

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für
experimentelle Medizin

Institut der Universität München

Direktorin: Prof. Dr. Daphne Merkus

***Ein optogenetischer Ansatz zur funktionserhaltenden
Langzeitkultur von organotypischen Schnittpräparaten des
Myokards***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Carola Hildegard Fischer

aus

Weiden i. d. Opf.

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. Andreas Dendorfer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Theiss

Prof. Dr. Christian Kupatt

PD Dr. Jens Heyn

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2023

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

FISCHER, C., MILTING, H., FEIN, E., REISER, E., LU, K., SEIDEL, T., SCHINNER, C., SCHWARZMAYR, T., SCHRAMM, R., TOMASI, R., HUSSE, B., CAO-EHLKER, X., POHL, U. & DENDORFER, A. 2019. Long-term functional and structural preservation of precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation in vitro. *Nat Commun*, 10, 117.

CAO-EHLKER, X., FISCHER, C., LU, K., BRUEGMANN, T., SASSE, P., DENDORFER, A. & TOMASI, R. 2023. Optimized Conditions for the Long-Term Maintenance of Precision-Cut Murine Myocardium in Biomimetic Tissue Culture. *Bioengineering (Basel)*, 10.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	8
2	Abstract.....	9
3	Abbildungsverzeichnis.....	10
4	Tabellenverzeichnis.....	12
5	Abkürzungsverzeichnis.....	13
6	Einleitung.....	14
6.1	Notwendigkeit aussagekräftiger Modellsysteme für die Arzneimittelentwicklung ..	14
6.2	Etablierte in vitro-Modelle in der Herzforschung.....	14
6.2.1	Isolierte adulte oder artifiziell differenzierte Kardiomyozyten.....	14
6.2.2	Organ- und Gewebepräparate.....	15
6.2.3	Vorteile von genetischen Modellsystemen.....	15
6.3	Organotypische Herzgewebeschnitte.....	16
6.3.1	Vorteile von Gewebeschnitten als Modellsystem.....	16
6.3.2	Langzeitkultivierung der Herzgewebeschnitte.....	17
6.4	Ziel der Arbeit.....	17
7	Material.....	18
7.1	Versuchstiere.....	18
7.2	Geräte.....	18
7.3	Verbrauchsmaterial.....	19
7.4	Chemikalien und Reagenzien.....	19
7.5	Antikörper.....	20
7.6	Lösungen.....	21
8	Methoden.....	23
8.1	Herstellung von Gewebeschnitten aus Mäuseherzen.....	23
8.1.1	Vorarbeiten.....	23
8.1.2	Versuchstiere.....	23

8.1.3	Narkose und Herzpräparation.....	23
8.1.4	Schneiden der Mäuseherzen.....	24
8.2	Kultivierung der Herzgewebeschnitte	25
8.2.1	Kultivierung unter mechanischer Entlastung auf Membranoberflächen.....	25
8.2.2	Kultivierung mit isometrischer Aufhängung.....	26
8.2.3	Kultivierung mit elastischer Aufhängung	27
8.2.4	Kultivierung unter elastischen Bedingungen mit optogenetischer Stimulation .	29
8.2.5	Auswertung	31
8.3	Kraftmessung im Organbad.....	31
8.3.1	Aufbau und Funktionsweise.....	31
8.3.2	Messprotokoll.....	33
8.3.3	Auswertung	35
8.4	MTT-Vitalitätsmessung.....	36
8.4.1	Prinzip	36
8.4.2	Färbung.....	36
8.4.3	Morphologische Beurteilung.....	36
8.5	Immunhistologie und Kernfärbung.....	37
8.5.1	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung.....	37
8.5.2	Vorbereitungen.....	37
8.5.3	Mikroskopie und Auswertung.....	38
8.6	PCR.....	39
8.6.1	Prinzip der Real-Time qPCR.....	39
8.6.2	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	40
8.6.3	Real-Time quantitative PCR	40
8.7	Darstellung und Statistik	41
9	Ergebnisse	42
9.1	Optimierung der Präparationstechnik	42

9.2	Etablierung und Vergleich verschiedener mechanischer Kulturbedingungen.....	42
9.2.1	Vitalität.....	43
9.2.2	Steigerung der Kontraktilität unter β -adrenerger Stimulation.....	44
9.2.3	Kraft-Frequenz-Beziehung.....	45
9.2.4	Maximale Kontraktionskraft	45
9.2.5	Gewebeelastizität.....	46
9.3	Etablierung der Gewebekultur mit kontinuierlicher mechanischer Aktivität.....	47
9.3.1	Entwicklung der Kontraktilität.....	48
9.3.2	Tonische Kontraktur.....	49
9.3.3	Entwicklung der Reizschwelle	50
9.3.4	Strukturelle Veränderungen der Gewebeschnitte.....	51
9.4	Erprobung protektiver Bedingungen	54
9.4.1	Oxidationsschutz durch β -Mercaptoethanol.....	55
9.4.2	Verbesserung der Sauerstoffversorgung	55
9.5	Simulation pathophysiologischer Einflüsse.....	57
9.6	Auswirkung verschiedener Kulturbedingungen auf die Genexpression	57
10	Diskussion.....	59
10.1	Stand der Technik der Herstellung und Kultivierung von organotypischen Herzgewebeschnitten.....	59
10.2	Etablierung optimaler Kulturbedingungen.....	60
10.2.1	Bedeutung der mechanischen Belastung.....	60
10.2.2	Möglichkeit der kontinuierlichen Stimulation und Kraftmessung.....	62
10.2.3	Bedeutung der Sauerstoffversorgung und der Verminderung von oxidativem Stress bei der Gewebekultivierung	63
10.2.4	Veränderung der Reizweiterleitung während der Kultur	65
10.3	Simulation eines pathophysiologischen Zustandes.....	66
10.4	Limitationen	67
10.5	Ausblick	68

11	Literaturverzeichnis	70
12	Danksagung.....	76
13	Affidavit.....	77
14	Publikationsliste	78

1 Zusammenfassung

In der kardiovaskulären Grundlagenforschung und Arzneimittelentwicklung nehmen Modellsysteme einen großen Stellenwert ein. Dünne Schnitte aus kardialem Gewebe vereinen hierbei die Vorteile von isolierten Herzmuskelzellen und komplexen Herzpräparaten und ermöglichen Untersuchungen auf molekularer, subzellulärer und zellulärer Ebene. Solche Gewebeschnitte sind bislang nicht für Langzeitstudien verfügbar, da sie in einer normalen Gewebekultur schnell degenerieren. In dieser Arbeit sollen biomimetische Bedingungen entwickelt und optimiert werden, unter denen die Struktur und Funktion des Gewebes in Kultur erhalten bleiben.

Für diese Studien wurden Gewebeschnitte aus Mäuseherzen hergestellt, die verschiedensten mechanischen Belastungen ausgesetzt wurden. Die Anwendung einer diastolischen Gewebespannung im physiologischen Bereich des Mäuseherzens zeigte eine deutliche positive Auswirkung auf den Erhalt der Kontraktilität der Schnitte. Die zusätzliche Verminderung von oxidativem Stress durch Zugabe von β -Mercaptoethanol und die Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes bewirkten sogar einen Anstieg der Kontraktionskraft im Verlauf einer 2-tägigen Kultur. Zur Verminderung der Inaktivitätsatrophie wurde außerdem eine optogenetische Stimulation der Gewebeschnitte etabliert, die makroskopisch sichtbare Kontraktionen auslöste, welche kontinuierlich registriert werden konnten. Obwohl strukturelle Veränderungen der Schnittpräparate nicht beobachtet wurden, induzierte die Kultur jedoch deutliche Expressionsänderungen wichtiger kardiomyozytärer Strukturgene.

Es konnte demnach gezeigt werden, dass biomimetische Kulturbedingungen das Überleben von murinem Myokard in vitro ermöglichen. Dies bildet die Basis für neue physiologische und pharmakologische Untersuchungen, sowie für weitergehende Optimierungen, die den Gewebeumbau der Präparate gänzlich verhindern könnten.

2 Abstract

Model systems play an important role in basic cardiovascular research and drug development. Thin sections of cardiac tissue combine the advantages of isolated myocardial cells and complex heart preparations and allow investigations on the molecular, subcellular and cellular level. Such tissue sections are not yet available for long-term studies because they degenerate rapidly in normal tissue culture. In this work, we aimed to develop and optimize biomimetic conditions under which tissue structure and function are preserved in culture.

For these studies, tissue sections were prepared from mouse hearts subjected to a wide variety of mechanical stresses. Application of diastolic tissue tension in the physiological range of the mouse heart showed a significant positive effect on preserving the contractility of the sections. The additional reduction of oxidative stress by the addition of β -mercaptoethanol and the improvement of tissue oxygenation even caused an increase in contractility over the course of a 2-day culture. To reduce inactivity atrophy, optogenetic stimulation of the tissue sections was also established, which triggered macroscopically visible contractions that could be recorded continuously. However, although structural changes of the slice preparations were not observed, the culture induced significant expression changes of important cardiomyocyte structural genes.

Thus, it could be shown that biomimetic culture conditions enable the survival of murine myocardium in vitro. This provides the basis for new physiological and pharmacological studies, as well as for further optimization that could prevent tissue remodeling of the preparations completely.

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mäuseherz in Low Melt Agarose.....	24
Abbildung 2: Kultivierung eines Gewebeschnittes unter mechanischer Entlastung auf einer Membranoberfläche.....	25
Abbildung 3: Kulturschälchen mit isometrischer Aufhängung eines Herzmuskelschnittes. ...	26
Abbildung 4: Berechnung der Federkonstante des 0,270 mm dicken Wolframdrahtes.....	27
Abbildung 5: Kulturschälchen mit elastischer Aufhängung eines Herzschnittes.	29
Abbildung 6: Aufbau eines Kulturschälchens für die Aufzeichnung der Kontraktionskraft der Gewebeschnitte.	30
Abbildung 7: Anordnung der Kulturschälchen mit Verbindung zu einem Microcontroller...	30
Abbildung 8: Aufbau des Organbads des Typs „Mayflower“ (Hugo Sachs Elektronik).....	33
Abbildung 9: Morphologische Beurteilung der Vitalität der Gewebeschnitte.....	37
Abbildung 10: Einfluss der Verwendung verschiedener Rasierklingen bei der Präparation auf die Kontraktionskraft der frischen Herzwesbeschnitte.	42
Abbildung 11: MTT-Färbung eines entlastet (A) und eines unter isometrischen Bedingungen kultivierten Gewebeschnittes (B).	43
Abbildung 12: Einfluss der Kulturbedingungen auf den Erhalt der Vitalität der Herzmuskelschnitte.	44
Abbildung 13: Testung der β -Rezeptor-vermittelten Inotropie der Gewebepräparate.....	44
Abbildung 14: Kraft-Frequenz-Beziehung der frischen und der unter elastischen Bedingungen kultivierten Herzmuskelschnitte.....	45
Abbildung 15: Maximale Kontraktionskraft der frischen und der kultivierten Herzmuskelschnitte.	46
Abbildung 16: Vergleich der Gewebeelastizität der frischen und der kultivierten Herzmuskelschnitte.	47
Abbildung 17: Daueraufzeichnung der Kontraktionskraft eines Gewebeschnittes während optogenetischer Stimulation.	48
Abbildung 18: Einfluss der Stimulation mit verschiedenen Frequenzen auf den Krafterhalt der Gewebeschnitte.	49
Abbildung 19: Einfluss der Stimulation mit verschiedenen Frequenzen auf die Höhe der tonischen Kontraktur der Herzmuskelschnitte.	50
Abbildung 20: Entwicklung der Reizschwelle der Gewebeschnitte im Verlauf der Kultur. ...	51

