHM-Kultur: n=34; EB-Kultur: n=232

Die EHM wurden, wie bereits in den Vorversuchen dargestellt, im Organbad bezüglich ihrer Kontraktionskräfte untersucht. Es zeigte sich parallel zu den mikroskopischen Ergebnissen, dass die EHM am Kulturtag 11 keine Kraft erzeugen konnten. An Kulturtag 16 konnten erste Kräfte von 20  $\mu\text{N}$  gemessen werden. Eine deutliche Zunahme der Kraftentwicklung konnte jedoch erst an Kulturtag 20 mit durchschnittlich 110  $\mu\text{N}$  und maximal 169  $\mu\text{N}$  gemessen werden. Die weitere 11 Tage kultivierten EHM (Kulturtag 31) erzeugten im Organbad eine geringerer Kontraktionskraft von durchschnittlich 40  $\mu\text{N}$ .

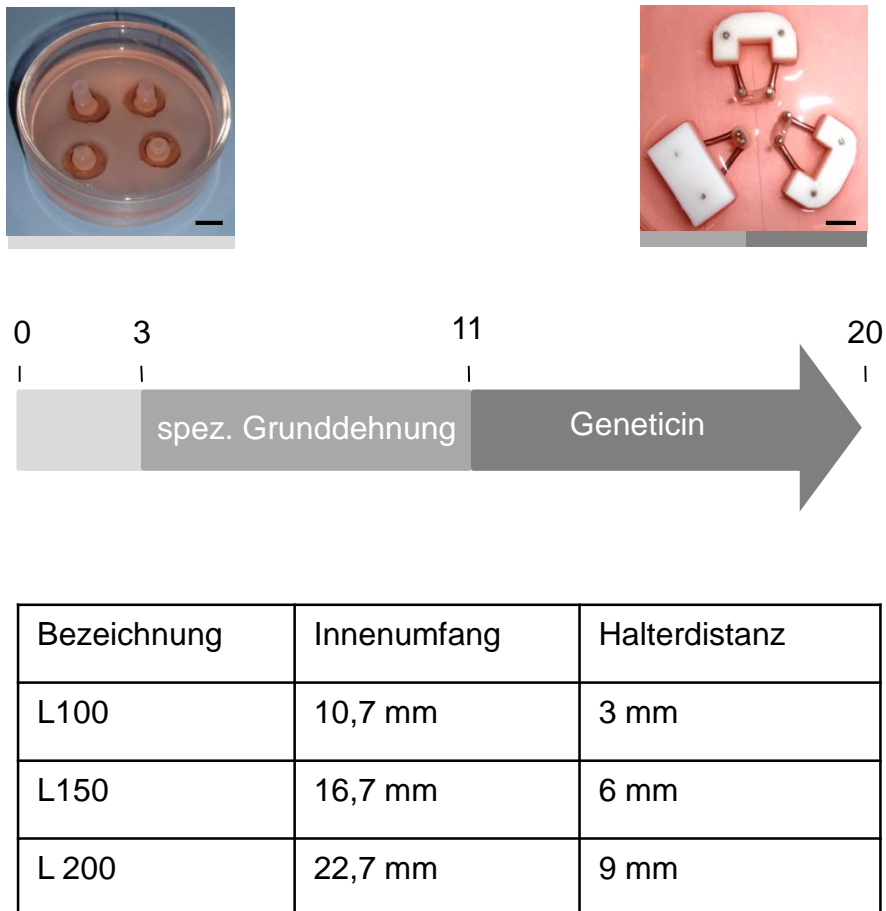




**Abb. 17: Maximale Kontraktionskraft im Differenzierungsverlauf der EHM-Kultur.** Die Kontraktionskraftmessung erfolgte an den Kulturtagen 11, 16, 20 und 31 unter isometrischen Bedingungen bei 37 °C und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. (Kulturtag 11: n=4; 16: n=4; 20: n=9; 31: n=7); \*p<0,05 (t-Test: Kulturtag 16 vs. 20 und Kulturtag 20 vs. 31)

### 3.3 Beeinflussung der kardialen Differenzierung durch mechanische Last

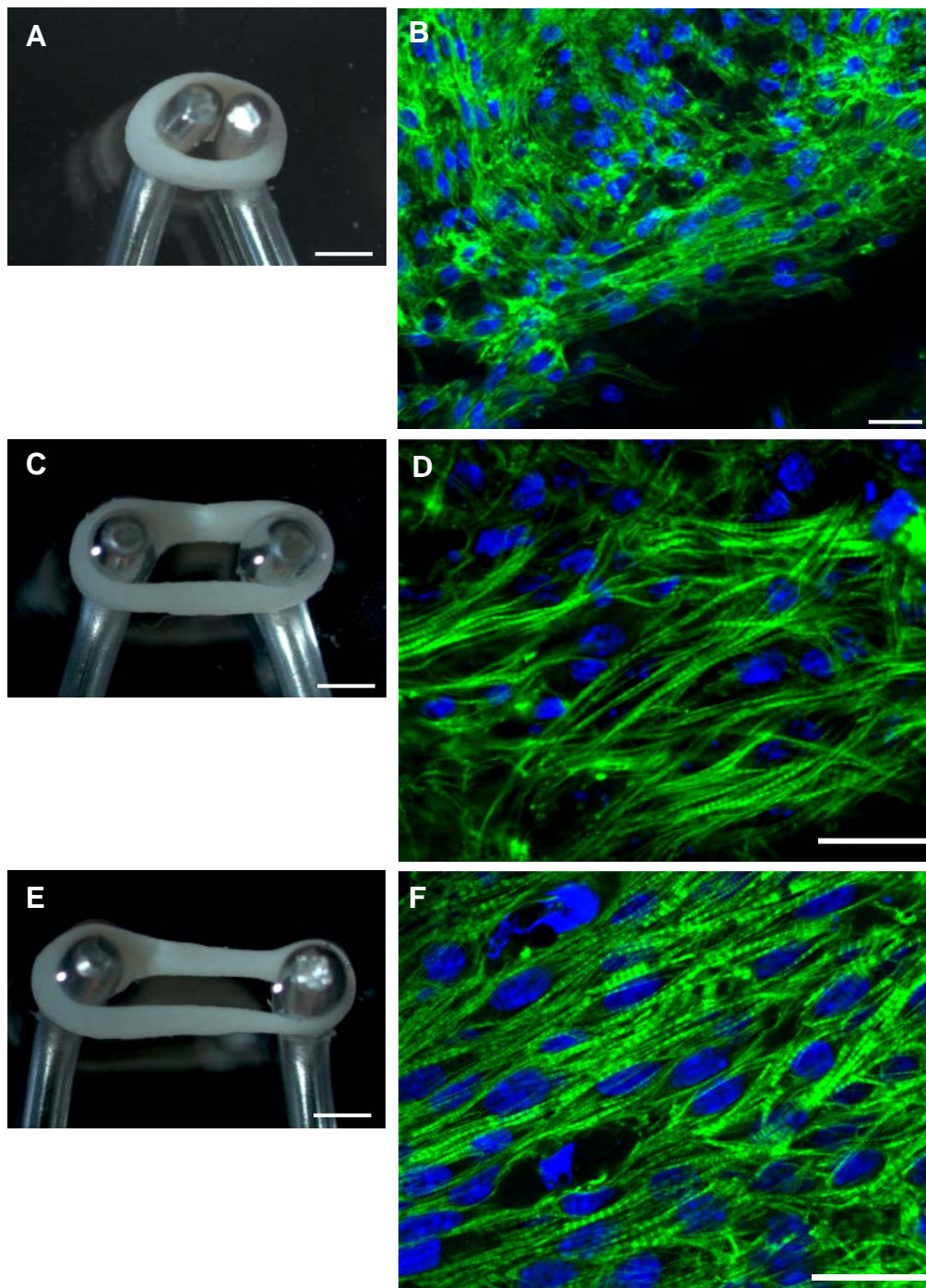
EHM wurden nach der Kondensationsphase auf eine Halteapparatur überführt und in eine Grunddehnungen gebracht (3 mm Halterabstand; bei einem Halterdurchmesser von 1,5 mm ergab sich so ein innerer EHM-Umfang von 10,7 mm). Diese Grunddehnung entsprach im weitesten Sinne der Dehnung in der Gussform - innerer Umfang 11,9 mm (Durchmesser des Silikonschlauches 3,8 mm). Daher wurde diese EHM-Gruppe als L100 definiert (100% der ursprünglichen Last). Im Vergleich dazu wurden zwei Dehnungen erprobt (6 mm Halterabstand = L150; 9 mm Halterabstand = L200; Abbildung 18).



**Abb. 18: Schematische Darstellung des Protokolls zur Untersuchung der Auswirkung von Last auf die kardiale Differenzierung.** Die EHM wurden an Kulturtag 3 in drei Gruppen aufgeteilt und 17 Tage unterschiedlich stark beladen. Die drei Belastungsgruppen wurden nach der Beladung im Verhältnis zur Dehnung in der Gussform definiert. L100-EHM wurden nicht zusätzlich beladen, d.h. die Dehnung entsprach der Dehnung in der originalen Gussform. Die L150- und L200-EHM wurden jeweils 50%-100% zusätzlich gedehnt. Maßstab: 5 mm

### 3.3.1 Histologische Untersuchung der strukturellen Veränderung

Zur Darstellung der Gewebestruktur wurden Aktin und die Zellkerne in den verschiedenen Dehnungsbedingungen angefärbt. Alle Versuchsgruppen zeigten eine Ausrichtung der Herzmuskelzellen entlang der Zugrichtung. Allerdings schien die Sarkomerorganisation mit zunehmender Dehnung entlang der langen EHM-Achse besser ausgerichtet (Abb. 19).

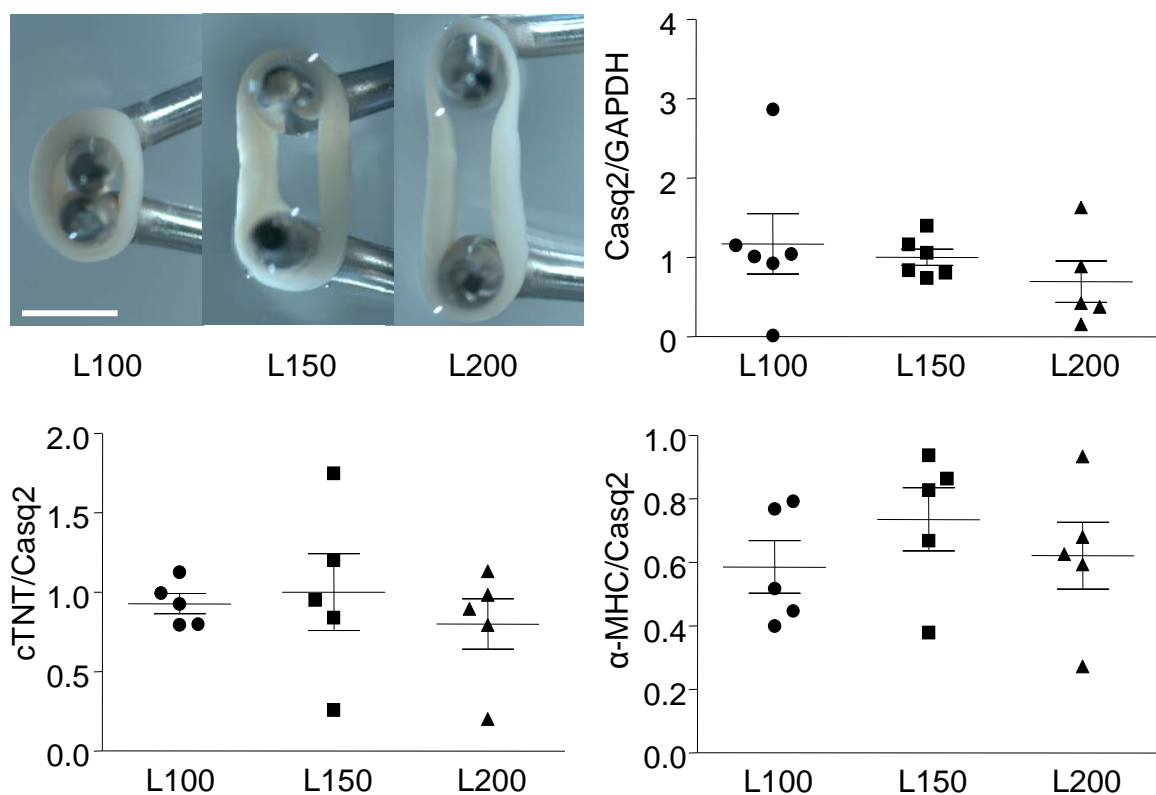


**Abb. 19: Histologische Struktur in den verschiedenen Dehnungsbedingungen.** In den Proben von Kulturtag 20 wurden Aktin (grün) und Zellkerne (blau) markiert. Maßstab: A,C,E: 1 mm, B,D: 20  $\mu$ m; F: 15  $\mu$ m