Abbildung 21: Vergleich der Anordnung der Sarkomere nach immunhistologischer Färbung der Myofibrillen (rot) und der Zellkerne (blau) in den Herzmuskelzellen eines frischen und eines kultivierten Gewebeschnittes mit der Vorspannkraft von 0,3 mN.....	52
Abbildung 22: Einfluss der verschiedenen Kulturbedingungen auf die Sarkomerlänge der Herzmuskelzellen.	53
Abbildung 23: Immunhistologische Färbung zum Vergleich der Verteilung von Connexin-43 (hellgrün) entlang der Zellmembran der Herzmuskelzellen in frischen (A) und unter verschiedenen Bedingungen kultivierten (B) Gewebeschnitten.	54
Abbildung 24: Einfluss der Substanz β -Mercaptoethanol auf den Gewebeerhalt während der Kultur.	55
Abbildung 25: Einfluss der stärkeren Konvektion von Sauerstoff im Kulturmedium durch den Schüttler „Rapid Rocker“ auf den Krafterhalt und die Ausbildung der tonischen Kontraktur stimulierter Gewebeschnitte.	56
Abbildung 26: Krafterhalt und Ausbildung der tonischen Kontraktur der unstimulierten und stimulierten Schnitte während der Kultivierung auf dem Schüttler „Rapid Rocker“.	56
Abbildung 27: Einfluss von Angiotensin II auf die Entwicklung der Kontraktionskraft der stimulierten Gewebeschnitte während der Kultur.	57
Abbildung 28: mRNA-Niveau kardialer Gene in den frischen und kultivierten Herzmuskelschnitten.	58

4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stimulationsprotokoll zur Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung der Gewebeschnitte.	34
Tabelle 2: Exzitations- und Emissionswellenlängen des Farbstoffs ToPro-3 bzw. der verwendeten Sekundär-Antikörper.....	38
Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer.	41

5 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ATP	Adenosintri-phosphat
β-ME	β-Mercaptoethanol
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
dest.	destillata
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double-stranded deoxyribonucleic acid
EC ₅₀	mittlere effektive Dosis
F _v	Vorspannkraft
FFR	Force-Frequency-Relationship
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
LED	lichtemittierende Diode
mRNA	messenger ribonucleic acid
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromid
MW	Mittelwert
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
n	Anzahl durchgeführter Versuche
n.e.	nicht erfasst
n.s.	nicht signifikant
PBS-Puffer	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotations per minute
RR	Rapid Rocker
SEM	standard error of the mean
Vol%	Volumenprozent

6 Einleitung

6.1 Notwendigkeit aussagekräftiger Modellsysteme für die Arzneimittelentwicklung

Weltweit sterben jährlich mehr Menschen an Herz-/Kreislaufkrankungen als an anderen Krankheiten (WHO, 2020). Für die erkrankten Patienten ist eine frühe Erkennung und Behandlung in Form von Medikamenten wichtig, um das Mortalitätsrisiko zu reduzieren (WHO, 2015). Die in der Klinik verwendeten Medikamente basieren jedoch auf sehr alten Ideen und bedürfen neuer Ansätze (Kang et al., 2016), weswegen die Entwicklung neuer Arzneimittel auf diesem Gebiet unerlässlich ist.

Damit neue Wirkstoffe als Medikamente zugelassen werden können, bedarf es präklinischer Studien und einer anschließenden klinischen Phase der Testung.

In den präklinischen Studien werden zunächst die Wirksamkeit und die Toxizität der Substanzen an Modellsystemen untersucht. Je mehr dabei diese dem menschlichen Organismus gleichen, desto effizienter ist die Auswahl der Prüfsubstanzen für die klinische Phase. Ein wichtiger Punkt ist hierbei die Vermeidung unnötiger Kosten, was dazu beitragen kann, dass die Arzneimittelentwicklung auch in Zukunft finanziell tragbar bleibt. Jedoch nicht nur aus wirtschaftlicher Sicht ist die starke Selektion der Wirkstoffe vor der klinischen Phase wichtig. Das Erkennen von für den Menschen toxischen Wirkungen in der präklinischen Periode vermindert die Risiken, denen die Probanden letztendlich ausgesetzt sind und spielt somit eine tragende Rolle bei der Patientensicherheit.

Demnach ist es äußerst sinnvoll und erstrebenswert, die Erforschung effektiver Modellsysteme für die präklinische Phase der kardiovaskulären Arzneimittelentwicklung voranzutreiben.

6.2 Etablierte in vitro-Modelle in der Herzforschung

6.2.1 Isolierte adulte oder artifiziell differenzierte Kardiomyozyten

Das einfachste Modellsystem eines Organs stellen dessen isolierte Zellen dar. Enzymatisch isolierte adulte Myozyten bieten ein hohes Potenzial für verschiedenste Arten von Untersuchungen, entdifferenzieren jedoch in Kultur und bilden darüber hinaus keine interzellulären Verbindungen, wodurch sie für die Untersuchung von Erregungsleitung und pharmakologischen Einwirkungen unbrauchbar sind (Camelliti et al., 2011).

Aus artifiziell differenzierten Kardiomyozyten, die von embryonalen oder induziert pluripotenten Stammzellen abgeleitet wurden, können Monolayer hergestellt werden (Gopalan et al., 2003). Nach der Bildung von Monolayern stellen die isolierten Zellen eine homogene Zellpopulation dar, was eine gute Kontrollierbarkeit mit sich bringt. Die Zellen besitzen jedoch nicht alle essenziellen Eigenschaften von adulten Herzmuskelzellen sowie deren interzelluläre Kontakte (Harding et al., 2007) und trotz der Möglichkeit der Einbettung anderer für die kardiale Funktion wichtiger Zelltypen wie Fibroblasten (Camelliti et al., 2006) werden letztendlich nicht die genauen strukturellen und funktionellen Eigenschaften des menschlichen Myokards generiert (Camelliti et al., 2005).

In Anbetracht der großen Relevanz des plötzlichen Herztods durch elektrophysiologische Störungen wie zum Beispiel Kammerflimmern wird die Notwendigkeit von multizellulären Modellen mit erhaltenen interzellulären Kontakten klar (de Boer et al., 2009).

6.2.2 Organ- und Gewebepräparate

Die native Gewebezusammensetzung ist bei Verwendung von isoliertem Myokard in Form von exzidierten Trabekeln (Jost et al., 2005), Papillarmuskeln (Ohler und Ravens, 1994) oder ventrikulären Gewebepräparaten (Glukhov et al., 2010) gegeben.

Präparate aus Trabekeln und Papillarmuskeln behalten ihre native mehrzellige Organisation bei, sind jedoch auf die endokardiale Oberfläche des Herzens beschränkt und haben häufig einen Durchmesser von mehr als 400 μm , was die Diffusion von Nährstoffen ins Gewebe erschwert und dadurch zu einer eingeschränkten Lebensfähigkeit des Gewebes führen kann (Barclay, 2005). Für die Herstellung von ventrikulären Keilpräparaten (Glukhov et al., 2010) sind große Gewebelöcke erforderlich. Die geringe Verfügbarkeit von explantierten humanen Herzen begrenzt jedoch die Herstellung der aufwendig perfundierten Modellsysteme.

Eine besondere Stellung nimmt das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff ein, in welchem die organotypische Funktion des gesamten Organs komplett erhalten ist. Dies ermöglicht die Erhebung von multiplen kardialen Parametern in Echtzeit (Bell et al., 2011) und wird daher häufig genutzt. Allen diesen Gewebepräparaten ist gemeinsam, dass sie nicht stabil in Kultur gehalten werden können und nur wenige Stunden für Experimente zur Verfügung stehen.

6.2.3 Vorteile von genetischen Modellsystemen

In Zellkulturen und auch in komplexeren Modellsystemen ist es möglich, die Funktionen von Genen zu modifizieren, auszuschalten oder neue Gene mit veränderten Funktionen einzubringen. Während in Zellkulturen die Untersuchung des Einflusses genetischer

Veränderungen auf nur einen Zelltyp beschränkt ist, bieten komplexere tierische Modellsysteme die Möglichkeit, die Wirkungen der Veränderung eines Gens auf ein ganzes Organ oder den gesamten Organismus zu untersuchen (Lee et al., 2017).

6.3 Organotypische Herzgewebeschnitte

6.3.1 Vorteile von Gewebeschnitten als Modellsystem

Dünne Schnitte aus kardialen Gewebe vereinen die Vorteile von isolierten Herzmuskelzellen und komplexen Herzpräparaten (Meyer et al., 2010).

Bei der Herstellung der Gewebeschnitte wird die native Struktur des ventrikulären Myokards bewahrt, sodass die ursprünglichen Kontakte zwischen den einzelnen Zellen vollständig erhalten bleiben (Kang et al., 2016). Der Erhalt der Struktur stellt den entscheidenden Vorteil gegenüber isolierten Zellen dar, deren zelluläre Kontakte durch enzymatischen Verdau gelöst und nur zu einem Teil wiederhergestellt werden können (Bussek et al., 2009). Ihre geringe Dicke sollte die Oxygenierung und die Versorgung mit Nährstoffen der einzelnen Zellen durch Diffusionsvorgänge sicherstellen. Dadurch wird die aufwendige Perfusion, welche beim Einsatz von größeren Gewebepreparaten des ventrikulären Myokards unumgänglich ist, überflüssig (Bussek et al., 2009).

Gewebeschnitte können aus Herzen von Versuchstieren oder aus humanem Biopsiematerial gewonnen werden (Camelliti et al., 2011). Die Verwendung von humanem Myokard hat den Vorteil, dass keine Speziesunterschiede bei der Interpretation des Modellsystems beachtet werden müssen.

Jedoch bringt der Einsatz von Mäusegewebe entscheidende Vorteile in der Methodenentwicklung mit sich. Das Mausmodell ist vor allem durch das hohe Potential für Genmanipulationen das am meisten verwendete Tiermodell in der Forschung. Die Herstellung von transgenen Mäusen ermöglicht die optische Stimulierung der Herzmuskelzellen, was im Vergleich zur Verwendung von elektrischem Strom die schonendere Methode der Stimulierung darstellen könnte.

Ein wichtiger logistischer Aspekt bei der Verwendung von Mäuseherzen ist die kurze Generationenfolge der Nagetiere und die somit hohe Verfügbarkeit von Herzgewebe. Aus einem Herzen können mehrere Gewebeschnitte gewonnen werden. Jeder Schnitt kann außerdem für verschiedene Versuche verwendet werden, was zu einer guten Verwertung des Versuchsmaterials führt.

6.3.2 Langzeitkultivierung der Herzgewebeschnitte

Ohne eine Form der Kultivierung zeigen die Herzschnitte in einem Organbad zwei bis drei Stunden nach der Präparation erste Anzeichen des Gewebeumbaus. Erstrebenswert wäre ein stabiler, zeitunabhängiger Zustand, wodurch sich die Verfügbarkeit der Schnitte enorm steigern und welcher außerdem längerfristige Untersuchungen des Herzgewebes ermöglichen würde. Darüber hinaus bringt das Einwirken einheitlicher Kulturbedingungen eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Gewebeschnitte mit sich. Es wäre demnach auch denkbar, komplexe pathophysiologische Zustände wie zum Beispiel Herzmuskelhypertrophie in vitro nachzustellen und zu untersuchen (Brandenburger et al., 2012).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits Vorarbeiten zur Etablierung der Kultur von humanen Herzgewebeschnitten auf organotypischen Membranen (PICM0RG50, Millipore, USA) gemacht. Nach 24 Stunden Kultur zeigten die Schnitte jedoch beträchtliche mechanische Veränderungen durch eine starke Abnahme ihrer Kontraktionskraft, was durch den strukturellen Umbau des Muskelgewebes erklärt werden könnte (Brandenburger et al., 2012). Durch die Optimierung der Kulturbedingungen könnte ein besserer Erhalt des Herzgewebes während der Kultur erzielt werden.

6.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung und Evaluation der Methode zur Langzeitkultivierung von Gewebeschnitten aus Mäuseherzen. Nach dem Anwenden unterschiedlicher Kulturbedingungen auf einzelne Schnitte sollen diese zur Kontrolle des Gewebeerhalts in unterschiedlichen Parametern untersucht und sowohl miteinander als auch mit frisch präpariertem Gewebe verglichen werden. Anschließend soll die exemplarische Simulation eines pathologischen Zustandes des Gewebes während der Kultur erprobt werden.

7 Material

7.1 Versuchstiere

Tiere

C57BL/6-Mäuse

CD1-Mäuse
(muskelspezifische transgene Expression von
Channelrhodopsin)

Herkunft

Charles River, Sulzfeld

Institut für Physiologie I, Universität
Bonn

7.2 Geräte

Gerät

Sterilwerkbank

Vibratom VT1200S

Organbad Mayflower

CO₂-Inkubator CB210

Kreisschüttler PSU-20

Kippschüttler Hi/Lo-Rocker "Rapid Rocker"

Brushless motor BLH230KC-30

Magnet NdFeB 1 x 0,5 mm

Magnetsensor FXOS8700

Leuchtdiode CREE XRE M2

LightCycler 1.5 Detection System

Zentrifuge

Mikroprozessor FRDM-K22F

Multiplexer ADG1407

Analog-Digital-Wandler

Konstantstrom Impulsgeber LT1970

Brückenverstärker DBA

Kraftaufnehmer F30

Mikroskop

Kamera

Konfokales Laser Scanning Mikroskop SP5

NanoDrop 2000 Spektrophotometer

Hersteller

Thermo Scientific

Leica Biosystems

Hugo Sachs Elektronik

Binder

Grant Instruments

IBI Scientific

Orientalmotor

HKCM Engineering

NXP Semiconductors

LED-Tech.de

Roche

Hettich

NXP Semiconductors

Analog Devices Inc.

National Instruments

Linear Technology

Hugo Sachs Elektronik

Hugo Sachs Elektronik

Olympus

Olympus

Leica Microsystems

Thermo Fisher Scientific

7.3 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Metallzylinder	Institutswerkstatt
Histoacryl Gewebekleber	B. Braun Melsungen
Glasklarfolie MGQ5504	MGW Office Supplies
Filternetz für Gewebeangel (Nylon-Netz 160 µm)	Millipore
Rasierklinge „Wilkinson Klassik“	Wilkinson
Rasierklinge „Gilette Silver Blue“	Gilette
Pipette Typ x 1-10 µl	Gilson
Pipette Typ x 10-100 µl	Gilson
Pipette Typ x 100-1000 µl	Gilson
Petrischale	Falcon
Standard Surgical Scissor	Fine Science Tools
Pinzette, gerade, stumpf	Fine Science Tools
Skalpell	Fine Science Tools
Kulturmembran PICM0RG50	Millipore
Stahldraht (0,5 mm)	Vogelsang Edelmehle
Wolframdraht (0,270 mm)	HMW Hauner
Deckgläser, 20x20 mm	Menzel-Gläser

7.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Isofluran	Abbott
Buprenorphin	Invidor Europe
Heparin	Novo Industries
Low Melt Agarose	ROTH
Ethanol (70%)	Applichem
β-Mercaptoethanol	Applichem
Angiotensin II	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Kaliumchlorid	Sigma
Calciumchlorid	Merck

Magnesiumchlorid	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Merck
D(+)-Glucose Monohydrat	Sigma
2,3-Butanedion Monoxim	Sigma
HEPES analytical grade	Applichem
Natriumhydrogencarbonat	Merck
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma
Medium 199	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Sigma
Isoproterenol	Sigma
Triton-X	Applichem
PBS-Puffer	Gibco
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Power SYBR Green PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific
SYBR green 1	Roche
First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
Formaldehyd	Merck
Saccharose	Sigma
Glycin	Biozym Scientific
Aqua dest.	B. Braun Melsungen
ToPro-3	Thermo Fisher Scientific
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
Eindeckmedium VectaMount AQ Mounting Medium H5501	Vector Laboratories

7.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestell-Nr.
Monoklonaler Antikörper (mouse) anti- α -actinin	Sigma-Aldrich	A7811
Monoklonaler Antikörper (rabbit) anti-connexin 43	Sigma-Aldrich	C6219
Sekundärantikörper (anti-mouse) Alexa546	ThermoFisher	A11030
Sekundärantikörper (anti-rabbit) Alexa488	ThermoFisher	A21441

7.6 Lösungen

Schneidepuffer:

Bestandteil	Stoffmengenkonzentration (mM)
Natriumchlorid	136
Kaliumchlorid	5,4
Calciumchlorid	0,9
Magnesiumchlorid	1
Natriumhydrogenphosphat	0,33
D(+)-Glucose Monohydrat	10
2,3-Butanedion Monoxim	30
HEPES	5

Messpuffer:

Bestandteil	Stoffmengenkonzentration (mM)
Natriumchlorid	136
Kaliumchlorid	5,4
Calciumchlorid	1,8
Magnesiumchlorid	1
Natriumhydrogenphosphat	0,33
D(+)-Glucose Monohydrat	10
Natriumhydrogencarbonat	23

Kulturmedium:

Zur Herstellung des Kulturmediums wurde Medium 199 (Thermo Fisher Scientific) mit 1 Vol% Penicillin/Streptomycin (Sigma, P0781) und 1 Vol% ITS-Supplement (Gibco Art.-Nr. 41400) versehen. Damit wurden folgende Endkonzentrationen erreicht:

Bestandteil	Massenkonzentration
Insulin	10 mg/l
Transferrin	5,5 mg/l
Selen	0,005 mg/l
Penicillin	100000 U/l
Streptomycin	100 mg/l

SSC-Puffer (20X), pH 7,2:

Bestandteil	Stoffmengenkonzentration
NaCl	3 M
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	300 mM

Antikörper-Verdünnungspuffer:

Bestandteil	Stoffmenge
SSC (20X)	1 ml
FCS (=FBS Superior)	0,4 ml
BSA	200 mg
Triton-X 100	10 µl
NaN ₃	4 mg
Aqua dest.	20 ml

Antikörper-Waschpuffer:

Bestandteil	Stoffmenge
SSC (20X)	10 ml
Triton-X 100	100 µl
BSA	2 g
Aqua dest.	200 ml

8 Methoden

8.1 Herstellung von Gewebeschnitten aus Mäuseherzen

8.1.1 Vorarbeiten

Für die Versuche zur Dauerkultivierung von Herzgewebeschnitten wurden Mäuseherzen verwendet. In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits Vorarbeiten mit humanem Myokard gemacht (Brandenburger et al., 2012). Bei der Herstellung der Schnitte wurde die Vorgehensweise an die Verhältnisse der Maus angepasst.

8.1.2 Versuchstiere

Die Tierversuche erfolgten in Übereinstimmung mit den gültigen Tierschutzgesetzen und wurden vom Bayerischen Landesamt für Umwelt und Landwirtschaft unter dem AZ 55.2-1-54-2532.3-67-13 genehmigt. Für die ersten Versuche der Kultivierung wurden männliche, 24 bis 30 g schwere C57BL/6-Mäuse von Charles River verwendet.

Die Stimulierung der Herzmuskelschnitte sollte den Gewebeerhalt während der Kultur verbessern. Hierzu sollte die Methode der optogenetischen Stimulierung angewandt werden. Dies verlangte Mäuse, deren Herzmuskelzellen unter dem CAG-Promotor Gene der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* exprimieren (Bruegmann et al., 2010). Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 475 nm führte zur Öffnung der in die Membran der Muskelzellen eingebauten Channelrhodopsin-2-Kanäle und somit zum Einstrom von Ionen, wodurch es schließlich zur Kontraktion des Muskels kam. Bei der Dauerstimulation wurden die Gewebeschnitte mit Lichtimpulsen in einer bestimmten Frequenz über den kompletten Zeitraum der Kultur bestrahlt.

Die genetisch veränderten Mäuse vom Stamm CD1, weiblich und 35 bis 45 g schwer, wurden uns freundlicherweise von Prof. P. Sasse und Prof. T. Brügmann aus dem Institut für Physiologie I der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Sie wurden für alle Versuche der Kultivierung der Herzschnitte unter elastischen Bedingungen eingesetzt.

8.1.3 Narkose und Herzpräparation

Vor der Narkotisierung wurde den Mäusen eine Mischung aus 50 µg/kg Buprenorphin und 500 U/kg Heparin intraperitoneal gespritzt. Fünfzehn Minuten später wurden sie bei einem Gasfluss von 15 l/min 50 Sekunden lang mit 5 Vol% Isofluran und daraufhin so lange mit 2,5 Vol%

Isofluran betäubt, bis sie komplett reflexfrei waren. Die Herzentnahmen wurden von Prof. A. Dendorfer durchgeführt. Der Brustkorb der Mäuse wurde vorsichtig mit einer Schere aufgeschnitten, die Herzen mit einer Pinzette entnommen und zügig in eine Petrischale mit 4° C kaltem Schneidepuffer überführt. Hier wurden die Vorhöfe mit einer Schere abgetrennt, was zur Eröffnung der Ventrikel führte. In einer weiteren Petrischale wurden die Herzen mit der Spitze nach oben in 37° C warme Low Melt Agarose eingebettet. Zur Stabilisierung der Herzwände wurde die flüssige Agarose dabei vorsichtig mithilfe einer stumpfen Pinzette in die linken Ventrikel geschoben. Ein bei 4° C gelagerter Metallzylinder, auf dem die Petrischale platziert wurde, führte zur schnellen Abkühlung und Verfestigung der Agarose innerhalb von etwa zehn Minuten.

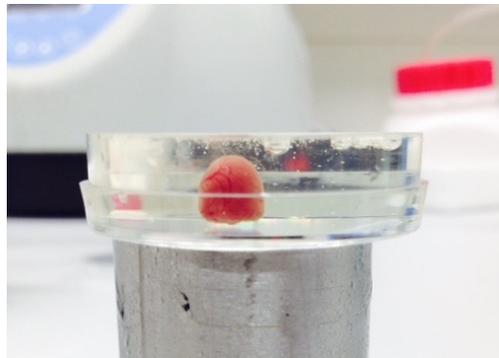


Abbildung 1: Mäuseherz in Low Melt Agarose. Nach der Entnahme wurden die Mäuseherzen mit der Herzspitze nach oben in flüssige Agarose eingebettet. Ein Metallblock stellte hierbei anschließend die Verfestigung der Agarose in der Petrischale sicher.

8.1.4 Schneiden der Mäuseherzen

Zum Schneiden des Herzgewebes wurde das kommerziell erhältliche Vibratom Leica VT1200S der Firma Leica Biosystems verwendet, welches aus Sterilitätsgründen in einer Sterilwerkbank untergebracht war. Dazu wurde die gehärtete Agarose einschließlich der Herzen aus der Petrischale gelöst und quadratisch mit einem Abstand von etwa 5 mm zum Herzen mithilfe eines Skalpellens zugeschnitten. Der so entstandene Agarose-Block wurde mit Histoacrylkleber auf den Probenhalter des Vibratoms geklebt. Dieser wurde daraufhin in der Schneidewanne befestigt, welche mit fortlaufend auf 4° C gekühltem Schneidepuffer befüllt war. Die Klinge „Wilkinson Klassik“ bzw. „Gillette Silver Blue“ wurde mit 70%-igem Ethanol gereinigt, in das Vibratom eingesetzt und mittels der Messeinrichtung „Leica Vibrocheck“ in Z-Richtung justiert. Im darauffolgenden Schneidevorgang betrug die Vorschubgeschwindigkeit der Klinge 0,05 mm/s, die Schwingungsamplitude 1 mm und die Schnittstärke 300 µm. Die so entstandenen Gewebeschnitte wurden so lange im Schneidepuffer aufbewahrt, bis das ganze

Herz geschnitten war. Schließlich wurde die Agarose mit einer stumpfen Pinzette aus den Anschnitten der linken Ventrikel gelöst.