### 3.3.2 Transkription kardialer Marker

Hinweise auf eine bessere Differenzierung und Maturierung können auch anhand von Expressionsparametern gewonnen werden. Durch die Normalisierung von

Calsequestrin 2 (Casq2) auf GAPDH kann eine Aussage über das relative Verhältnis von Kardiomyozyten zu Nicht-Kardiomyozyten getroffen werden (Tiburcy, et al. 2011). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der relativen Anzahl von Kardiomyozyten in den EHM. Als weitere kardiale Marker wurden die Strukturproteine  $\alpha$ -MHC und kardiales Troponin T (cTnT) verwendet. Um eine Aussage über die Qualität der Kardiomyozyten machen zu können, mussten die beiden Strukturproteine auf Casq2 normalisiert werden, da sie ein Bestandteil des kontraktile Apparats sind und so Auskunft über den intrazellulären Aufbau der Kardiomyozyten geben. Hier ergab sich für beide Marker kein signifikanter Unterschied für die verschiedenen Lastbedingungen.

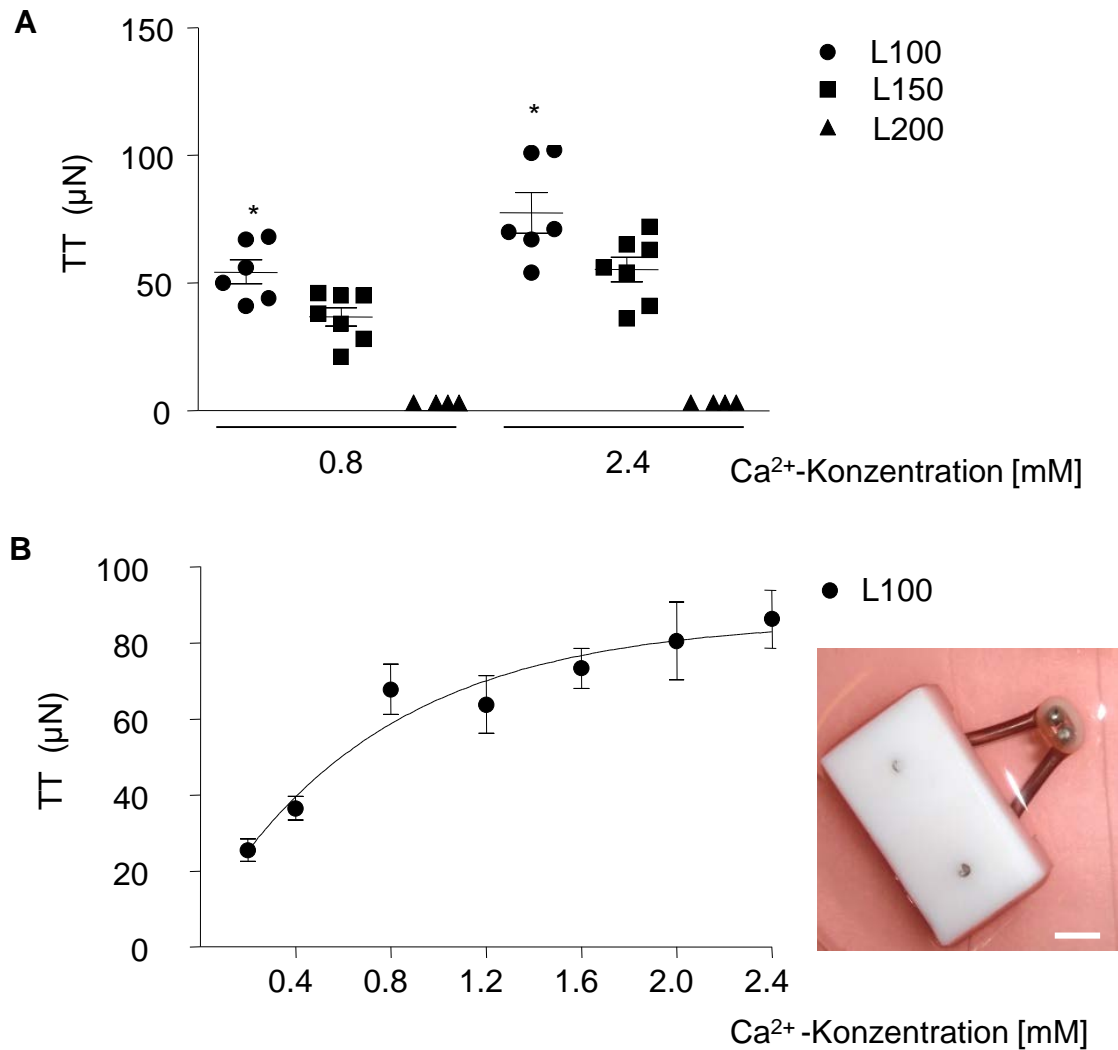


**Abb: 20: Echtzeit-PCR-Analyse kardialer Marker in L100-, L150- und L200-differenzierten EHM.** Expressionsdaten sind über GAPDH als Referenz standardisiert und im Fall von cTnT und  $\alpha$ -MHC auf die Casq2-Transkriptmenge normiert. (L100: n=6; L150: n=6; L200; n=5); signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde nicht detektiert (ANOVA;  $p > 0,5$ ). Maßstab: 3 mm

### 3.3.3 Funktionelle Analyse

Die wichtigste Funktion des Herzens ist die Fähigkeit zu kontrahieren. Daher galt auch in diesem Experiment die Kontraktionsfähigkeit als wichtiger Parameter für

die erfolgreiche kardiale Differenzierung. Eventuelle Unterschiede in der Kraftentwicklung sollten eine Aussage über die biologisch sinnvollste Dehnungsbedingung machen. Die Kräfte zu ermitteln stellte sich in diesem Versuchsaufbau als schwierig heraus. Die L200-EHM waren schwer zu handhaben und ließen sich aufgrund der Fragilität kaum auf die Messapparatur überführen (0/6 L200-EHM konnten aufgrund von Geweberissen in die Kontraktionskraftmessapparatur transferiert werden). Ebenso rissen vier von sieben L150-EHM im Verlauf des Versuchs. Aufgrund der Vulnerabilität der Gewebe und um maximale Kontraktionskräfte für die L150-EHM ermitteln zu können, wurde keine vollständige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationswirkungskurve gemessen, sondern nach 0,8 mM  $[\text{Ca}^{2+}]$  direkt die Kontraktionskraft bei 2,4 mM  $[\text{Ca}^{2+}]$  untersucht (Abbildung 21, A). Alle EHM der Versuchsgruppe L100 konnten erfolgreich untersucht werden und zeigten letztendlich die signifikant größte Kraftentwicklung von durchschnittlich 80  $\mu\text{N}$  (Abbildung 21, B).



**Abb. 21: Kontraktionskräfte der Grunddehnungsbedingungen der L100-, L150- und L200-EHM und Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationswirkungskurve für L100-EHM.** A: Hier sind die Kontraktionskräfte der drei spezifischen Grunddehnungen bei einer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,8 und 2,4 mM dargestellt. Die Kontraktionskraftmessung erfolgte unter isometrischen Bedingungen bei 37 °C und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. Die Ordinaten zeigten die ermittelten Kräfte (TT) in µN. B: Dargestellt ist beispielhaft die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationswirkungskurve für L0-EHM. Der Graph beginnt mit einer Konzentration von 0,2 mM Ca<sup>2+</sup>. Dieser Punkt wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht auf der Abszisse angegeben. (L100: n=6; L150: n=7; L200: n=4); \*p<0,05 vs. L150-EHM und vs. L200-EHM (zweiseitiger t-Test, unverbundene Stichprobe); Maßstab: 3 mm

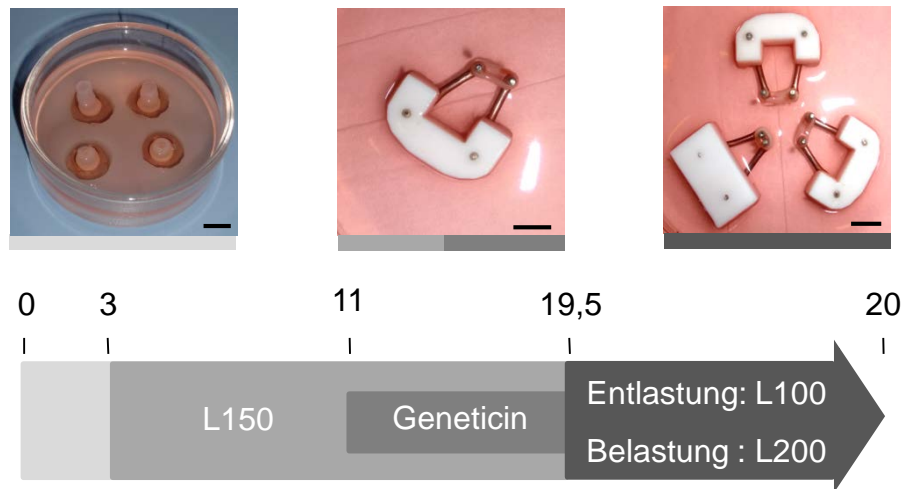
### 3.4 Last im EHM-Modell

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, ob mechanische Last die EHM-Gewebebildungsprozesse und -Funktion beeinflussen kann. Physiologisch werden im Herzkreislauf Vor- und Nachlast unterschieden. Frank und Starling zeigten zu Beginn des 20. Jahrhunderts in einem nach ihnen benannten Mechanismus, dass

das Herz bei stärkerer Vorbelastung mehr Kraft aufbauen und somit die Last bewältigen kann. Toischer und Kollegen konnten zeigen, dass sowohl erhöhte Nachlast (durch aortale Konstriktion) als auch erhöhte Vorlast (durch Volumenbelastung) einen akzelerierten pathologischen Phänotyp zeigen (Kogler et al. 2006, Toischer et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung akuter Lastveränderungen, Transkriptionsänderungen von Casq2, BNP und SERCA2a sowie die kontraktile Funktion von EHM untersucht. Dabei wurde zunächst bei einer Grunddehnung L150 für 12 Stunden auf L100 bzw. L200 ent- bzw. belastet. Die hier erprobten Lastveränderungen entsprechen am ehesten einer veränderten Vordehnung bei gleicher Nachlast.

#### **3.4.1 Erstes Protokoll zur akuten Minder- und Mehrbelastung**

Analog zu den Vorarbeiten von Rogge (2009) wurden die EHM an Kulturtag 3 nach Abschluss der Kondensationsphase von einem Innenumfang von 11,9 mm (3,8 mm Innendurchmesser) auf einen Innenumfang von 16,7 mm statisch gedehnt. Hierunter entwickelten sich kohärent schlagende EHM, so wie bereits unter 3.3 beschrieben. Es sollte hier die Hypothese überprüft werden, dass eine veränderte Last zu einer Änderung von Last-assoziierten Transkripten (SERCA2a und BNP) führt. Die Kontrollgruppe wurde unverändert bei 16,7 mm Innenumfang kultiviert. In der L100- und der L200-Gruppe wurde die Last für jeweils 12 Stunden vermindert bzw. erhöht (Abbildung 22).