8.2 Kultivierung der Herzgewebeschnitte

8.2.1 Kultivierung unter mechanischer Entlastung auf Membranoberflächen

Erster und erprobter Ansatz für die organotypische Gewebekultur war die entlastete Adhäsion der Herzschnitte an speziellen Membranen (PICM0RG50, Millipore, USA) (Brandenburger et al., 2012). Dazu wurden die Schnitte mithilfe eines zugeschnittenen und an einem Stab befestigten Nylonnetzes, im Folgenden als Gewebeangel bezeichnet, aus dem Schneidepuffer auf sterile Membranen überführt, sodass sie sich gleichmäßig an dessen Oberfläche hafteten. Daraufhin wurden die Membranen mit dem aufliegenden Herzgewebe in einer Petrischale platziert, welche mithilfe einer Pipette mit 1 ml des auf 37° C erwärmten Kulturmediums befüllt wurde. Die Unterseite der Schnitte hatte durch die Membran Kontakt zum Medium, wodurch die Nährstoffversorgung des Gewebes sichergestellt war. Durch den direkten Luftkontakt der Oberseite der Schnitte wurde das Gewebe mit Sauerstoff versorgt. Nach der Präparation wurden die Schälchen sofort in einen CO₂-Inkubator mit der Temperatur von 37° C und einem CO₂-Anteil von 5% gestellt, um eine Alkalisierung des Gewebes zu verhindern. Nach 24 Stunden im Brutschrank wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Die Kultur wurde nach 48 Stunden beendet.



Abbildung 2: Kultivierung eines Gewebeschnittes unter mechanischer Entlastung auf einer Membranoberfläche. Hierbei gewährleistete die Membran den Kontakt des Muskelschnittes zum Kulturmedium zur Nährstoffversorgung. Durch direkten Luftkontakt der Oberseite war die Sauerstoffversorgung sichergestellt.

8.2.2 Kultivierung mit isometrischer Aufhängung

Im Verlauf wurde vermutet, dass die spontanen Kontraktionen der adhärenen Schnitte zu deren Ablösung von der Oberfläche der Membran führen, was die Nährstoffversorgung des Gewebes stark einschränkt. Durch die mechanische Fixierung zweier gegenüberliegender Seiten der Schnitte und die komplette Umspülung mit Kulturmedium sollte dieses Problem umgangen werden. Hierzu wurden die Schnitte mithilfe der Gewebeangel auf eine Kunststoffunterlage gegeben. Senkrecht zum Septum wurden zwei circa 5 mm lange, mit einer Schere gleichschenkelig zugeschnittene Dreiecke aus dünner Plastikfolie, in deren vom Gewebe wegweisenden Spitze circa 1 mm große Löcher eingeschmolzen waren, mit Gewebekleber auf das Herzgewebe geklebt. Vorsichtig wurden die Schnitte und die Plastikdreiecke daraufhin mit Schneidepuffer umspült und mithilfe der Gewebeangel in die Kulturschalen, die mit 3 ml 37°C warmem Kulturmedium gefüllt waren, transferiert. Die Löcher in den Dreiecken wurden dabei in zwei Haken aus 0,5 mm dickem Stahldraht gehängt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte komplett im Medium untergetaucht waren. Durch das Einhängen der aus den Schälchen herausragenden Haken in einen Feintrieb konnten diese gegeneinander verschoben und schließlich die physiologische diastolische Vorspannkraft des Herzmuskelgewebes fixiert werden, soweit dies mit bloßem Auge beurteilbar war. Bei dieser Art der Gewebefixierung handelt es sich um eine isometrische Aufhängung der Schnitte, denn Kontraktionen führten aufgrund der geringen Elastizität der Haken nur zu einer Spannungsänderung und zu keiner Längenänderung des Muskelgewebes. Die Schälchen mit den eingespannten Schnitten wurden sofort in den CO₂-Inkubator überführt und auf dem Kreisschüttler PSU-20 platziert. Durch die entstandene Konvektion im Medium gelangte der gelöste Sauerstoff zum Herzmuskelgewebe. Bei der verabreichten Menge von 3 ml zu Beginn der Kultur war ein Mediumwechsel nach 24 Stunden nicht nötig. Nach 48 Stunden wurde die Kultur beendet.

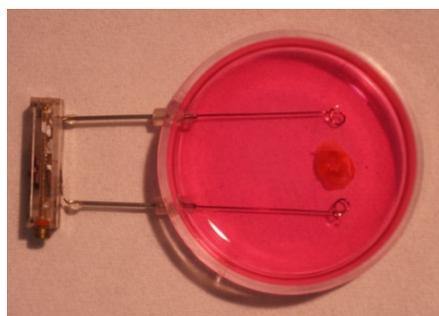


Abbildung 3: Kulturschälchen mit isometrischer Aufhängung eines Herzmuskelschnittes. Die Gewebeschnitte wurden mittels unelastischer Stahldrähte aufgehängt, was zur Fixierung ihrer diastolischen Länge führte, und befanden sich zur Nährstoffversorgung vollständig untergetaucht im Kulturmedium.

8.2.3 Kultivierung mit elastischer Aufhängung

Durch elastische Aufhängung der Schnitte sollten die physiologischen Bedingungen der Muskelkontraktionen weiter angenähert werden. Außerdem sollte die Auslenkung der elastischen Aufhängung die Messung der Gewebespannung und somit die definierte Einstellung der diastolischen Kraft im Gewebe zu Beginn der Kultur ermöglichen.

Für diese Kulturmethode wurden erneut Plastikdreiecke auf die Gewebeschnitte geklebt. Diese wurden in die Haken einer Zugstange aus 0,5 mm dickem Stahldraht und einer elastischen Feder aus 0,270 mm dickem Wolframdraht gehängt, welche in den Petrischalen angebracht waren. Die Schälchen waren mit 3 ml des auf 37° C erwärmten Kulturmediums befüllt, sodass die Schnitte ganz im Medium untergetaucht waren. Die Zugstange war durch einen Feintrieb, der am Außenrand des Schälchens angebracht war, manuell so verstellbar, dass die Schnitte gespannt werden konnten. Bei Spannung des Gewebes wurde die Feder aufgrund ihrer Elastizität in Richtung des Zugdrahtes ausgelenkt. Das Ausmaß ihrer Auslenkung konnte mikroskopisch ermittelt werden. Hierzu befand sich die Spitze der Feder in der Aussparung eines im Schälchen angebrachten Plastikblocks (siehe Abbildung 5). Dieser Ausschnitt wurde mit dem Mikroskop so stark vergrößert, dass die Veränderung des Abstands zwischen der Feder und der Wand des Plastikblocks abgemessen werden konnte.

Um von der Auslenkung der Feder auf die Höhe der Spannung im Gewebe schließen zu können, wurde zuvor die Federkonstante des Wolframdrahtes ermittelt. Diese wurde aus der Steigung der Kurve berechnet, welche sich aus dem Verhältnis der Federkraft zur Auslenkung des Drahtes ergab. Die Auslenkung der Federspitze um 0,1 mm entsprach einer Kraftänderung im Gewebe von 0,4 mN. Der Berechnung zufolge betrug die Federkonstante des Wolframdrahtes somit 4 mN/mm.

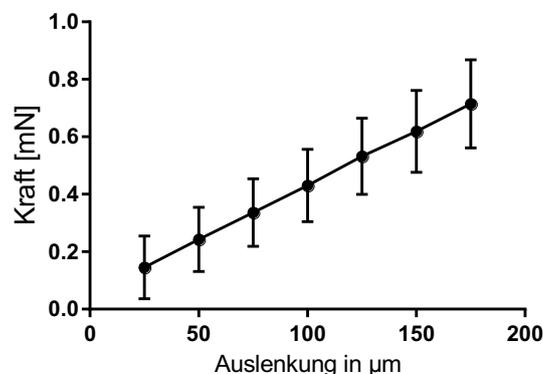


Abbildung 4: Berechnung der Federkonstante des 0,270 mm dicken Wolframdrahtes. Die Federkraft des Wolframdrahtes wurde ins Verhältnis zu dessen Auslenkung gesetzt. Aus der Steigung der Kurve wurde dessen Federkonstante berechnet. Diese betrug 4 mN/mm.

Mit dieser Methode wurde es somit möglich, eine definierte diastolische Gewebespannung im Herzmuskelgewebe einzustellen, welche annähernd die physiologische Situation im Mäuseherzen widerspiegelt.

Um auf die Kraft zu schließen, welche auf den Herzmuskelschnitt in Ruhe wirken sollte, wurde zunächst die Wandspannung S im Mäuseherzen mithilfe des LaPlace Gesetzes für Hohlkörper berechnet (Casha et al., 2017).

$$S = \frac{P \times r}{2 \times d} \quad (1)$$

Folgende Parameter konnten hierbei für das Mäuseherz gewählt werden:

Transmuraler Druck $P = 0,65 \frac{mN}{mm^2}$ (Saito et al., 2017)

Wanddicke $d = 1,5 \text{ mm}$ (Herold, 2010)

Radius $r = 2 \text{ mm}$ (Pacher et al., 2008)

$$S = \frac{P \times r}{2 \times d} = \frac{0,65 \text{ mN} \times 2 \text{ mm}}{mm^2 \times 2 \times 1,5 \text{ mm}} = 0,43 \frac{mN}{mm^2}$$

Anschließend konnte auf die anzuwendende Kraft im Herzmuskelschnitt geschlossen werden:

$$F = S \times A \quad (2)$$

Wobei für den Muskelschnitt berechnet werden konnte:

Fläche $A = 2 \times d \times 0,3mm = 2 \times 1,5mm \times 0,3mm = 0,90mm^2$

$$F = S \times A = 0,43 \frac{mN}{mm^2} \times 0,90 \text{ mm}^2 = 0,39 \text{ mN}$$

Um jedoch auch Zustände von geringer Vorlast und Überdehnung im Gewebe untersuchen zu können, wurde in verschiedenen Schnitten die diastolische Vorspannkraft von 0,1 mN, 0,3 mN und 1,2 mN (im Folgenden bezeichnet als F_V) etabliert.

Die Schälchen mit den Schnitten wurden nach der Einstellung zügig auf einem Schüttler im CO₂-Inkubator platziert. Bei dieser Kultivierungsmethode wurden zwei verschiedene Schüttler verwendet. Der Hi/Lo-Rocker der Firma IBI Scientific, im Folgenden als „Rapid Rocker“

bezeichnet, führte durch das 60-malige Kippen der Kulturschälchen um 15° pro Minute zu einer stärkeren Konvektion des Kulturmediums als der Kreisschüttler PSU-20i. Die Kultur wurde nach 48 Stunden ohne Mediumwechsel beendet.