Proben	Innenumfang	Halterdistanz
Entlastet: L100	10,7 mm	3 mm
Kontrolle: L150	16,7 mm	6 mm
Belastet: L200	22,7 mm	9 mm

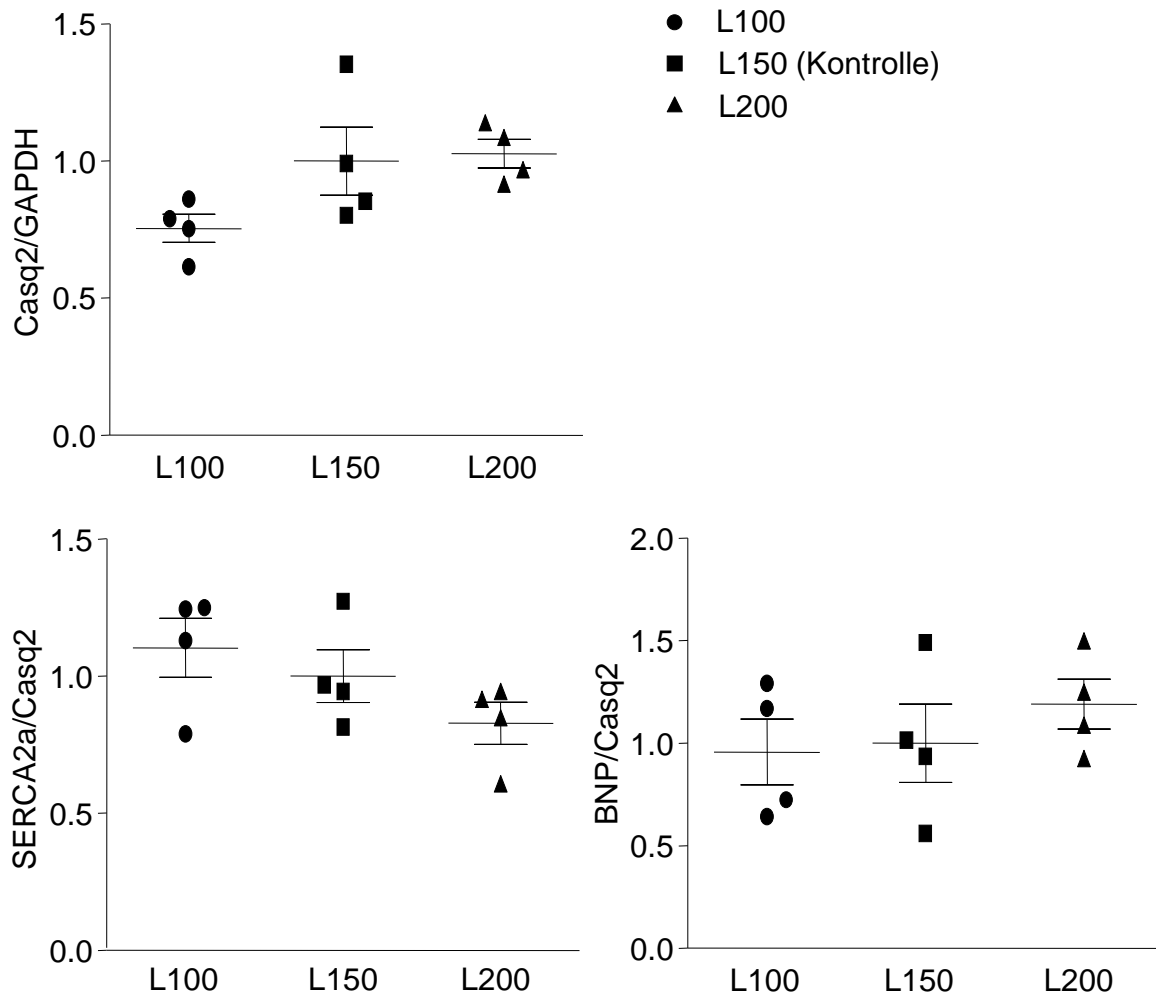
**Abb. 22: Schematische Darstellung des ersten Protokolls zur akuten Ent- und Belastung im EHM.** Die EHM wurden 19,5 Tage unter gleichen Bedingungen bei L150-Dehnung kultiviert und anschließend für 12 Stunden in drei Belastungsgruppen (L100; L200) aufgeteilt. Als Kontrolle dienten L150-EHM. Maßstab: 5 mm

### 3.4.1.1 Analyse lastspezifischer Transkripte: SERCA2a und BNP

Im Herzen kommt es zur Transkription spezifischer Marker, wenn es zu Vorlast- und Nachlaständerungen kommt (Kogler, et al. 2006). Das *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) wird vermehrt bei einer Nachlasterhöhung transkribiert, also bei einem erhöhten Kontraktionswiderstand, um das Blutvolumen durch Ausscheidung über die Niere zu verringern. Die Sarkoplasmatische-Reticulum-Kalzium-ATPase 2a (SERCA2a) wird spezifisch im Herzen gebildet und zeigt eine vermehrte Transkription bei Vorlasterhöhung, also einem erhöhten enddiastolischen Druck (= enddiastolische Dehnung). Auf die Weise kann durch die vermehrte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung bei der folgenden Herzaktion mehr  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden. Durch Dehnung der statisch aufgehängten EHM sollte eine erhöhte Vorlast simuliert werden. Durch Entlastung



wurde die Vorlast und zugleich die Nachlast in einem Kontraktionszyklus reduziert. Zur Abschätzung der Herzmuskelzellzahl wurde die Casq2-Transkriptionsmenge relativ bestimmt. Dabei zeigte sich keine signifikant verminderte Casq2-Expression in entlasteten EHM. Darüber hinaus war weder die BNP noch die SERCA2a-Transkription verändert (Abbildung 23).



**Abb. 23: Echtzeit-PCR-Analyse in ent- und belasteten EHM.** Casq2 als Kardiomyozyten-spezifisches Transkript; BNP als Marker für Herzbelastung durch Nachlast; SERCA2a als Marker für Vorlastserhöhung. Die Expressionsdaten sind über GAPDH als Referenz standardisiert und im Fall von BNP und SERCA2a auf die Casq2-Transkriptmenge normiert. (n=4 für alle Gruppen; Kontrollgruppe: L150), p>0,05 (zweiseitiger t-Test; unverbundene Stichproben)

### 3.4.1.2 Funktionelle Analyse der be- und entlasteten EHM

Die Kontraktionskraft wurde im Organbad in zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ermittelt (0,8 mM/2,4 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )

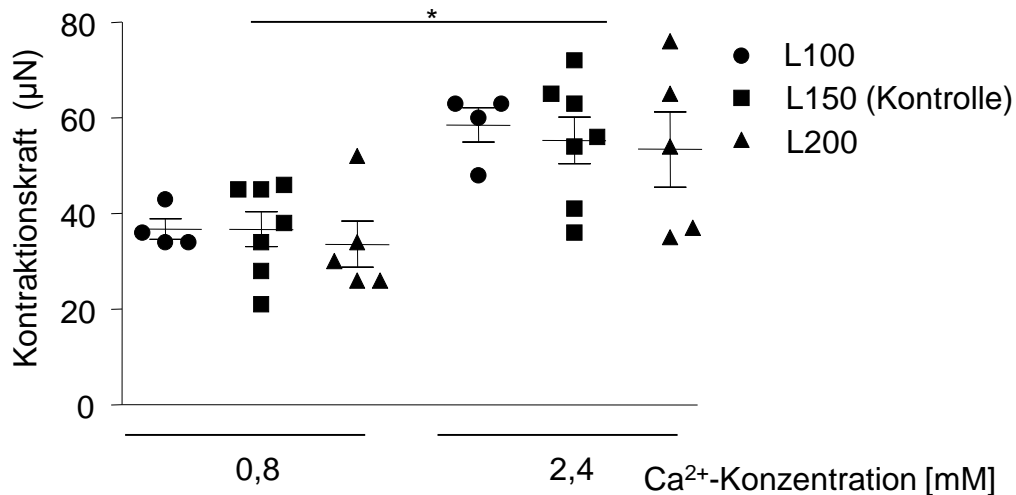
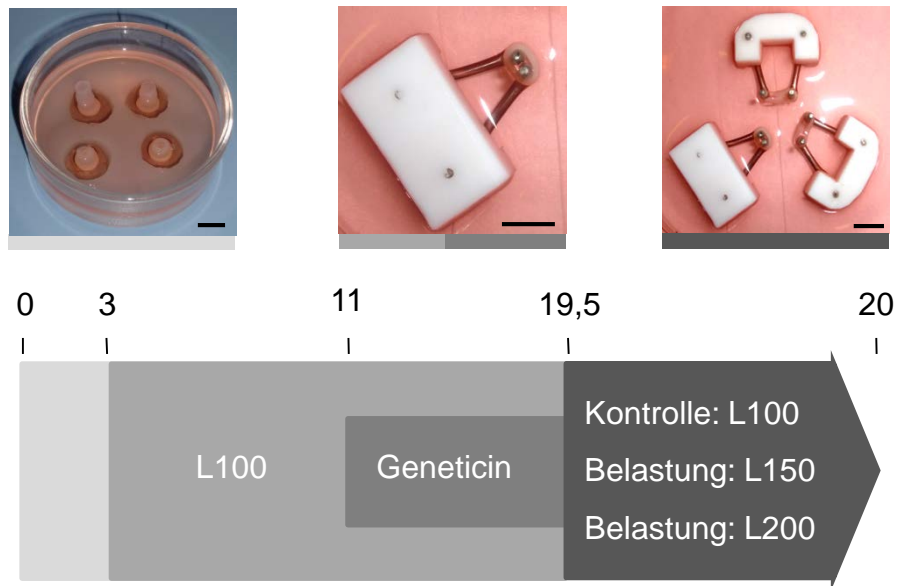


Abb. 24: Kontraktionskräfte nach zwölf Stunden Ent-(L100) und Belastung (L200). Auf der Ordinate ist die Kontraktionskraft in  $\mu\text{N}$  dargestellt. Die Kontraktionskraftmessung erfolgte unter isometrischen Bedingungen bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. Auf der Abszisse ist die Kalziumkonzentration aufgetragen. (L100:  $n=4$ , L200:  $n=5$ , Kontrolle:  $n=7$ );  $*p<0,05$  für alle Gruppen (zweiseitiger t-Test; verbundene Stichproben)

Für alle Gruppen galt eine signifikante Kraftzunahme bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Steigerung von 0,8 mM auf 2,4 mM. Jedoch zeigte sich kein Unterschied der Maximalkraft zwischen den Gruppen auf dem gleichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveau (Abbildung 24).

### 3.4.2 Zweites Protokoll zur akuten Belastung

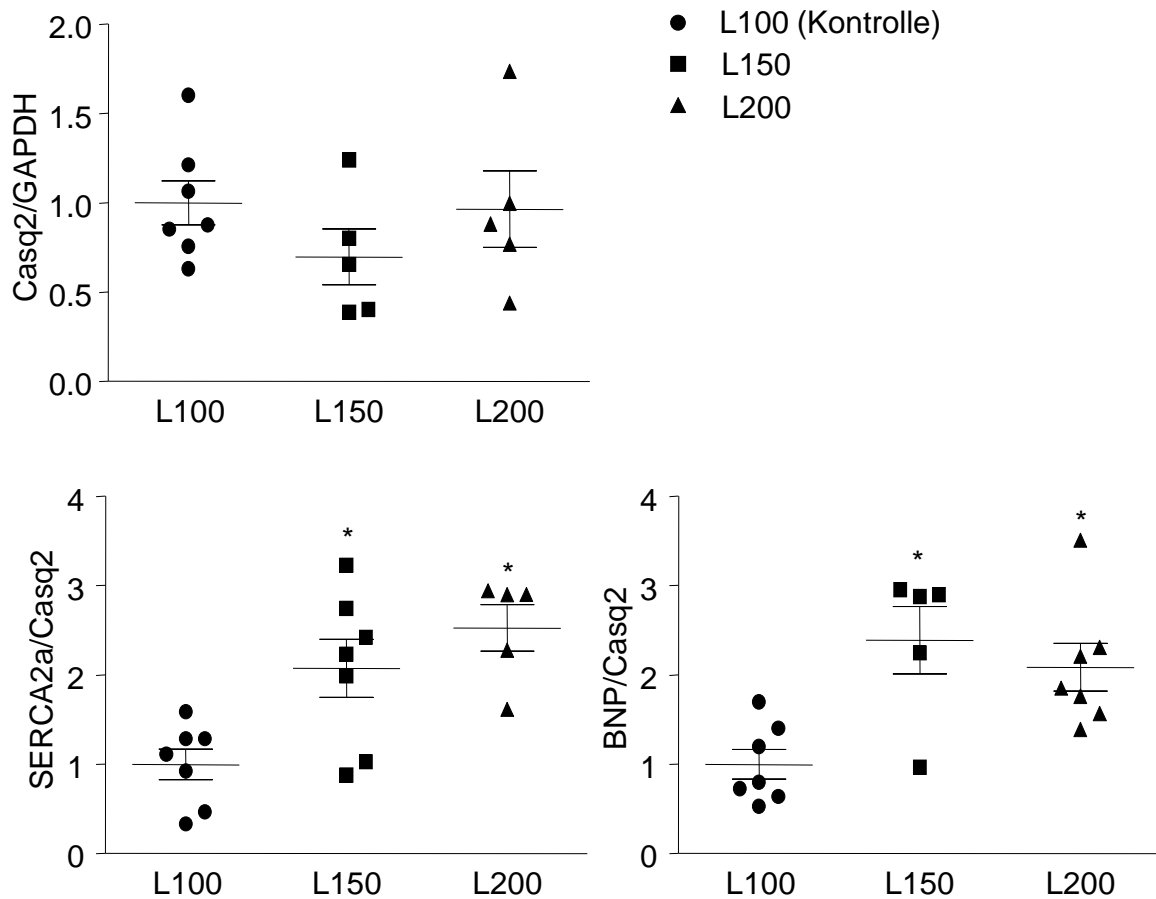
In einem alternativen Modell wurden die EHM 19,5 Tage bei L100 kultiviert und dann für 12 Stunden auf L150 und L200 gedehnt. Als Kontrolle dienten L100-EHM (Abbildung 25).



**Abb. 25: Schematische Darstellung des zweiten Protokolls für akute Belastung.** Alle EHM wurden 19,5 Tag mit einer Grunddehnung L100 kultiviert und dann in drei Gruppen aufgeteilt. Als Kontrolle galten die L100-EHM. Für 12 Stunden wurden die EHM der Versuchsgruppen auf L150 oder L200 gedehnt. Maßstab: 5 mm

### 3.4.2.1 Analyse der lastspezifischen Transkripte

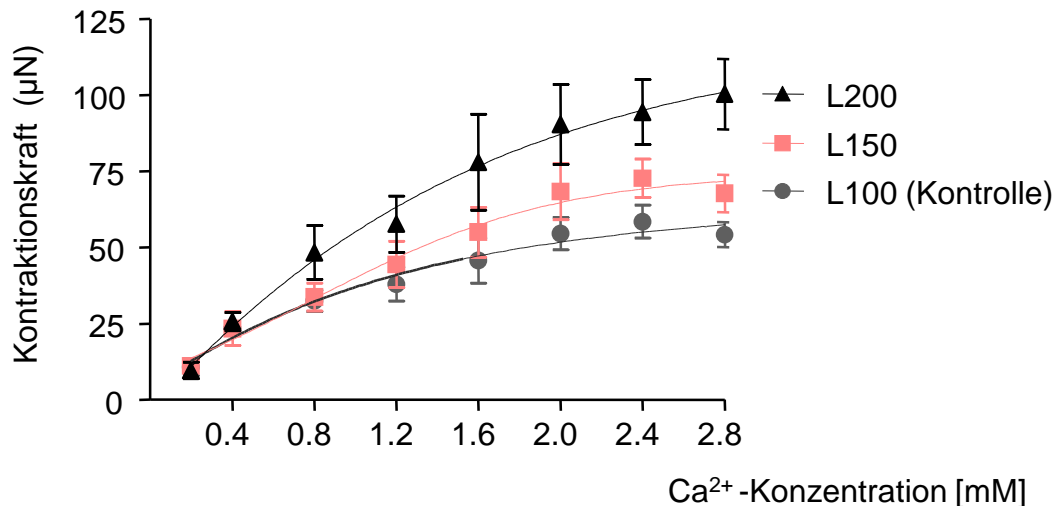
In dieser Versuchsserie zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Casq2-Expression (Abbildung 26). Allerdings waren die BNP- und SERCA2a-Expression in beiden belasteten EHM deutlich und dabei gleichermaßen erhöht.



**Abb. 26: Echtzeit-PCR-Analyse nach 12-stündiger Mehrbelastung von L100 auf L150 und L200.** Casq2 als Kardiomyozyten-spezifisches Transkript; BNP als Marker für Herzbelastung durch Nachlast; SERCA2a als Marker für Vorlastserhöhung. Die Expressionsdaten sind über GAPDH als Referenz standardisiert und im Fall von BNP und SERCA2a auf die Casq2-Transkriptmenge normiert. (L200 n=3; L150: n=6; L100: n=7); \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle (L100) (zweiseitiger t-Test; unverbundene Stichproben)

### 3.4.2.2 Funktionelle Analyse nach 12-stündiger Belastung

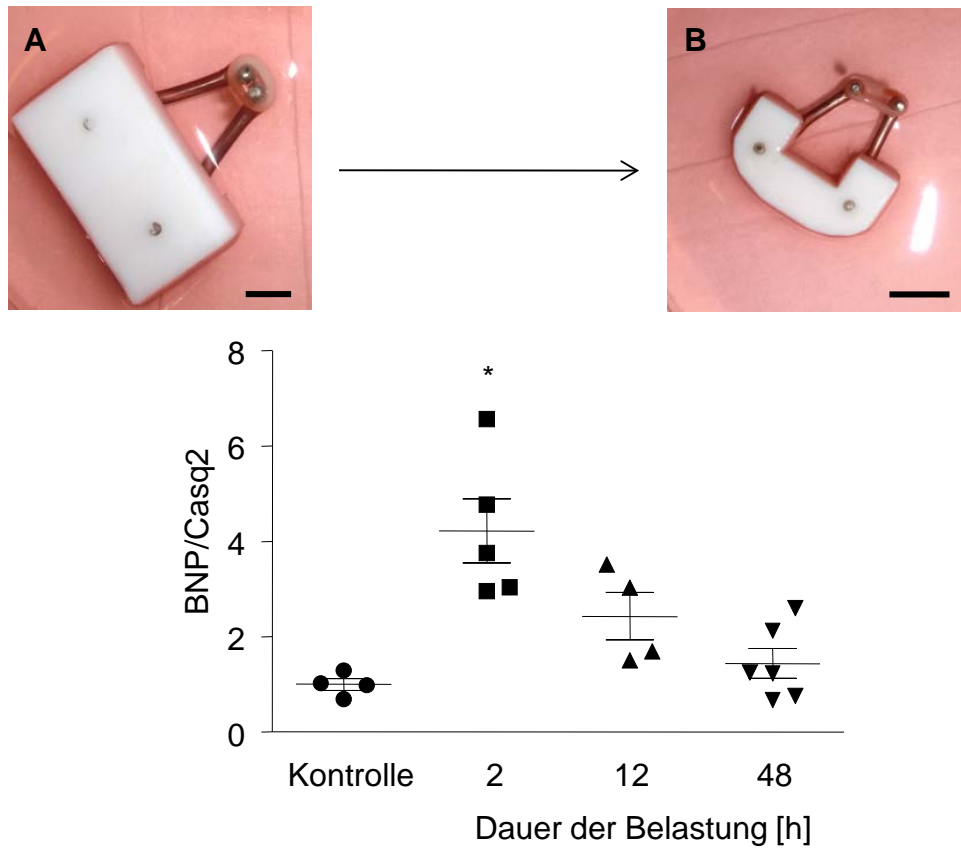
Parallel zu den Transkriptionsdaten der SERCA2a zeigte sich eine Zunahme der maximalen Kontraktionskraft in den L200-EHM. Allerdings zerrissen 50% dieser EHM in Kultur. Dies war am ehesten die Konsequenz eines Strukturschadens durch die starke Überdehnung. Interessanterweise zeigten aber ‚messbare‘ L200-EHM eine gesteigerte Kraftentwicklung unter kumulativer Erhöhung der extrazellulären Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Konzentration. In L150-EHM war eine Tendenz zu einer besseren kontraktiven Funktion im Vergleich zu L100-EHM zu erkennen.



**Abb. 27: Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationswirkungskurve für L100-, L150- und L200-EHM nach 12-stündiger Belastung.** Die Ordinate stellt die Kontraktionskraft in µN dar. Die Kontraktionskraftmessung erfolgte unter isometrischen Bedingungen bei 37 °C und elektrischer Feldstimulation (4 Hz; 30 mA) in modifizierter Tyrode-Lösung. Auf der Abszisse sind die Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aufgetragen, die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,2 mM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht extra aufgeführt. (L100: n=4; L150: n=5; L200: n=3 von 6), signifikante Unterschiede wurden nicht detektiert (ANOVA, p>0,5)

### 3.4.3 Transkription von BNP im Zeitverlauf der mechanischen Belastung

BNP-Plasmaspiegel werden klinisch als Biomarker für die Diagnose der Herzinsuffizienz verwendet und korrelieren sehr gut mit der BNP-RNA-Expression im Myokard. Hier wurde überprüft, ob die BNP-Expressionssteigerung im EHM-Modell eine transiente Akutantwort oder eine chronische Expressionsänderung bei erhöhter Last darstellt. Dafür wurde die BNP-Transkriptionsmenge in L100-EHM mit EHM 2, 12 und 48 Stunden nach Dehnung auf L150 untersucht. Dabei zeigte sich die bereits zuvor beobachtete höhere Expression von BNP in L150-EHM mit einem Maximalwert nach 2 Stunden und einer Normalisierung nach 48 Stunden. L200-EHM wurden aufgrund der zuvor beobachteten Gewebeschädigung nicht untersucht. Diese Daten legen nahe, dass die unter 3.4.2 beschriebenen BNP-Transkriptionserhöhungen (gemessen nach 12 Stunden) vermutlich nicht die Maximalwerte widerspiegeln.



**Abb. 28: BNP-Transkription nach 2-, 12- und 48-stündiger +100%-Belastung.** BNP wurde auf Casq2 normalisiert. Auf der Abszisse sind die Belastungsgruppen aufgetragen. (Kontrolle und 12h: n=4; 2h: n=5; 48h: n=6); \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle, (ANOVA, post hoc Test nach Dunnett); Maßstab: A: 3 mm; B: 6 mm

## 4 Diskussion

In Deutschland führen Herz-Kreislaufkrankungen die Statistik der 10 häufigsten Todesursachen mit 22,2% an (Bundesamt für Statistik 2011). Neue therapeutische Verfahren sind notwendig, um die vor allem mit der Herzinsuffizienz assoziierten Mortalität zu senken. Neben pharmakologischen Strategien hat sich in den letzten Jahren das Feld der Regenerativen Medizin rasant entwickelt und erste Optionen zum Herzmuskelaufbau (z.B. nach Herzinfarkt) über sogenannte *Tissue Engineering* Verfahren aufgezeigt (Zimmermann, et al. 2006b). In dieser Arbeit sollte die Entwicklung und Kultur von *Engineered Heart Muscle* (EHM) optimiert werden. Weiterhin sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob EHM ähnlich wie biologische Herzgewebe auf mechanische Last reagieren.

Im Einzelnen hatte dieser Arbeit folgende Ziele:

- 1) Optimierung des EHM-Protokolls im ESC-Mausmodell.
- 2) Beschreibung und Charakterisierung der EHM *in vitro*.
- 3) Identifikation mechanischer Last für die EHM-Entwicklung.
- 4) Etablierung von ‚pathologischen‘ Lastmodellen.