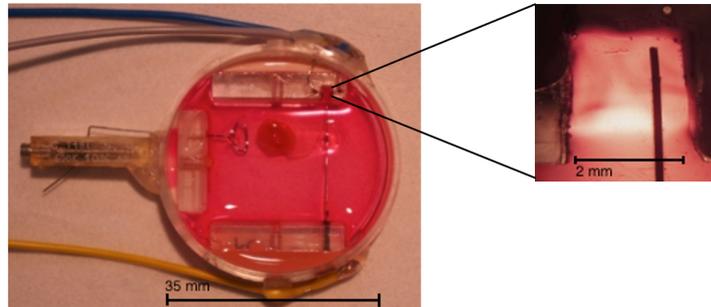


Abbildung 5: Kulturschälchen mit elastischer Aufhängung eines Herzschnittes. Durch das Einhängen des Schnittes in eine elastische Feder, deren Ende sich in einer Aussparung des Plastikblocks im Kulturschälchen befindet (s. vergrößerter Ausschnitt), konnte die diastolische Spannung im Herzgewebe eingestellt werden.

8.2.4 Kultivierung unter elastischen Bedingungen mit optogenetischer Stimulation

Entwicklung des Messsystems zur Aufzeichnung der Kontraktionskraft

Für die Dauerstimulation der Gewebeschnitte war die Möglichkeit der kontinuierlichen Messung und Aufzeichnung der diastolischen und systolischen Spannung im Gewebe notwendig, wofür in der Arbeitsgruppe ein anwendungsspezifisches Messsystem entwickelt wurde. Die Spitze der elastischen Feder wurde dazu mit einem Magneten versehen (s. Abbildung 6). Durch die parallele Ausrichtung der Feldlinien zu einem gegenüber im Schälchen befestigten Magnetsensor des Typs FXOS8700 der Firma Freescale konnte die exakte Höhe der Auslenkung der Feder registriert werden. Die Signale wurden an einen Microcontroller gesendet, welcher mit einem PC verbunden war. Die Kalibrierung mit spezifischen Gewichten ermöglichte den Rückschluss von der Höhe der Federauslenkung auf die entwickelte Kraft im Herzgewebe und somit auch die Einstellung der diastolischen Gewebespannung von 0,3 mN bzw. 1,2 mN zu Beginn der Kultur. Die Schälchen wurden mit 3 ml des warmen Kulturmediums befüllt, welchem verschiedene Substanzen zugegeben werden konnten. Sie wurden im CO₂-Inkubator auf dem Kreisschüttler oder dem „Rapid Rocker“ platziert. Die Kultur- und somit Aufzeichnungsdauer der Kontraktionen im Herzgewebe betrug 48 Stunden. Das Medium wurde in dieser Zeitspanne nicht gewechselt.

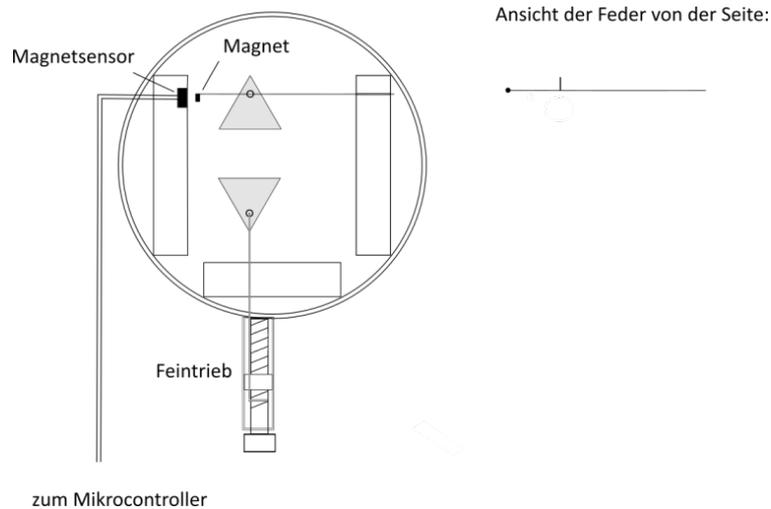


Abbildung 6: Aufbau eines Kulturschälchens für die Aufzeichnung der Kontraktionskraft der Gewebeschnitte. Am Ende der Feder, in die der Gewebeschnitt eingehängt wurde, befand sich ein Magnet. Ein gegenüberliegender Magnetsensor ermöglichte die Registrierung der Federauslenkungen bei Kontraktion des Gewebes. Schließlich konnte die Kraftentwicklung der Schnitte in einem Computerprogramm direkt abgelesen und aufgezeichnet werden.

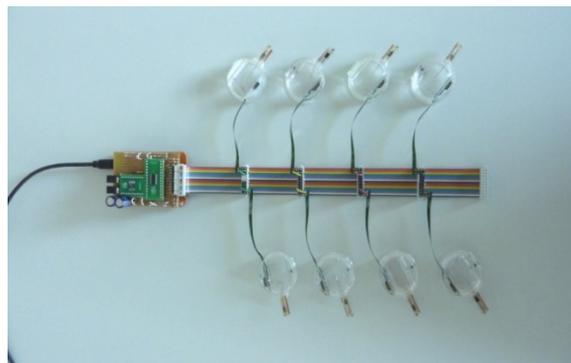


Abbildung 7: Anordnung der Kulturschälchen mit Verbindung zu einem Microcontroller. Der Aufbau ermöglichte die gleichzeitige Registrierung der entwickelten Kontraktionskräfte von acht Gewebeschnitten. Die von den Magnetsensoren erfassten Signale wurden über einen Microcontroller an einen PC weitergeleitet.

Stimulation

Nicht alle Gewebeschnitte sollten über die Dauer der Kultur stimuliert werden. Für die optogenetische Stimulation jedoch waren Lichtblitze einer bestimmten Wellenlänge notwendig. Die Kulturschälchen mit den Schnitten wurden auf weitere Petrischalen zur Wärmeisolation gestellt. Unter diesen befand sich jeweils zentral eine Leuchtdiode, die Licht der Wellenlänge 475 nm emittierte. Die Lichtintensität der Dioden war hierbei direkt abhängig von der Stärke des Stroms eines individuell angefertigten Impulsgebers. Die Impulsdauer betrug stets 3 ms. Die Reizschwellen für minimal sichtbare und maximal erreichbare

Kontraktionen stimulierter und nicht stimulierter Schnitte wurde zu Beginn und am Ende der Kultur gemessen, um die Reizweiterleitung im Gewebe zu untersuchen. Hierzu wurde die Stimulation für 4 Minuten pausiert und danach die Stromstärke schrittweise alle 2 Minuten beginnend bei 8,8 mA bis 1 A gesteigert. Schließlich wurde daraus die EC_{50} berechnet, das heißt die Stromstärke, bei der 50% der maximalen Kontraktionskraft des Gewebes erreicht wurden. Während dieser Untersuchung konnte außerdem die Höhe der Kontraktionskraft der unstimulierten Gewebeschnitte ermittelt werden. Für die Dauer der Kultur betrug die Intensität des Stroms durchlaufend 1 A im Falle der Stimulation des Gewebes. Die Stimulationsfrequenz der einzelnen Schnitte wurde auf 0,1 Hz, 0,5 Hz bzw. 2 Hz festgelegt. Damit sollte ein Kompromiss zwischen der Effektivität der Stimulation und der Schonung des Gewebes geschlossen werden.

8.2.5 Auswertung

Die aufgezeichneten Kontraktionskurven wurden in das Programm „LabChart Reader“ der Firma ADInstruments importiert. Die relevanten Bereiche in der Aufzeichnung, welche mindestens zehn Sekunden umfassten, wurden markiert, gemittelt und mithilfe der Peak-Analysis-Erweiterungen untersucht. Die diastolische Gewebespannung und die entwickelte systolische Kraft der Schnitte konnte hierbei direkt aus der Kontraktionskurve ermittelt werden, die Kontraktionskraft bzw. -amplitude wurde aus der Differenz der beiden Kräfte berechnet. Die Höhe des Krafterhalts während der Kultur galt hierbei als Parameter für den Gewebeerhalt der Schnitte. Die tonische Kontraktur hingegen bezeichnete den Anstieg der diastolischen Gewebespannung in den Schnitten im Verlauf der Kultur und galt als Zeichen der Gewebeschädigung. Die Höhe der Kontraktur wurde aus der Differenz der anfangs in den Schnitten eingestellten Gewebespannung und der im Verlauf größten entwickelten diastolischen Kraft berechnet. Die Darstellung der Messdaten erfolgte schließlich mithilfe des Programms „Prism“ von GraphPad.

8.3 Kraftmessung im Organbad

8.3.1 Aufbau und Funktionsweise

Vor der Möglichkeit der kontinuierlichen Kraftaufzeichnung wurden zur Messung der Kontraktionskraft von frisch präparierten (im Folgenden als „frische Gewebeschnitte“ bezeichnet) und unter standardisierten isometrischen Bedingungen kultivierten Herzmuskelschnitten Organbäder der Firma Hugo Sachs Elektronik vom Typ „Mayflower“

verwendet (Abbildung 8). Mit diesen war die elektrische Stimulation bei gleichzeitiger Aufzeichnung der diastolischen und systolischen Spannung des Gewebes möglich. Die an den Gewebeschnitten befestigten Plastikdreiecke wurden in der mit Pufferlösung gefüllten Muskelkammer in sogenannte Organhaken eingehängt. Im Falle der frischen und der auf einer Membran kultivierten Schnitte mussten sie zuvor aufgeklebt werden. Das Einhängen der Schnitte erfolgte in Gegenwart des muskelrelaxierenden Myosin-ATPase-Inhibitors 2,3-Butandionmonoxim. Die Hemmung von Muskelkontraktionen sollte beim Einhängen der Schnitte zur Schonung des Gewebes beitragen. Der vom Wärmetauscher auf 37°C erhitzte und mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begaste Messpuffer gelangte daraufhin mithilfe einer Rollerpumpe in die Muskelkammer, welche selber auch beheizt war. Der Überstand wurde kontinuierlich abgesaugt. Ein Organhaken konnte mit einer Stellschraube bewegt werden, was zu einer Dehnung bzw. Entlastung der Schnitte führte. Der andere Haken war mit dem Kraftaufnehmer verbunden. Für die Stimulation waren Feldelektroden in die Muskelkammer eingebaut. Dies gewährleistete eine gleichmäßige elektrische Reizung des Gewebes mit Strom von 7 bis 120 mA bei einer Impulsdauer von 3 ms. Die am Kraftaufnehmer registrierten Signale über die diastolische und systolische Kraftentwicklung der Schnitte wurden an einen Verstärker der Firma Hugo Sachs übertragen und von dort über einen Analog-Digital-Wandler an einen PC weitergeleitet. Mit dem Programm „WinEDR“, welches von Herrn Dempster der Strathclyde University in Glasgow freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde (Dempster), konnten diese direkt abgelesen und aufgezeichnet werden.

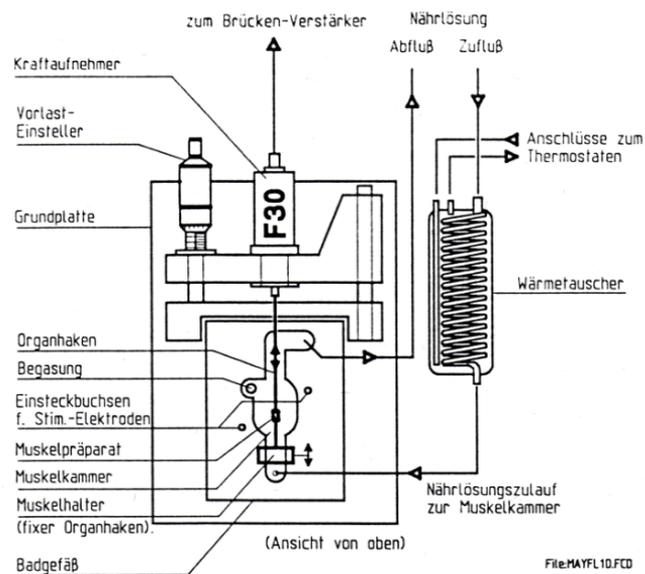


Abbildung 8: Aufbau des Organbads des Typs „Mayflower“ (Hugo Sachs Elektronik). Die Gewebeschnitte wurden in der Muskelkammer des Organbads zwischen zwei Organhaken gehängt und von Messpuffer kontinuierlich umspült. Mit einem Haken konnten die Schnitte gedehnt bzw. entlastet werden, der andere übertrug die Kraft im Gewebe an einen Verstärker. Feldelektroden gewährleisteten die gleichmäßige elektrische Reizung des Gewebes. Abbildung übernommen aus (Brandenburger, 2011).