Hierzu wurden ca. 700 EHM hergestellt und auf verschiedene Aspekte untersucht. Um die Verfälschung durch äußere Einflüsse zu minimieren, wurden die EHM für die akuten (12 Stunden) Lastversuche aus je einer EHM-Serie gewonnen. So konnten alle Manipulationsschritte zum gleichen Zeitpunkt und unter gleichen Bedingungen erfolgen. Die Hauptergebnisse sind in der dem Ergebnissteil entsprechenden Reihenfolge aufgelistet und werden anschließend diskutiert:

- 1) Das Protokoll zur Herstellung von EHM aus mES-Zellen konnte optimiert werden (u.a. Weglassen von Matrigel®, Supplementierung mit Ascorbinsäure)

- 2) Kardiale Markergene zeigten Ähnlichkeiten in der 2D- und EHM (3D)- Kultur sowie Hinweise auf einen höheren Reifegrad in EHM- vs. 2D-Kultur ( $\alpha/\beta$ -MHC-Ratio).
- 3) Last während der Differenzierungsphase führte zu einer homogenen Herzmuskelzellorientierung in EHM, wobei eine Überbelastung (ab L150) zu Gewebeschäden führte.
- 4) Akute Lasterhöhung führte zu einer Steigerung der Transkription von SERCA2a (Sarkoendoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2a) und BNP (*brain natriuretic peptide*) und einer gesteigerten kontraktile Funktion.
- 5) Die Transkriptionssteigerung bei Lasterhöhung führte zu einer schnellen transienten Hochregulation von BNP (max. nach 2 Stunden).

#### 4.1 Optimierung des mES-Zell-EHM-Protokolls

Nach der Etablierung der Methode für embryonale Hühnerkardiomyozyten und neonatale Rattenkardiomyozyten gelang es in Vorarbeiten erstmalig, EHM aus embryonalen Stammzellen der Maus herzustellen (Rogge 2007). Wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften von nativem Myokard wurden sowohl in EHM aus neonatalen Kardiomyozyten wie auch aus embryonalen Stammzellen gefunden (Zimmermann, et al. 2006a, Rogge 2007, Soong, et al. 2012). Das Protokoll sollte im Rahmen dieser Arbeit bezüglich der Zuverlässigkeit erfolgreich schlagender EHM optimiert werden. Weiterhin war die Reduktion oder Elimination von unphysiologischen Zusatzstoffen beabsichtigt.

Als Modifikation der Vorarbeiten von Rogge erfolgte zunächst die Herstellung der EHM ohne die extrazelluläre Zusatzmatrix Matrigel® und der alleinigen Zugabe von selbstproduziertem Kollagengemisch aus Rattenschwänzen. Matrigel® dient in der Stammzellkultur in hohen Konzentrationen zum Erhalt der Pluripotenz und wird aus Tumoren von Mäusen gewonnen (Xu et al. 2001, Hughes et al. 2010). Klassisch wird Matrigel® in sogenannten ‚*Sprouting Assays*‘ in der Gefäßbiologie und Neurobiologie verwendet (Kubota et al. 1988, Nicosia und Ottinetti 1990) Allerdings ist die Zusammensetzung von Matrigel®, gewonnen aus der



Aszitesflüssigkeit in Mäusen nach Installation eines Engelbreth-Holm-Swarm Tumors in die Bauchhöhle, hoch variabel und nicht vollständig definiert. Matrigel® wurde als essentieller Zusatz für die Herstellung von EHM aus neonatalen Rattenherzmuskelzellen eingeführt (Zimmermann, et al. 2000). Später konnte gezeigt werden, dass Matrigel® durch eine Mischung aus Insulin, Selen, Transferrin und T3 ersetzt werden konnte (Naito et al. 2006). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass auf Matrigel auch in EHM aus embryonalen Stammzellen ersatzlos verzichtet werden kann. Matrigel®-freie EHM zeigten eine intensive Kondensation in den ersten 24 Stunden, eine gute Gewebestabilität und eine zuverlässige kardiale Differenzierung in jeder Serie. Weiterhin wurde die Frequenz der Mediumwechsel intensiviert und statt eines wöchentlichen Wechsels wie in der Arbeit von Rogge wurde der Wechsel hier zunächst 2-tägig bis Kulturtag 11 und dann 3-tägig mit gleichzeitiger Geneticin-Zugabe durchgeführt. Durch diese Protokolländerung wurde die Anhäufung von toxischen Metaboliten und pH-Veränderungen vermindert.

Auch das Differenzierungsmedium wurde modifiziert, nachdem zwei verschiedene Zusätze mit kardiogenem Potential untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Ascorbinsäure zur Stammzellkultur die Kardiogenese fördert. (Takahashi, et al. 2003). Die Zugabe von Insulin, Transferrin, Selen und Trijodthyronin (ITS 1 + T3) zum Medium wurde bereits in der EHM-Kultur untersucht und resultierte in einer signifikanten Kraftzunahme (Naito, et al. 2006, Armbrüster 2008). Die Differenzierung wurde hier unter Zugabe beider Substanzen durchgeführt. Die anschließende Kraftmessung war für beide Substanzen signifikant erhöht. Die Kraftzunahme war jedoch bei der Kultur mit Ascorbinsäure um 42% stärker als unter der ITS 1 + T3-Kultur mit 22%iger Zunahme. Eine direkte Testung auf potentielle additive Effekte wurde bisher nicht durchgeführt. Der Entscheidung, das Protokoll lediglich mit Ascorbinsäure weiterzuführen, wurde vor dem Hintergrund der deutlichen Steigerung der Kontraktionskraft als auch einer Minimierung von Variablen im Kulturmedium durchgeführt. Folgeuntersuchungen müssen klären, inwiefern das Differenzierungsmedium aus komplett definierten Komponenten hergestellt werden kann.

Vorarbeiten zeigten, dass erste schlagende Areale im EHM ab Kulturtag 19 und vollständig schlagende EHM an Kulturtag 31 zu beobachten waren (Rogge 2007). In dieser Arbeit gab es erste schlagende Areale und EHM an Kulturtag 16, 77% der EHM schlugen vollständig an Kulturtag 20 und 100% an Kulturtag 31. Die maximale Kraftentwicklung von 169  $\mu\text{N}$  (0,16 mN) konnte an Kulturtag 20 ermittelt werden, wohingegen eine starke Kraftminderung auf 45  $\mu\text{N}$  bei den 31 Tage kultivierten EHM gemessen wurde. Am ehesten ist diese geringe Kraftentwicklung durch die Tatsache zu erklären, dass es durch die Herzmuskelzellselektion zu einem Verlust von Nicht-Kardiomyozyten kommt. Das Nicht-Kardiomyozyten für die Entwicklung von EHM wichtig sind, konnte im Rahmen von Vorarbeiten gezeigt werden (Naito, et al. 2006). Es ist naheliegend, dass der Erfolg der EHM-Herstellung mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Protokoll ganz wesentlich von einer optimalen Mischung aus Herzmuskelzellen und Nicht-Kardiomyozyten abhängt. In jedem Fall sind weiter Optimierungsschritte erforderlich, um die kontraktile Funktion von EHM zu verbessern und an das Kraftniveau von Herzmuskelzellen (54 mN/mm<sup>2</sup>) sowie EHM z.B. aus neonatalen Rattenkardiomyozyten (4 mN) anzugleichen (Hasenfuss et al. 1991, Zimmermann und Eschenhagen 2003).

Die Gewinnung von künstlichen Herzgeweben aus unselektionierten mES-Zellen ermöglicht eine zuverlässige, hochwertige und quantitativ uneingeschränkte Herstellung. Die Zuverlässigkeit zeigte sich darin, dass jede EHM-Serie, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde, in schlagenden EHM resultierte, die für die weiterführenden Experimente verwendet werden konnten. Allerdings zeigten sich auch im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Qualitäten der verschiedenen Serien, gemessen an der erzeugten Kontraktionskraft. Vergleichbare EHM aus verschiedenen Serien kontrahierten durchschnittlich mit 60-125  $\mu\text{N}$ . Eine weitere Optimierung und Standardisierung des Protokolls und der Kultur ist wichtig. Die maximale Serienstückzahl von 76 EHM ergab sich aufgrund einer Limitierung, sowohl durch die EHM-Gussschalen als auch durch die Dehnungsapparaturen, die im weiteren Verlauf der Kultur eine entscheidende Rolle spielten. Die Stammzellkultur ist zum jetzigen Zeitpunkt so gut etabliert, dass diese keine

Limitation mehr bietet und durch Zellsplittung aus einer Passage weit über hundert EHM hergestellt werden könnten. Aus  $50 \times 10^6$  Zellen konnten mit dieser Methode 37 EHM gewonnen werden. Die gleiche eingesetzte mES-Zellzahl in der vorselektionierenden Bioreaktormethode erzielte eine Kardiomyozytenausbeute von  $24 \pm 7 \times 10^6$ . Für die Herstellung von EHM wurden mit dieser Technik ebenfalls  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro EHM benötigt (75% Kardiomyozyten und 25% Nicht-Kardiomyozyten), so dass letztendlich bei gleichem Zelleinsatz nur 14-26 EHM gewonnen werden könnten (Christalla 2009). Im Falle maximaler Ausbeute können nur 70% der EHM hergestellt werden verglichen mit unselektionierten mES-Zell-EHM.

#### 4.2 Transkriptionsprofile während der EB- und EHM-Entwicklung

Die Prozesse und die Induktion der kardialen Differenzierung von ES-Zellen sind Gegenstand zahlreicher Forschungen. Grundsätzlich ist man der Überzeugung, dass eine 3-dimensionale Kulturform die Differenzierungsprozesse fördert, da sie die *in vivo*-Differenzierung am ehesten imitiert (Ou, et al. 2011). Die Kultur im EB ist als eine 3-dimensionale Kulturform anerkannt, jedoch wird immer mehr Abstand von dieser Kulturform genommen und die Kultur in einem Gerüst oder in einem tatsächlichen Gewebeverbund bevorzugt. (Levenberg et al. 2003, Battista et al. 2005, Christalla et al. 2011). Die Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen (mES-Zellen) wurde bereits in *Embryoid Bodies* (EB) untersucht und mit der *in vivo*-Entwicklung verglichen (Leahy et al. 1999). In dieser Arbeit wurde der Vergleich EB- und EHM-Kultur aufgestellt. Die Marker für die transkriptionelle Ebene wurden nach spezifischen Differenzierungsprozessen gewählt. Für die Pluripotenz und somit als Stammzellmarker gilt Oct-3/4 (Palmieri et al. 1994, Lang et al. 2009). Zur Beobachtung der Keimblattdifferenzierung wurde der Marker Brachyury gewählt, der in den frühmesodermalen Zellen exprimiert wird (Kispert und Herrmann 1994). Der präkardiale Marker Nkx2.5 diente zur Untersuchung des Verlaufs der Organogenese (Lyons et al. 1995). Der Reifungsprozess der Kardiomyozyten wurde durch die Expression vom spezifischen kardialen

Strukturprotein  $\alpha$ -MHC widergespiegelt (Ng et al. 1991, Sanchez, et al. 1991, Kuzmenkin et al. 2009).

Die Entwicklung der EB-Kultur war zeitlich auf transkriptioneller sowie auf funktioneller Ebene vergleichbar mit der in der Literatur beschriebenen Entwicklung (Boheler, et al. 2002). Als Hinweis auf eine Keimblattdifferenzierung konnte der Transkriptionsanstieg des mesodermalen Markers Brachyury gewertet werden, der an Kulturtag 3 gemessen wurde. Die ersten Kontraktionen zeigten sich an Kulturtag 4. In anderen Arbeiten, mit leichten Alterationen in der EB-Kultur, zeigten sich erste Kontraktionen zwischen Tag 1 und 6 (Leahy, et al. 1999). Durch die weitere Differenzierung und die Selektion stieg der Anteil an schlagenden EBs auf 100% bis zum Ende der Kultur an. Die Differenzierung in der EHM-Kultur verlief langsamer als in der EB-Kultur, war sonst aber im Transkriptionsprofil vergleichbar mit dem, was aus EB- und Herzentwicklung bekannt ist. Die mesodermale Differenzierung zeigte sich durch eine Transkriptionssteigerung von Brachyury an Kulturtag 6 (*in vivo* 4,5-6,5 Tag p.c.) und ein Maximum an Kulturtag 9. Eine Transkriptionssteigerung von Nkx2.5 als Zeichen der Organogenese wurde ab Kulturtag 11 beobachtet (*in vivo* ab Tag 7.5 p.c), wohingegen in der EB-Kultur schon ein erster Anstieg an Kulturtag 6 zu beobachten war. Die Transkription von  $\alpha$ -MHC begann parallel zur Nkx2.5-Transkription in beiden Kulturen mit einem deutlichen Anstieg an Kulturtag 16, was als Folge der Selektion verstanden wurde. Zur Beurteilung der Reifung ist vielmehr der Quotient aus  $\alpha$ -MHC und  $\beta$ -MHC entscheidend.  $\beta$ -MHC wird in der Maus als fetale Isoform gewertet (Lompre et al. 1984, Siedner, et al. 2003) und eine Verschiebung der MHC-Ratio zu  $\alpha$ -MHC gilt als Zeichen der Reifung. Die Beobachtung einer  $\alpha/\beta$ -MHC-Ratio in EBs und EHM von 1 vs. 3 wurde daher im Sinne eines Hinweises auf eine weitergehende Maturierung in EHM- vs. EB-Kulturen interpretiert. Im Vergleich dazu wird in fetalem und neonatalem Herzgewebe der Maus eine  $\alpha/\beta$ -MHC-Ratio  $<1$  bzw. 20-30 beschreiben (Didie, et al. 2013). Das Ausmaß der Oct-3/4-Transkription, die im EHM gleichbleibend hoch ab Kulturtag 3 gemessen wurde, aber nach der Selektion in den EBs fast nicht mehr messbar war, ist problematisch, da es ein Hinweis für eine unvollständige Selektion und Ausdifferenzierung im EHM ist. Zukünftig sollte die Selektion der

Kardiomyozyten dahingehend verbessert werden, dass das Antibiotikum nicht mehr nur durch Diffusion in das Gewebezentrum gelangen kann.

### 4.3 Reifung in der EB- und EHM-Kultur

Während der Reifungsprozess auf Transkriptionsebene anhand der  $\alpha$ -/ $\beta$ -MHC-Ratio bewertet werden kann (s.o.), zeigten sich auch auf morphologischer Ebene Hinweise für eine Organ-typische Maturierung. Besonders auffällig war die Zellausrichtung und Sarkomerausrichtung in EHM. Dagegen zeigten sich in der EB-Kultur hauptsächlich kleine, runde Zellen mit wenig und kaum ausgerichteteter Querstreifung und runden Zellkernen. Diese Morphologie ist typisch für junge und unreife Kardiomyozyten (Hescheler, et al. 1997). Weiterhin wurden sehr große Zellen mit sternförmigen Ausläufern und kräftiger Aktin- und  $\alpha$ -Actininfärbung gefunden. Die Myofilamente dieser Zellen zeigten eine wellenförmige Querstreifung, deren Anordnung randständig war und keiner biaxialen Ausrichtung folgten, sondern den vielen Ausläufern. Hier fehlte den Zellen der EB-Kultur ein mechanischer Stimulus, der die Ausrichtung der Zellen beeinflusste, sich entlang einer Kraffteinwirkung auszurichten. Gegensätzlich hierzu zeigten sich in der EHM-Kultur elongierte Zellen mit starker Querstreifung und spindelförmigen Zellkernen. Diese Charakteristika sind bezeichnend für atriales und ventrikuläres Arbeitsmyokard (Hescheler, et al. 1997). Die morphologische Entwicklung in der EHM-Kultur wurde auch im Zeitverlauf beobachtet. Während an Kulturtag 3 bestätigt wurde, dass sich auch im EHM zunächst EB-ähnliche Strukturen in der Kollagenmatrix bildeten, konnte schon an Kulturtag 11 eine Verschmelzung der Kolonien und eine Aktin-Anreicherung beobachtet werden (Rogge 2007). An Kulturtag 20 zeigten sich dann große Myokardareale mit einer klaren Ausrichtung parallel zur Kraffteinwirkung. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Last eine entscheidende Rolle bei der Reifung von Kardiomyozyten sowohl im Bezug auf die Qualität als auch auf die Gewebeorganisation spielt. Die großen Reifegradunterschiede in der Morphologie und Transkription sind auch durch einen weiteren Aspekt zu erklären, denn 2011 zeigten Ou et al., dass neben

einem 3-dimensionalen Gewebekonstrukt auch Kollagen Typ I entscheidend für den Reifeprozess der Kardiomyozyten ist (Ou, et al. 2011).

Die funktionelle Analyse der Reifung in der EB-Kultur ergab, wie in der Literatur beschrieben, eine beginnende Kontraktion in den EBs ab Kulturtag 4. 20% der EBs schlugen an Kulturtag 6 mit einer Steigerung auf 100% an Kulturtag 20. Eine stetige Zunahme der Kontraktionen in den EBs zeigte eine anhaltende Differenzierung und eine erfolgreiche Selektion (Boheler, et al. 2002). Ein wichtiger Vorteil der EHM-Kultur ist die Möglichkeit, tatsächliche Kontraktionskräfte messen zu können. Bei den Vorarbeiten konnten erste Kontraktionen an Kulturtag 19 festgestellt werden (Rogge 2007). In dieser Arbeit schlugen 50% der EHM bereits an Kulturtag 16. Ebenso wie bei Rogge schlugen 100% der EHM an Kulturtag 31.

#### **4.4 Beeinflussung der Kardiogenese und Kardiomyozytenreifung durch Last**

Mechanischer Stress ist in der Organogenese ein wichtiger Faktor. Aufgrund des Dehnungsstress durch das Blutvolumen ändern die embryonalen Kardiomyozyten die Form ihres Zytoskeletts und ihre Genexpression (Hove, et al. 2003). Das Herzwachstum ist bis zur Geburt auf die Hyperplasie der Kardiomyozyten zurückzuführen. Anreize zur Zellteilung erhalten die jungen Kardiomyozyten unter anderem auch durch die Wanddehnung, die durch die Volumenlast bedingt ist (Grossman 1980). Für eine erfolgreiche Kardiogenese ist die mechanische Last unabdingbar. Nach der Geburt sind die Kardiomyozyten nur noch begrenzt teilungsfähig (Bergmann, et al. 2009), dennoch kommt es zum Herzwachstum. Dieses Wachstum erfolgt nicht durch Zellteilung (Hyperplasie) sondern durch Hypertrophie, also Längenwachstum und intrazelluläre Volumenzunahme durch Myofibrillenreicherung (Vandenburgh 1996, Schaub, et al. 1997). Auch das erwachsene Herz kann hypertrophieren, jedoch ist die Belastung häufig chronisch und somit pathologisch, was zu einer irreversiblen Schädigung des Myokards mit Funktionsverlust führen kann (Grossman 1980).

In dieser Arbeit wurden verschiedene Belastungen auf das sich entwickelnde EHM an Kulturtag 3 ausgeübt. Der Zeitpunkt, Kulturtag 3, eignete sich gut, da hier in jedem Versuchsprotokoll eine Lastmanipulation stattfand und somit die restliche Kultur ohne weitere Manipulationen erfolgen konnte. Dabei wurden die drei folgenden Bedingungen aufgrund der aufgeführten Überlegungen erprobt. Die L100-EHM waren keiner zusätzlichen Last ausgesetzt, da sie in der gleichen Dehnung wie in der Gusschale kultiviert wurden. Die L150- bzw. L200-EHM wurden hierzu auf 150% und 200% der Ausgangslage gedehnt. Dies entspricht einer Innenumfangszunahme von 10,7 mm auf 16,7 mm und auf 22,7 mm. In vorangegangenen Arbeiten dieses Arbeitskreises wurden grundsätzlich alle EHM auf 16,7 – 20,7 mm Innenumfang gedehnt. Die Differenzierung war auch in diesen Untersuchungen erfolgreich (Rogge 2007, Christalla 2009), dennoch war zu klären, ob der Differenzierungsprozess durch mechanische Last positiv zu beeinflussen ist. Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Berichte über im EHM differenzierte KM, die unter verschiedenen Lastparameter kultiviert und untersucht wurden. Wie erwartet zeigten sich in der Morphologie deutliche Unterschiede in der Gewebestrukturierung. Die L200-EHM zeigten parallel ausgerichtete Kardiomyozyten mit klar erkennbarer Querstreifung, wohingegen mit abnehmender Dehnung die Kardiomyozyten unorganisierter erschienen und die Querstreifung geringer ausgeprägt war. Auf der Ebene der Transkription und kontraktilen Funktion schlugen sich die morphologischen Änderungen allerdings nicht im Sinne einer Funktionsverbesserung nieder. Vielmehr zeigten die basal bereits ‚über‘-dehnten EHM eine größere mechanische Instabilität. Dies äußerte sich im Sinne von EHM-Rissen, die schlussendlich keine Kontraktionskraftmessung zuließen. Keines der L200-EHM konnte ohne Gewebeverletzung auf die Messapparatur überführt werden. Die höchste Kontraktionskraft entwickelten die L100-EHM mit Maximalwerten von 90  $\mu$ N. Die Vermutung, dass die hohe Belastung der L200-EHM bereits in der Differenzierungsphase zu einer schädigenden Hypertrophie führte und sich somit die schlechte Kontraktionskraft erklären würde, konnte anhand der RNA-Daten nicht bestätigt werden, da die Kardiomyozyten jeder Versuchsgruppe ähnliche Mengen an Strukturproteinen pro Zelle transkribierten. Dieses Ergebnis spricht für

eine ähnliche Gewebequalität. In Folgeexperimenten bleibt zu überprüfen, inwiefern eine flexible Aufhängung zur Förderung von auxotonen Kontraktionen (Naito, et al. 2006, Zimmermann, et al. 2006b) eine bessere Grundbedingung zur Herstellung von EHM sein kann.

#### 4.5 EHM als Modell für Vor- und Nachlasterhöhung

Der Herzmuskel ist einer ständigen mechanischen Belastung in Form von Vordehnung, Volumendruck und Entspannung während einer Herzaktion ausgesetzt. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts fanden Frank und Starling heraus, dass der Herzmuskel die Fähigkeit besitzt, eine größere Kontraktionskraft zu erzeugen, wenn die Ventrikel zu Beginn der Herzaktion stärker gefüllt sind (Frank-Starling-Mechanismus). Die vorgedehnten Muskelfasern haben eine erhöhte Kalziumsensibilität und können eine größer Kontraktionskraft erzeugen (Allen und Kentish 1985, Moss und Fitzsimons 2002). Zusätzlich reagieren die Kardiomyozyten auf transkriptioneller und hormoneller Ebene. Bei erhöhter Vorlast wird die Expression der Sarkoendoplasmatischen Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA2a) hochreguliert und folglich vermehrt Kalzium intrazellulär gespeichert (Tada, et al. 1978). Dadurch kann bei der nächsten Systole mehr Kalzium freigesetzt werden, was zur einer gesteigerten Inotropie (Kontraktionskraft) führt (Bavendiek, et al. 1996) Das *brain natriuretic peptide* (BNP) dient als endokrines Schutzhormon des Herzens, da es bei erhöhter Nachlast sehr schnell hochreguliert und freigesetzt wird (Nakagawa, et al. 1995). Über die renale Elimination von Wasser und Elektrolyten kann es eine Senkung der Nachlast bewirken. Heute wird die BNP-Konzentration von der *New York Heart Association* bereits für die Einteilung der Klassifikation der Herzinsuffizienz verwendet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den Kulturablauf der mES-Zell-EHM akute statische Lastveränderungen integriert werden können. Inwiefern diese Belastung einer erhöhten Vor-und/oder Nachlast entspricht, ist schwer festzustellen. Allerdings sollte durch die Erhöhung des EHM-Umfangs eine Art erhöhte Vorlast simuliert werden, wobei diese dann im Gegensatz zur