8.3.2 Messprotokoll

Äquilibration

Nachdem der Einlegepuffer aus der Muskelkammer gespült und komplett durch Messpuffer ersetzt worden war, begann die Eingewöhnungsphase der Schnitte. Sie wurden auf ungefähr 0,1 mN vorgespannt und unter ständiger Perfusion inkubiert, bis keine Spontankontraktionen des Gewebes mehr registrierbar waren. Dies konnte im Falle der frischen Schnitte bis zu 30 Minuten dauern. Danach wurde die Gewebespannung der Schnitte auf 0,3 mN erhöht. Nach einer kurzen Phase der Stimulation mit der maximalen Reizintensität von 120 mA und der Frequenz von 1 Hz zur Eingewöhnung wurde für alle Messungen mit Ausnahme der Kraft-Frequenz-Abhängigkeit mit der Frequenz von 4 Hz stimuliert. Auch die Gewebespannung von 0,3 mN wurde in allen Versuchen außer bei der Ermittlung der maximalen Kontraktionskraft und Gewebeelastizität beibehalten.

Reizschwelle und physiologische Kontraktionskraft

Durch die stufenweise Erhöhung der Stromstärke von 0 bis 120 mA wurde die Reizschwelle der Herzmuskelschnitte als die Intensität, die zur ersten ablesbaren Muskelkontraktion führte,

festgelegt. Daraufhin wurde die Stimulation mit der doppelten Intensität fortgesetzt. In dieser Phase wurde die basale Kontraktionskraft der Gewebeschnitte bestimmt. Die jeweilige Stromstärke wurde auch in den weiteren Versuchen zur Stimulation verwendet.

β -adrenerg induzierte Steigerung der Kontraktilität

Es sollte das Ansprechen der Gewebeschnitte auf Stimulation der β -Adrenozeptoren untersucht werden, was einen wichtigen physiologischen Parameter von Herzgewebe darstellt. Dazu wurde der β -Agonist Isoproterenol mit einer Rate von 4 ml/h kontinuierlich in die Muskelkammer perfundiert, sodass sich darin eine Endkonzentration von 1000 nM einstellte. Ungefähr zehn Minuten nach dessen Zugabe stabilisierte sich die β -adrenerg induzierte Steigerung der Kontraktilität. Für alle weiteren Versuche standen die Gewebeschnitte unter ständigem Einfluss des β -Agonisten.

Kraft-Frequenz-Beziehung

Die Kraft-Frequenz-Beziehung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der kardialen Kontraktilität. Sie ist in den meisten Säugetieren positiv (Endoh, 2004). Um die Kraft-Frequenz-Beziehung der murinen Herzgewebeschnitte zu untersuchen, wurde deren Kontraktionskraft bei Stimulation mit verschiedenen Frequenzen gemessen. Das Stimulationsprotokoll wurde nach Stabilisierung der Kontraktionskraft unter dem Einfluss von Isoproterenol gestartet. Die entwickelte Kraft der Gewebeschnitte wurde jeweils innerhalb der letzten zehn Sekunden bei Stimulation mit der höheren Frequenz abgelesen und ausgewertet.

Zeit (Sek)	30	60	90	120	150	180
Frequenz (Hz)	1	2	3	4	7	10

Tabelle 1: Stimulationsprotokoll zur Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung der Gewebeschnitte. Die Stimulationsfrequenz der Schnitte wurde alle 30 Sekunden nach einem festen Schema erhöht.

Dehnungsabhängigkeit der Kontraktionskraft und der Gewebespannung

Es sollten die Entwicklung der Kontraktilität und der diastolischen Gewebespannung bei Dehnung der Schnitte untersucht werden. Hierzu wurden die Schnitte zuerst komplett entspannt. Daraufhin wurde im Intervall von zwei Minuten eine Mikrometerschraube am Organbad um jeweils 0,125 mm gedreht, was zu einer stufenweisen Dehnung des Gewebes führte. Es wurden sowohl die aktive als auch die passive Kraft der Schnitte innerhalb der letzten zehn Sekunden vor erneuter Erhöhung der Dehnung ermittelt. Nach deutlich erkennbarer

Abnahme der Kontraktionskraft aufgrund von Zerreißen im Gewebe wurde das Experiment beendet.

8.3.3 Auswertung

Die mit der Software „WinEDR“ aufgezeichneten Kontraktionskurven wurden in das Programm „LabChart Reader“ der Firma ADInstruments importiert. Die relevanten Bereiche in der Aufzeichnung, welche mindestens zehn Sekunden umfassten, wurden markiert, gemittelt und mithilfe der Peak-Analysis-Erweiterungen untersucht. Zur Auswertung der hormonellen Stimulierbarkeit wurde die unter Isoproterenol entwickelte Kontraktionskraft, welche sich aus der Differenz der aktiven und passiven Kraft des Gewebes ergibt, ins Verhältnis zur basalen Kontraktionskraft ohne Einfluss des β -Agonisten gesetzt. Zur graphischen Darstellung der Kraft-Frequenz-Beziehung der Schnittpräparate wurde die Kontraktionskraft, welche sich unter der Stimulation mit den verschiedenen Frequenzen einstellte, auf die Kraft während der Stimulation mit 1 Hz bezogen. Die Gewebeelastizität ist definiert als der passive Kraftanstieg in mN pro mm Dehnung der Schnitte und wurde ermittelt, indem im Bereich von 0 bis 0,75 mm der passiven Kraft-Dehnungs-Kurve Steigungsdreiecke gebildet wurden. Die maximale Kontraktionskraft („Kontraktionskraft max.“) bezeichnet die größte Differenz von aktiv und passiv entwickelter Kraft der Muskelschnitte bei Dehnung und gilt als wichtiger Parameter des Gewbeerhalts. Die Darstellung aller Messdaten erfolgte mithilfe des Programms „Prism“ von GraphPad.

8.4 MTT-Vitalitätsmessung

8.4.1 Prinzip

Zur Beurteilung der Vitalität von frischen sowie kultivierten Herzgeweben wurde der MTT-Test angewandt. Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass das wasserlösliche Tetrazoliumsalz in Anwesenheit von NADP von Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromid (MTT) in vitalen Zellen in wasserunlösliches Formazan reduziert wird. Die violette Farbe von Formazan ist im Gegensatz zur gelben Farbe von Tetrazoliumsalz somit Ausdruck der Vitalität des Gewebes (Olinga et al., 1997).

8.4.2 Färbung

Das MTT-Reagenz wurde in einer zehnfach konzentrierten Stammlösung (5 mg/ml in Messpuffer) angesetzt, welche vor jedem Versuch im Verhältnis 1:10 mit Messpuffer verdünnt wurde. Frische Schnitte wurden in eine sterile Petrischale transferiert, aus den Schälchen mit den kultivierten Schnitten wurde das Medium abgesaugt. Von der Lösung wurden nun jeweils 2 ml auf das Gewebe gegeben. Im Falle der Kultivierung auf Membranen wurde jeweils 1 ml unter und 1 ml auf diese pipettiert. Nach zwanzig Minuten der Inkubation auf dem kreisenden Schüttler im Brutschrank wurde die MTT-Lösung aus den Schälchen abgesaugt und die Schnitte mit 2 ml MTT-Puffer gewaschen, welcher nach weiteren zwei Minuten abgesaugt wurde.

8.4.3 Morphologische Beurteilung

Für die morphologische Beurteilung der Vitalität wurden die Schnitte im Mikroskop 4-fach vergrößert und mit der aufgebauten Kamera fotografiert. Die Aufnahmen wurden in das Programm „Image J“ importiert. Hier wurde der gesamte Gewebeschnitt mit dem „Paintbrush Tool“ umrandet und die Anzahl der Pixel in der umschlossenen Fläche berechnet (Abbildung 9 A). In einem zweiten Schritt wurden die Pixel des violetten, also des vitalen Bereichs, mit derselben Methode ermittelt (Abbildung 9 B). Um die Gewebeschnitte gut in ihrer Vitalität miteinander vergleichen zu können, wurde jeweils das Verhältnis der vitalen zur gesamten Fläche errechnet.

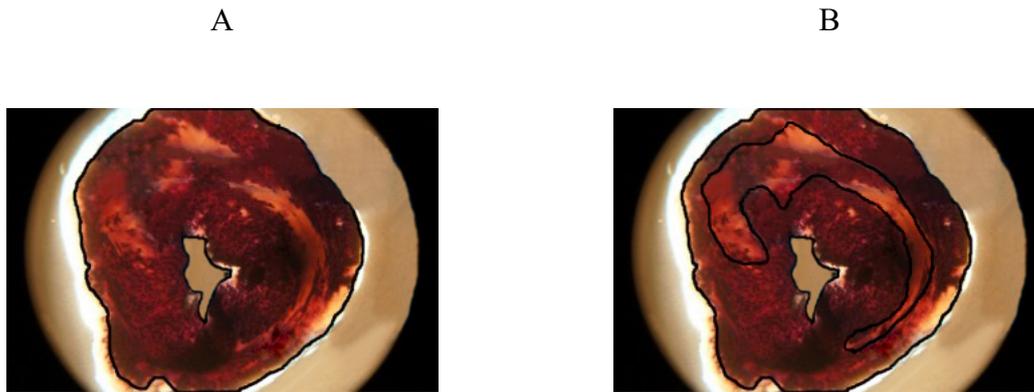


Abbildung 9: Morphologische Beurteilung der Vitalität der Gewebeschnitte. Der Anteil der vitalen Fläche in den Schnitten wurde ermittelt, indem das Verhältnis des Bereichs, der durch den MTT-Test violett gefärbt wurde (B), zur Gesamtfläche der Gewebeschnitte (A) berechnet wurde.

8.5 Immunhistologie und Kernfärbung

8.5.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung

Der Nachweis von gewebespezifischen Proteinen zur weiteren Charakterisierung des Gewebes gelang mithilfe von Immunfärbungen. Es wurde die Methode der indirekten Markierung angewandt. Bei diesem Verfahren wird das gesuchte Antigen zunächst mit einem Primär-Antikörper markiert, der z.B. aus Kaninchen oder Mäusen stammt. Der sekundäre fluorochromkonjugierte Antikörper ist ein anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-IgG bzw. -IgM aus einem anderen Tier (z.B. Ziege oder Affe) und bindet somit an den Primär-Antikörper. Nach Beleuchtung mit der spezifischen Anregungswellenlänge emittiert der konjugierte Antikörper Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge, welches im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

8.5.2 Vorbereitungen

Zunächst wurden die Gewebeschnitte mit PBS-Puffer mit 4% Formaldehyd bei 4° C für mindestens 24 Stunden fixiert, anschließend in PBS-Puffer mit 4% Saccharose für eine Stunde, mit 15% Saccharose für vier Stunden und mit 30% Saccharose über Nacht inkubiert und daraufhin zweimal in einer 100 mM Glycinlösung (Glycin in Aqua dest.) und einmal in PBS-Puffer gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Schnitte mit PBS-Puffer mit 1% Triton-X bedeckt und über Nacht bei 4° C inkubiert, woraufhin sie dreimal in PBS-Puffer gewaschen wurden. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch die Inkubation mit PBS-Puffer mit 3% BSA bei 4° C bis zum nächsten Morgen. Sie wurden

wiederum dreimal in PBS-Puffer gewaschen, bevor sie im Anschluss daran mit der Primärantikörperlösung bei 4°C inkubiert wurden. Die Schnitte wurden am nächsten Tag mindestens dreimal in AK-Waschpuffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die Inkubation bei 4°C mit den sekundären Antikörpern (1:100 in AK-Verdünnungspuffer) zusammen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ToPro-3 (1:1000 in AK-Verdünnungspuffer), welcher durch spezifisches Binden an Chromatin in den Zellkernen zur Kernfärbung verwendet wird, über Nacht. Nach mindestens drei weiteren Waschungen in AK-Waschpuffer wurden die Proben schließlich mit Eindeckmedium eingebettet.

8.5.3 Mikroskopie und Auswertung

Die Proben wurden mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Leica TCS SP5 mit AOBS der Firma Leica Microsystems in Ölimmersion mit 40-facher Vergrößerung untersucht. Es wurden pro Schnitt 5 bis 7 Bereiche aufgesucht, in denen die Sarkomere von längs angeschnittenen Muskelzellen gut erkennbar waren. Die verschiedenen Fluorochrome wurden sequentiell mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, sodass es zu keiner Überschneidung der Emissionsbereiche kommen konnte. Die Exzitations- und Emissionswellenlängen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Struktur	Farbstoff/ Primär-AK	Fluorochrome der Sekundär-AK	Exzitation/ Emission (nm)
Chromatin	ToPro-3		633/660
Aktinin	anti- α -actinin in mouse	Alexa 546	546/550
Connexin 43	anti-connexin 43 in rabbit	Alexa 488	488/500

Tabelle 2: Exzitations- und Emissionswellenlängen des Farbstoffs ToPro-3 bzw. der verwendeten Sekundär-Antikörper. Die Aufnahmen wurden sequentiell mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop gemacht, um Überschneidungen der Emissionsbereiche zu vermeiden.

Mit dem Konfokalmikroskop kann durch das Anfertigen dünner optischer Schnitte in verschiedenen Ebenen eine höhere räumliche Auflösung gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie erreicht werden. Von jeder Ebene wurden drei Aufnahmen gemacht, aus deren Mittelwert jeweils ein rauscharmes Bild hervorging. Das Gesamtbild entstand schließlich durch Überlagerung der einzelnen Ebenen. Die weitere Bildbearbeitung erfolgte im Programm „LAS AF Lite“ der Firma Leica Microsystems, mithilfe dessen die Länge der Sarkomere in den Muskelzellen durch die Darstellung von Aktinin ausgemessen und Connexin-43 auf seine Verteilung entlang der Membranen untersucht werden konnte. Eine

Längenzunahme der Sarkomere lässt auf die morphologische Veränderung des Gewebes während der Kultur schließen, wohingegen die Umverteilung von Connexin-43 entlang der Zellmembran zur Störung in der Erregungsausbreitung im Herzmuskel führen kann. Die Färbung der Zellkerne diente der Abgrenzung der einzelnen Herzmuskelzellen voneinander.

8.6 PCR

8.6.1 Prinzip der Real-Time qPCR

Die quantitative Real-Time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Mit dieser Methode können somit Rückschlüsse auf die Höhe der Expression bestimmter Gene gezogen werden.

Sie wurde hier angewandt, um Änderungen im Expressionsmuster wichtiger kardialer Strukturgene in den Herzmuskelzellen im Verlauf der Kultur zu detektieren und liefert folglich wichtige Erkenntnisse über die zelluläre Differenzierung der kultivierten Schnitte.

Ausgewählt wurden dafür die Gene MLC-2v, N2A/N2B, GJA1 und SLC2A1. MLC-2v kodiert für die Isoform der Myosin-Leichtkette 2 des ventrikulären Herzmuskels. Die Höhe dessen Expression in den Herzschnitten nach der Kultur steht somit im Zusammenhang mit dem Erhalt der kontraktilen Funktion des Gewebes (Sheikh et al., 2015). Die Gene N2A und N2B kodieren für zwei Isoformen von Titin, welche deutliche Unterschiede in ihrer Steifigkeit aufweisen. Das Verhältnis der Genexpression von N2A zu N2B im Herzmuskelgewebe ist dementsprechend Marker für die Steifigkeit des Herzgewebes (Cazorla et al., 2000). GJA1 kodiert für das Protein Connexin-43, welches im Bereich der Glanzstreifen zwischen zwei Herzmuskelzellen lokalisiert ist und eine große Rolle bei der Erregungsausbreitung im Myokard spielt (Michela et al., 2015). Das Gen SLC2A1 kodiert für das Transmembranprotein Glut-1. Es wird bei hypoxischen Bedingungen im Gewebe erhöht exprimiert und eignet sich demnach als Hypoxiemarker der kultivierten Muskelschnitte (Zhang et al., 1999). Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurden diese auf die Höhe der Expression des konstitutiv exprimierten, nicht regulierten „Housekeeping-Gens“ β -Aktin bezogen. Es wurden unstimulierte und stimulierte Gewebeschnitte untersucht und dabei die diastolische Gewebespannung von 0,3 mN bzw. 1,2 mN in den Schnitten zu Beginn der Kultur eingestellt.

8.6.2 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Die Gewebeschnitte wurden direkt nach der Präparation bzw. nach 48 Stunden Kultur bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Zellyse erfolgte mit einem Hand-Homogenisator mit Teflon-Aufsatz in 600 μl RLT Puffer des „RNeasy Mini Kits“ der Firma Qiagen je Schnitt. Daraufhin wurde die RNA mit 70% Ethanol aufgereinigt und anschließend mithilfe des Kits entsprechend der Anweisungen des Herstellers extrahiert. Der RNA-Gehalt der Probe wurde für die spätere Normierung der Expressionswerte mithilfe von photometrischen Messungen bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Im Anschluss daran wurde die cDNA-Synthese mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Roche durchgeführt. Durch das darin enthaltene virale Enzym Reverse Transkriptase wurde aus der einsträngigen mRNA eine doppelsträngige cDNA generiert. Diese wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

8.6.3 Real-Time quantitative PCR

Die quantitative Real-Time PCR erfolgte mit dem Power SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) und wurde am LightCycler 1.5 (Roche) Detection System durchgeführt. Hierzu wurden sogenannte Primer, zwei kurze Oligonukleotide, welche zu jeweils einem Strang an den entgegengesetzten Enden der doppelsträngigen Ausgangs-DNA (cDNA) komplementär sind, benötigt. Die verwendeten Forward Primer sowie die Reverse Primer wurden von der Firma Eurofin Genomics hergestellt und sind in Tabelle 3 aufgelistet. Außerdem war das Vorhandensein einer thermostabilen DNA-Polymerase, von Nukleotiden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Puffer und Mg-Ionen als Kofaktoren notwendig. Jeder Zyklus bestand aus drei Schritten: Zunächst wurde die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, was zur Trennung der beiden Stränge führte. Anschließend wurde die Temperatur für dreißig Sekunden bei 60°C gehalten, sodass eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA (sog. „Primerhybridisierung“) stattfinden konnte. Bei der anschließenden Temperatur von 72°C konnten die Stränge ausgehend vom 3'-Ende der Primer von der DNA-Polymerase mit freien Nukleotiden aufgefüllt werden. Es entstand ein Duplikat des vorherigen Komplementärstrangs und die Ausgangs-DNA war somit verdoppelt. Dadurch dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienten, führte die PCR zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Der hinzugegebene Farbstoff SYBR green 1 der Firma Roche wies nach Anregung eine schwache Hintergrundfluoreszenz auf, die bei Bindung an doppelsträngige DNA stark zunimmt. Die Amplifikation der Zielsequenz führte somit zu einer Erhöhung der Fluoreszenz, die direkt proportional zur Menge der vorhandenen dsDNA war. Dieser Vorgang

konnte in „Echtzeit“ („Real Time“) mitverfolgt werden. Über ein Spektralphotometer wurde das emittierte Licht schließlich zu einer CCD-Kamera geleitet. Die einzelnen Proben benötigten unterschiedlich viele Zyklen, um einen bestimmten Fluoreszenzwert, der als Richtwert (threshold) festgelegt wurde, zu erreichen. Dieser ließ nach Abgleich gegen eine Standardreihe bekannter Konzentrationen auf eine bestimmte Anzahl an DNA-Kopien schließen.

Gen	Protein	Forward Primer	Reverse Primer
MLC-2v	Myosin-Leichtkette 2	ATCGACAAGAATGACCTAAGGGA	ATTTTTCACGTTCACTCGTCCT
N2A	Titin	GGCATCTCCAGGACGTTACTC	TTCACTCTGCCTTGAGGTTTAG
N2B	Titin	GCACAGAAGGCAAGATCCTGA	ACCTGCTTTTCCTCAAGTGCT
GJA1	Connexin 43	ACAAGGTCCAAGCCTACTCCA	CCGGGTTGTTGAGTGTTACAG
SLC2A1	Glut1-Transporter	CAGTTCGGCTATAACACTGGTG	GCCCCGACAGAGAAGATG

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer. In dieser Tabelle sind die verwendeten Primer aufgeführt, welche als Startpunkt für die DNA-Polymerase bei der quantitativen Real-Time PCR dienen. Forward Primer sowie Reverse Primer sind zu jeweils einem Strang an den entgegengesetzten Enden des doppelsträngigen DNA-Abschnitts komplementär, welcher repliziert werden sollte.

8.7 Darstellung und Statistik

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit der Software „Prism“ der Firma GraphPad. Der t-Test ermöglichte es, zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. Für Gegenüberstellungen von mehr als zwei Gruppen bei einer Variablen wurde der One-Way ANOVA mit Post hoc-Test verwendet, bei zwei Variablen wurde der Two-Way ANOVA mit Post hoc-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. In den Grafiken wurden die Versuchsdaten als Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

9 Ergebnisse

9.1 Optimierung der Präparationstechnik

Bei der Herstellung humaner Gewebeschnitte in der eigenen Arbeitsgruppe wurde die Rasierklinge „Wilkinson Klassik“ der Firma Wilkinson benutzt. Es sollte untersucht werden, ob die Klinge „Gilette Silver Blue“ der Marke Gilette einen gewebeschonenderen Schneidvorgang gewährleistet. Die Kontraktionskraft der frisch mit der neuen Klinge präparierten murinen Herzschnitte war signifikant höher als die Kraft des Gewebes, welches mit der Standardklinge geschnitten worden war. Es wurde somit erkennbar, dass deren Verwendung einen deutlich besseren Gewebeerhalt ermöglicht. In allen weiteren Versuchen wurde deshalb die Klinge „Gilette Silver Blue“ für die Herstellung der Schnitte verwendet.