physiologischen Situation statisch erhöht ist. Diese statische Erhöhung der Last durch die Halter entspricht dann auf der anderen Seite vermutlich mehr einer erhöhten Nachlast, z.B. im Sinne eines erhöhten peripheren Gefäßtonus bei Hypertonie. Während bei einer chronischen Lasterhöhung (s.o.) und auch bei geringfügiger Änderung von Belastung und Entlastung (< 50%) keine Änderungen von Gentranskription und EHM-Funktion nachweisbar waren, zeigten sich bei einer Belastung von >50% sowohl Expressions- als auch Kontraktionskraftänderungen unter maximaler inotroper Stimulation (2,4 mM Ca<sup>2+</sup>). Toischer et al. konnten im Modell der Nachlasterhöhung durch einen portokavalen *Shunt* ebenfalls eine gesteigerte BNP-Expression nachweisen. Dagegen war die SERCA2a-Expression bei Toischer et al. unverändert. In anderen Arbeiten konnte sowohl eine gesteigerte als auch eine verminderte SERCA2a-Expression in Proben aus insuffizienten Herzen nachgewiesen werden (Hasenfuss et al. 1994, del Monte et al. 1999, de Boer et al. 2001, Vangheluwe et al. 2006). Zusammengenommen zeigen die Daten in dieser Arbeit, dass murine EHM sensitiv und vor allem schnell auf Lastveränderungen mit einer Steigerung der BNP-Expression reagieren. Allerdings ist dies unter den untersuchten Bedingungen der statischen Last eher ein transienter Effekt und es bleibt zu klären, ob sich bei einer ‚physiologischen‘ zyklischen Belastung (auxotoner Kontraktion) andere Expressionsmuster einstellen. Der zeitliche Verlauf der BNP-Expression nach Belastung zeigte weiterhin, dass es im hier untersuchten Modell keine Anzeichen für die Entwicklung einer Gewebeinsuffizienz gab, da sich der maximale BNP-Expressionsanstieg nach 2 Stunden im weiteren Verlauf wieder normalisierte. Um die pathologische Gewebeschädigung und die entsprechenden Expressionsänderungen durch die Mehrlast untersuchen zu können, bedarf es zukünftig einer deutlich längeren Kulturzeit als 48 Stunden.

Parallel zur Expressionssteigerung der SERCA2a entwickelten die belasteten EHM tendenziell eine höhere Kontraktionskraft. Diese ist möglicherweise auf diese Expressionssteigerung und vermehrte Kalziumspeicherung zurückzuführen. Zukünftig könnte, wie bereits in Versuchen von Toischer et al. gezeigt wurde, durch die exogene Zugabe von BNP zum Medium (350pg/ml) die SERCA2a-Expressionsteigerung inhibiert und somit eventuell auch die

Kontraktionskraftsteigerung verhindert werden. Diese BNP-Konzentration entspricht durchaus klinischen Beobachtungen, da im klinischen Gebrauch bei einer BNP-Plasmakonzentration  $>100\text{pg/ml}$  die Grenze für die Diagnose einer akuten Herzinsuffizienz gemacht wurde (Maisel et al. 2002, Fonseca et al. 2004). Es werde aber durchaus auch BNP-Werte weit über  $800\text{pg/ml}$  gemessen (Maisel et al. 2003).

Das Fazit dieser Untersuchung ist, dass EHM als akutes Lastmodell Anwendung finden könnten. Inwiefern chronische Lastzustände, so wie sie bei Patienten mit Herzinsuffizienz zu beobachten sind, simuliert werden können, bleibt zu überprüfen. Vermutlich ist dafür die Modifikation des hier etablierten Modells zur Förderung von auxotonischen Kontraktionen gegen flexible Widerstände entscheidend.

#### **4.6 Ausblick**

Das hier etablierte Protokoll zeigt einen attraktiven Weg zur Herstellung von EHM aus undifferenzierten embryonalen Stammzellen auf. Das Protokoll basiert auf einem Kardiogenese-induzierenden 3D-Milieu sowie der Kontrolle des Nicht-Kardiomyozytenwachstums über genetische Selektionsverfahren. Zukünftige Arbeiten sollen untersuchen, ob die Kardiogeneseprozesse in EHM auch direkt durch pharmakologische Intervention gesteuert werden können. In diesem Fall könnten sich EHM auch zur Testung z.B. der Toxizität von Arzneimitteln im Rahmen der Herzentwicklung ebenso eignen, wie für die Identifikation von Arzneistoffen zur Förderung von Herzentwicklung. Ob sich das hier beschriebene Verfahren auch eigenen wird, um Gewebeimplantate für die Herzreparatur herzustellen, bleibt zu prüfen. Nachteilig scheint die inkomplette Elimination von Oct3/4 positiven Stammzellen mit einem Potential der Teratombildung nach Implantation.

## 5 Zusammenfassung

Die Herstellung von EHM aus undifferenzierten murinen ES-Zellen konnte durch multiple Faktoren (Matrigel®-freie Kultur, Supplementierung von Ascorbinsäure zum Medium) sowie Änderungen der Kulturmediumwechsel optimiert und zugleich stabilisiert werden. Die Kardiogenese von undifferenzierten mES-Zellen im EHM- und im EB-Modell zeigt eine große Ähnlichkeit im Entwicklungsverlauf. Hinsichtlich der Herzzellreifung gibt es klare Hinweise auf einen höheren Reifegrad der EHM-Kultur im Vergleich zu EB-Kultur. Im Vergleich zu nativem Myokard scheinen EHM in etwa vergleichbar mit perinatalen Herzmuskelzellen zu sein. Die These dieser Arbeit lautet, dass Änderungen von Lastbedingungen zu spezifischen Änderungen von kontraktile Parametern, Morphologie und Expression kardialer Marker in EHM führen. Diese Arbeit zeigt, dass die EHM sowohl auf transkriptioneller als auch auf funktioneller Ebene eine dem murinen Myokard ähnelnde Anpassungsreaktion an die Belastungssituation zeigen. Die Ausübung von Last auf die undifferenzierten ES-Zellen bewirkt eine Homogenisierung des Gewebeaufbaus durch gleichsinnige Ausrichtung der Zellen entlang der Kraftgradienten. Eine Überbelastung führt jedoch zu funktionellen Gewebeschäden. Zusammenfassend legen die erhobenen Daten nahe, dass sich mES-EHM zur Erforschung sowohl von Mechanismen der Kardiogenese als auch von Auswirkungen biomechanischer Last auf das Herz eignen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

2D	2 dimensional
3D	3 dimensional
AS	Ascorbinsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain natriuretic peptide
C°	Grad Celsius
Ca.	Circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
Casq2	Calsequestrin 2
CEE	<i>chick embryo extract</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diäthylepyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	Embryoid Body
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHM	Engineered Heart Muscles
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdschwerebeschleunigung (9,8m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-4	Transkriptionsfaktor
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HLA	human leukocyte antigene
isl-1	Transkriptionsfaktor
ITS-1	Insulin Transferrin Selen 1%
KM	Kardiomyozyten

---

LIF	Leukaemia inhibitory factor
M	Mol
MEF	murine embryonale Fibroblasten
mES	murine embryonale Stammzellen
Mesp-1	Transkriptionsfaktor
min	Minute
MMC	Mitomycin C
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na <sup>2+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumsäure
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
NeoR	Neomycin-Resistenz
Nkx2.5	Transkriptionsfaktor
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
o.g.	oben genannt
Oct-3/4	Transkriptionsfaktor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RT	Raumtemperatur
SERCA2a	Sarkoendoplasmatische Retikulum ATP-ase 2a
SR	Sarkoendoplasmatisches Retikulum
SZ	Stammzelle
T3	Trijodthyronin
TT	<i>Twitching Tension</i>
U	<i>Unit</i> /Enzymeinheit
z.B.	zum Beispiel
αMHC	Transkriptionsfaktor: alpha Myosin Schwere Kette
βMHC	Transkriptionsfaktor: beta Myosin Schwere Kette

### 6.1.1 Primer und PRC-Bedingungen

Tab.1: Quantitative PCR-Bedingungen und Primersequenzen

PCR-Schritte	Temperatur (C°)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Schritt 1	50	02:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3	95	00:15	40
	60	01:00	

Primer	Primersequenz (5'-3')
$\alpha$ MHC-for	GCTACAATCGGAAATAG
$\alpha$ MHC-rev	CCCTATGCTCAATGC
$\beta$ MHC-for	GACCAGACCCCAGGCAAGGG
$\beta$ MHC-rev	GCCAAC TTTCTGTTGCCCC
Brachy-for	AGCAAGAAAGAGTACATGGCATTG
Brachy-rev	GCAGCGAGAAGGGAGACC
GAPDH-for	ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG
GAPDH-rev	GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA
Nkx2.5-for	CTTTGTCCAGCTCCACTGC
Nkx2.5-rev	CAAGTGCTCTCCTGCTTTCC
Oct-3/4-for	GCCCCAATGCCGTGAAG
Oct-3/4-rev	CAGCAGCTTGGCAA ACTGTTC
SERCA2a-for	TGGAACAACCCGGTAAAGAGT
SERCA2a-rev	CACCAGGGGCATAATGAGCAG
BNP-for	CCAGTCTCCAGAGCAATTCAA
BNP-rev	AGCTGTCTCTGGGCCATTTTC
Casq2-for	CTGGCA TGCTGTTTGTACTG
Casq2-rev	GGGGGCTCATGGTAGAGGAG

### 6.1.2 Antikörper

Tab.2: Verwendete Antikörper mit eingesetzter Verdünnung

Primäre Antikörper:

Antikörper	Verd.	Firma	Spezies	Klon
$\alpha$ -Aktinin	1:800	Sigma	Maus	EA-53

Sekundäre Antikörper:

Antikörper	Verd.	Firma	Spezies	Klon
Anti-Maus IgG Alexa 488	1:250	Molecular Probes	Ziege	polyklonal

## 7 Literaturverzeichnis

Ahmed A (2003) American College of Cardiology/American Heart Association Chronic Heart Failure Evaluation and Management guidelines: relevance to the geriatric practice. 51:123-6.

Allen DG and Kentish JC (1985) The cellular basis of the length-tension relation in cardiac muscle. 17:821-40.

Armbrüster I (2008) Konstruktion von künstlichem Herzgewebe aus Herzzellen der Maus.

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S and Zeiher AM (2002) Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). 106:3009-17.

Battista S, Guarnieri D, Borselli C, Zeppetelli S, Borzacchiello A, Mayol L, Gerbasio D, Keene DR, Ambrosio L and Netti PA (2005) The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation. 26:6194-207.

Bavendiek U, Brixius K, Frank K, Reuter H, Pietsch M, Gross A, Muller-Ehmsen J, Erdmann E and Schwinger RH (1996) Altered inotropism in the failing human myocardium. 91 Suppl 2:9-16.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S and Frisen J (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. 324:98-102.

Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. 70:23-49.

Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV and Wobus AM (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. 91:189-201.

Christalla P (2009) Entwicklung von bioartifiziellem Herzgewebe aus parthenogenetischen Stammzellen der Maus. Biol. Diss. Hamburg 2009.

Christalla P, Hudson JE and Zimmermann WH (2011) The cardiogenic niche as a fundamental building block of engineered myocardium. 195:82-93.

de Boer RA, Henning RH, Suurmeijer AJ, Pinto YM, Olthof E, Kirkels JH, van Gilst WH, Crijns HJ and van Veldhuisen DJ (2001) Early expression of natriuretic peptides and SERCA in mild heart failure: association with severity of the disease. 78:5-12.



- de Groot IJ, Lamers WH and Moorman AF (1989) Isomyosin expression patterns during rat heart morphogenesis: an immunohistochemical study. 224:365-73.
- del Monte F, Harding SE, Schmidt U, Matsui T, Kang ZB, Dec GW, Gwathmey JK, Rosenzweig A and Hajjar RJ (1999) Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. 100:2308-11.
- Didié M (2004) Über die Anwendung von Engineered Heart Tissue (EHT) als kardialer Gewebeersatz in einem syngenem Rattenmodell.
- Didie M, Christalla P, Rubart M, Muppala V, Doker S, Unsold B, El-Armouche A, Rau T, Eschenhagen T, Schwoerer AP, Ehmke H, Schumacher U, Fuchs S, Lange C, Becker A, Tao W, Scherschel JA, Soonpaa MH, Yang T, Lin Q, Zenke M, Han DW, Scholer HR, Rudolph C, Steinemann D, Schlegelberger B, Kattman S, Witty A, Keller G, Field LJ and Zimmermann WH (2013) Parthenogenetic stem cells for tissue-engineered heart repair. 123:1285-98.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W and Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. 87:27-45.
- Eschenhagen T, Didie M, Munzel F, Schubert P, Schneiderbanger K and Zimmermann WH (2002) 3D engineered heart tissue for replacement therapy. 97 Suppl 1:1146-52.
- Evans MJ and Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. 292:154-6.
- Everett AW (1986) Isomyosin expression in human heart in early pre- and post-natal life. 18:607-15.
- Fitzsimons DP and Moss RL (1998) Strong binding of myosin modulates length-dependent Ca<sup>2+</sup> activation of rat ventricular myocytes. 83:602-7.
- Fonseca C, Sarmiento PM, Minez A, Goncalves E, Covas R, Dias AR, Pina MJ and Ceia F (2004) Comparative value of BNP and NT-proBNP in diagnosis of heart failure. 23:979-91.
- Garbade J, Bittner HB, Barten MJ and Mohr FW (2011) Current trends in implantable left ventricular assist devices. 2011:290561.
- Gordon AM, Homsher E and Regnier M (2000) Regulation of contraction in striated muscle. 80:853-924.
- Gorza L, Mercadier JJ, Schwartz K, Thornell LE, Sartore S and Schiaffino S (1984) Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied atrial and ventricular myocardium. 54:694-702.

- Grossman W (1980) Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process? 69:576-84.
- Hasenfuss G, Mulieri LA, Blanchard EM, Holubarsch C, Leavitt BJ, Littleman F and Alpert NR (1991) Energetics of isometric force development in control and volume-overload human myocardium. Comparison with animal species. 68:836-46.
- Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, Holubarsch C, Posival H, Just H and Drexler H (1994) Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. 75:434-42.
- Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM and Addicks K (1997) Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. 36:149-62.
- Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB and Levy D (1993) The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. 22:6A-13A.
- Hove JR, Koster RW, Forouhar AS, Acevedo-Bolton G, Fraser SE and Gharib M (2003) Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. 421:172-7.
- Hughes CS, Postovit LM and Lajoie GA (2010) Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. 10:1886-90.
- Izumo S, Nadal-Ginard B and Mahdavi V (1988) Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. 85:339-43.
- Kang PM, Yue P, Liu Z, Tarnavski O, Bodyak N and Izumo S (2004) Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. 287:H72-80.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J and Gepstein L (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. 108:407-14.
- Kispert A and Herrmann BG (1994) Immunohistochemical analysis of the Brachyury protein in wild-type and mutant mouse embryos. 161:179-93.
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY and Field LJ (1996) Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. 98:216-24.
- Kogler H, Schott P, Toischer K, Milting H, Van PN, Kohlhaas M, Grebe C, Kassner A, Domeier E, Teucher N, Seidler T, Knoll R, Maier LS, El-Banayosy A, Korfer R and Hasenfuss G (2006) Relevance of brain natriuretic peptide in preload-dependent regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase expression. 113:2724-32.

- Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR and Lawley TJ (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. 107:1589-98.
- Kuzmenkin A, Liang H, Xu G, Pfannkuche K, Eichhorn H, Fatima A, Luo H, Saric T, Wernig M, Jaenisch R and Hescheler J (2009) Functional characterization of cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells in vitro. 23:4168-80.
- Lang KC, Lin IH, Teng HF, Huang YC, Li CL, Tang KT and Chen SL (2009) Simultaneous overexpression of Oct4 and Nanog abrogates terminal myogenesis. 297:C43-54.
- le Noble F, Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Djonov V, Matthijsen R, Breant C, Fleury V and Eichmann A (2004) Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. 131:361-75.
- Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F and Stuhlmann H (1999) Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. 284:67-81.
- Lee EJ, Peng J, Radke M, Gotthardt M and Granzier HL (2010) Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice. 49:449-58.
- Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J and Langer R (2003) Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. 100:12741-6.
- Lompre AM, Nadal-Ginard B and Mahdavi V (1984) Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. 259:6437-46.
- Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L and Harvey RP (1995) Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. 9:1654-66.
- Mahdavi V, Lompre AM, Chambers AP and Nadal-Ginard B (1984) Cardiac myosin heavy chain isozymic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability. 5 Suppl F:181-91.
- Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA and Breathing Not Properly Multinational Study I (2002) Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. 347:161-7.

- Maisel AS, McCord J, Nowak RM, Hollander JE, Wu AH, Duc P, Omland T, Storrow AB, Krishnaswamy P, Abraham WT, Clopton P, Steg G, Aumont MC, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kamin R, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA and Breathing Not Properly Multinational Study I (2003) Bedside B-Type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure with reduced or preserved ejection fraction. Results from the Breathing Not Properly Multinational Study. 41:2010-7.
- McGrew SG, Wolleben C, Siegl P, Inui M and Fleischer S (1989) Positive cooperativity of ryanodine binding to the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from heart and skeletal muscle. 28:1686-91.
- Morganroth J, Maron BJ, Henry WL and Epstein SE (1975) Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. 82:521-4.
- Moss RL and Fitzsimons DP (2002) Frank-Starling relationship: long on importance, short on mechanism. 90:11-3.
- Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L, Whittaker P, Dow JS, Long TI, Laird PW and Kloner RA (2002) Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. 105:1720-6.
- Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Ophhof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R and Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. 107:2733-40.
- Murphy CL and Polak JM (2002) Differentiating embryonic stem cells: GAPDH, but neither HPRT nor beta-tubulin is suitable as an internal standard for measuring RNA levels. 8:551-9.
- Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T and Zimmermann WH (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. 114:172-8.
- Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, Suga S, Komatsu Y, Kishimoto I, Nishino K, Yoshimasa T and Nakao K (1995) Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. 96:1280-7.
- Ng WA, Grupp IL, Subramaniam A and Robbins J (1991) Cardiac myosin heavy chain mRNA expression and myocardial function in the mouse heart. 68:1742-50.
- Nicosia RF and Ottinetti A (1990) Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. 26:119-28.

- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A and Anversa P (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. 410:701-5.
- Ou DB, He Y, Chen R, Teng JW, Wang HT, Zeng D, Liu XT, Ding L, Huang JY and Zheng QS (2011) Three-dimensional co-culture facilitates the differentiation of embryonic stem cells into mature cardiomyocytes. 112:3555-62.
- Palmieri SL, Peter W, Hess H and Scholer HR (1994) Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. 166:259-67.
- Parmley WW and Chuck L (1973) Length-dependent changes in myocardial contractile state. 224:1195-9.
- Pelliccia A, Maron BJ, Spataro A, Proschan MA and Spirito P (1991) The upper limit of physiologic cardiac hypertrophy in highly trained elite athletes. 324:295-301.
- Prasse A, Waller C, Passlick B and Muller-Quernheim J (2010) [Lung cancer from the perspective of internal medicine and surgery]. 50:662-8.
- Radisic M, Park H, Gerecht S, Cannizzaro C, Langer R and Vunjak-Novakovic G (2007) Biomimetic approach to cardiac tissue engineering. 362:1357-68.
- Ringer S (1883) A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. 4 29-42.
- Rogge (2007) Entwicklung und Charakterisierung eines neuen in vitro-Herzmuskelmodells aus embryonalen Stammzellen. Chem. Diss. Hamburg 2007.
- Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T and Robbins J (1991) Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study. 266:22419-26.
- Schaub MC, Hefti MA, Harder BA and Eppenberger HM (1997) Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. 75:901-20.
- Shapiro LM, Kleinebenne A and McKenna WJ (1985) The distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy: comparison to athletes and hypertensives. 6:967-74.
- Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Akutsu T, Setomaru T, Abe K, Kikuchi A, Umezu M and Okano T (2002) Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. 90:e40.
- Siedner S, Kruger M, Schroeter M, Metzler D, Roell W, Fleischmann BK, Hescheler J, Pfitzer G and Stehle R (2003) Developmental changes in contractility

and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart. 548:493-505.

Sinescu C and Axente L (2011) Heart failure--concepts and significance. Birth of a prognostic model. 3:421-9.

Soong PL, Tiburcy M and Zimmermann WH (2012) Cardiac differentiation of human embryonic stem cells and their assembly into engineered heart muscle. Chapter 23:Unit23 8.

Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG and Field LJ (1994) Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. 264:98-101.

Swynghedauw B (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. 79:215-62.

Tachampa K, Wang H, Farman GP and de Tombe PP (2007) Cardiac troponin I threonine 144: role in myofilament length dependent activation. 101:1081-3.

Tada M, Yamamoto T and Tonomura Y (1978) Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. 58:1-79.

Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR and Lee RT (2003) Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. 107:1912-6.

Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD and Kraus WE (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. 4:929-33.

Thiedemann KU, Holubarsch C, Medugorac I and Jacob R (1983) Connective tissue content and myocardial stiffness in pressure overload hypertrophy. A combined study of morphologic, morphometric, biochemical, and mechanical parameters. 78:140-55.

Thomson JA and Marshall VS (1998) Primate embryonic stem cells. 38:133-65.

Tiburcy M, Didie M, Boy O, Christalla P, Doker S, Naito H, Karikkineth BC, El-Armouche A, Grimm M, Nose M, Eschenhagen T, Zieseniss A, Katschinski DM, Hamdani N, Linke WA, Yin X, Mayr M and Zimmermann WH (2011) Terminal differentiation, advanced organotypic maturation, and modeling of hypertrophic growth in engineered heart tissue. 109:1105-14.

Toischer K, Teucher N, Unsold B, Kuhn M, Kogler H and Hasenfuss G (2010) BNP controls early load-dependent regulation of SERCA through calcineurin. 105:795-804.

Vandenburgh (1996) Mechanical stimulation of organogenic cardiomyocyte growth in vitro. 270:1284-92.

Vangheluwe P, Tjwa M, Van Den Bergh A, Louch WE, Beullens M, Dode L, Carmeliet P, Kranias E, Herijgers P, Sipido KR, Raeymaekers L and Wuytack F (2006) A SERCA2 pump with an increased Ca<sup>2+</sup> affinity can lead to severe cardiac hypertrophy, stress intolerance and reduced life span. 41:308-17.

Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD and Carpenter MK (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. 19:971-4.

Zandstra PW, Bauwens C, Yin T, Liu Q, Schiller H, Zweigerdt R, Pasumarthi KB and Field LJ (2003) Scalable production of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. 9:767-78.

Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M and Eschenhagen T (2006a) Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. 71:419-29.

Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M and Eschenhagen T (2002a) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. 106:1151-7.

Zimmermann WH and Eschenhagen T (2003) Cardiac tissue engineering for replacement therapy. 8:259-69.

Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J and Eschenhagen T (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. 68:106-14.

Zimmermann WH, Melnychenko I and Eschenhagen T (2004) Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. 25:1639-47.

Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H and Eschenhagen T (2006b) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. 12:452-8.

Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL and Eschenhagen T (2002b) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. 90:223-30.

## **8 Danksagung**

Hiermit möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Wolfram-Hubertus Zimmermann, Leiter des Instituts für Pharmakologie der Universität Göttingen, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Peter Christalla für die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft während der experimentellen Phase der Arbeit bedanken. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken. Des Weiteren möchte ich mich für die kritischen Diskussionen, die Unterstützung und Planung der Experimente bei allen ehemaligen Kollegen der Abteilung für Pharmakologie ins Besondere Prof. Dr. Ali El-Armouche, Dr. Michael Didié und Dr. rer. nat. Poo Loong Soong bedanken.