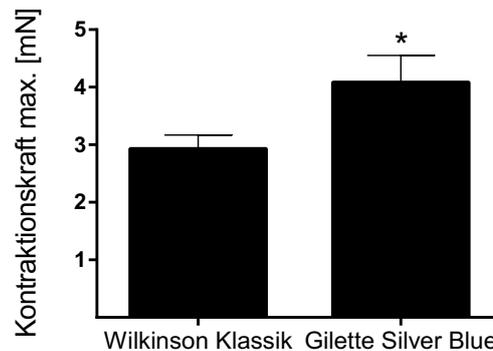


Abbildung 10: Einfluss der Verwendung verschiedener Rasierklingen bei der Präparation auf die Kontraktionskraft der frischen Herzweschnitte. Durch die signifikant höhere Kontraktionskraft der frisch mit der Klinge „Gilette Silver Blue“ präparierten Gewebeschnitte wurde auf den besseren Gewebeerhalt bei deren Verwendung geschlossen. (n=6, MW±SEM) *: p<0,05 im t-test

9.2 Etablierung und Vergleich verschiedener mechanischer Kulturbedingungen

In den ersten Kultivierungsversuchen mit murinen Schnitten wurde die Methode der entlasteten Auflage des Gewebes auf organotypischen Membranen angewandt. Daraufhin wurde der Versuch der Aufhängung der Schnitte mit Suspension in Kulturmedium unternommen. Dazu wurden die Schnitte zunächst mithilfe in zwei unelastische Haken eingehängt, was bei Stimulation zu isometrischen Muskelkontraktionen des Gewebes führte. Diese Art der Kultivierung wird im Folgenden als isometrische Aufhängung bezeichnet. Deutlich physiologischere auxotonische Kontraktionen sollte die Verwendung eines elastischen Hakens bei der Aufhängung der Schnitte ermöglichen. Die im Folgenden als elastische Aufhängung

bezeichnete Kultivierungsmethode bot zusätzlich die Möglichkeit der Optimierung der diastolischen Gewebespannung.

Die etablierten Kulturbedingungen wurden anhand verschiedener Parameter des Gewebeerhalts miteinander verglichen.

9.2.1 Vitalität

Mithilfe des MTT-Tests wurde die Vitalität der unter entlasteten bzw. isometrischen Bedingungen kultivierten Gewebeschnitte untersucht. Die Höhe des mit MTT angefärbten Anteils an der Gesamtfläche der Schnitte gab dabei direkten Rückschluss auf deren Vitalität.

Abbildung 11 A zeigt einen entlastet kultivierten Schnitt zur Veranschaulichung der deutlichen Verminderung des Anteils vitalen Gewebes. Es ist auffällig, dass vor allem die längs angeschnittenen Herzmuskelzellen im entlasteten Gewebe nicht erhalten werden konnten. In Abbildung 11 B wird erkennbar, dass auch die unter isometrischen Bedingungen kultivierten Schnitte abgestorbene Gewebeanteile aufwiesen. Im Vergleich zeigten jedoch diese einen deutlich größeren Anteil lebender Zellen (Abbildung 12).

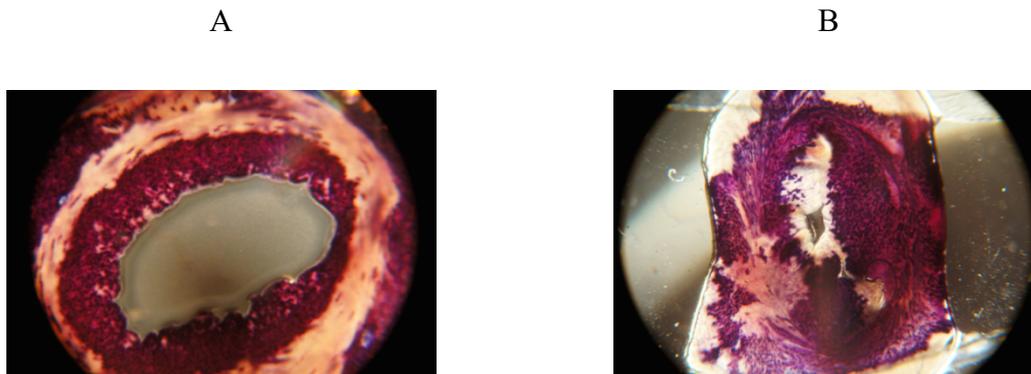


Abbildung 11: MTT-Färbung eines entlastet (A) und eines unter isometrischen Bedingungen kultivierten Gewebeschnittes (B). Beide Schnitte weisen abgestorbene Gewebeanteile auf. Im entlastet kultivierten Schnitt ist fast der gesamte Anteil der längs angeschnittenen Herzmuskelzellen abgestorben. Im aufgehängt kultivierten Gewebeschnitt ist das Areal abgestorbener Zellen kleiner und nicht auf eine bestimmte Ausrichtung der Zellen beschränkt.

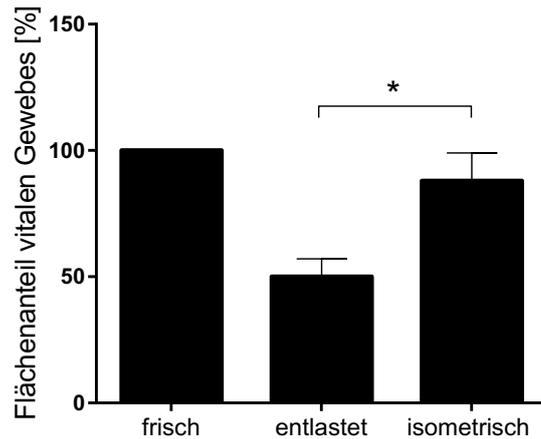


Abbildung 12: Einfluss der Kulturbedingungen auf den Erhalt der Vitalität der Herzmuskelschnitte. Der Flächenanteil vitalen Gewebes ist in den unter isometrischen Bedingungen kultivierten Schnitten deutlich höher als in den entlastet kultivierten. Dies lässt auf den besseren Gewebeerhalt durch Aufhängung der Schnitte im Medium schließen. (n=5, MW±SEM) *: p<0,05 im t-test

9.2.2 Steigerung der Kontraktilität unter β -adrenerger Stimulation

Die Kontraktilität der Gewebeschnitte konnte durch die Zugabe von Isoproterenol pharmakologisch beeinflusst werden. Sowohl die frisch präparierten als auch die kultivierten Schnitte reagierten auf die Zugabe von 1000 nM Isoproterenol mit einer Zunahme der Kontraktionskraft auf etwa das Doppelte und zeigten somit eine deutliche β -adrenerge Stimulierbarkeit. Es bestand hierbei kein signifikanter Unterschied zwischen den frischen und den unter unterschiedlichen Bedingungen kultivierten Gewebepräparaten.

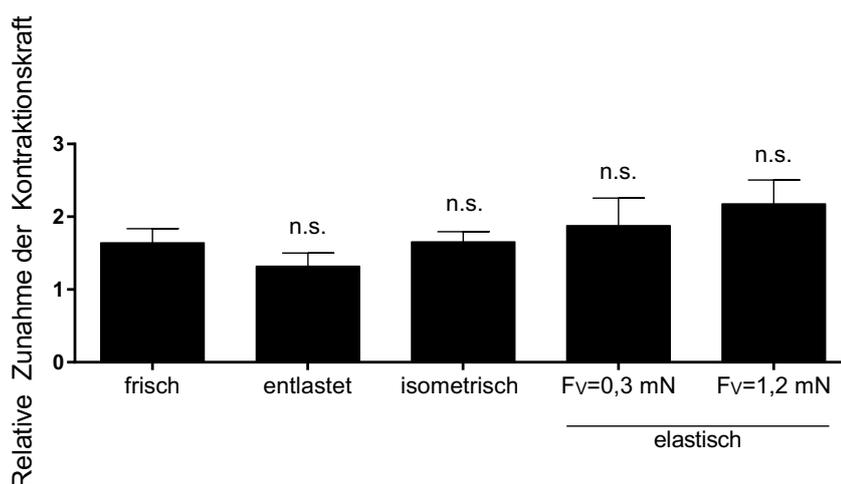


Abbildung 13: Testung der β -Rezeptor-vermittelten Inotropie der Gewebepräparate. Aufgezeigt ist die relative Zunahme der Kontraktionskraft der Schnitte nach Zugabe des β -Agonisten Isoproterenol. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulierbarkeit der frischen und der kultivierten Schnitte festgestellt werden. (n=8, MW±SEM). n.s.: p>0,05 im One-way ANOVA gegen die frischen Schnitte getestet

9.2.3 Kraft-Frequenz-Beziehung

Für die Untersuchung der Kraft-Frequenz-Beziehung wurden die frischen und die unter elastischen Bedingungen kultivierten Schnitte unter dem Einfluss des β -Agonisten Isoproterenol kurzzeitig mit stetig zunehmenden Frequenzen stimuliert.

In der graphischen Darstellung stellt die Kontraktionskraft der Schnitte bei 1 Hz den Referenzwert (100%) für die entwickelte Kraft bei der Stimulation mit höheren Frequenzen dar. Bei den frischen sowie den kultivierten Muskelschnitten wurde kein signifikanter Einfluss der Stimulationsfrequenz bis 10 Hz auf die Höhe der Kontraktion deutlich. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz der kontinuierlichen Kraftabnahme bei Erhöhung der Frequenz der Herzmuskelschnitte mit der diastolischen Gewebvorspannkraft von 0,3 mN, wohingegen die Kraft der frischen Schnitte zunächst abnahm und tendenziell ab 4 Hz wieder zunahm.

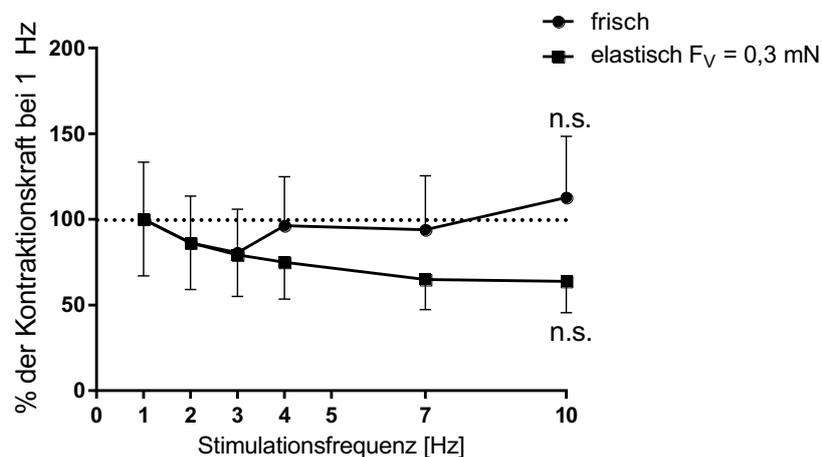


Abbildung 14: Kraft-Frequenz-Beziehung der frischen und der unter elastischen Bedingungen kultivierten Herzmuskelschnitte. Die Stimulationsfrequenz hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Kontraktionskraft der Schnitte. Tendenziell führte die Erhöhung der Stimulationsfrequenz zur kontinuierlichen Kraftabnahme der Muskelgewebeschnitte mit der diastolischen Vorspannkraft von 0,3 mN. Die Kraft der frischen Schnitte nahm zunächst ab und tendenziell ab 4 Hz wieder zu. (n=5, MW \pm SEM) *: p<0,05 im t-test gegen 1 Hz getestet

9.2.4 Maximale Kontraktionskraft

Alle kultivierten Muskelschnitte zeigten eine signifikant geringere Kontraktionskraft bei optimaler Vorspannkraft als die frischen Präparate, was als Funktionsverlust des Gewebes im Verlauf der Kultur gewertet werden kann.

Außerdem kam es innerhalb der verschiedenen Kultivierungsmethoden zu Unterschieden im Krafterhalt des Gewebes. Im direkten Vergleich der entlasteten und der isometrisch aufgehängten Schnitte wiesen letztere eine signifikant höhere maximale Kontraktionskraft nach der Kultur auf. Die maximale Kontraktionskraft der elastisch mit der Vorspannkraft von 0,3

mN aufgehängten Muskelschnitte betrug noch etwa die Hälfte der Kraft des frischen Gewebes. Diese Kulturmethode brachte somit einen ebenso signifikant besseren Erhalt der Kontraktilität als die entlastete und auch die elastische Kultivierung mit der geringeren Vorspannkraft von 0,1 mN mit sich.

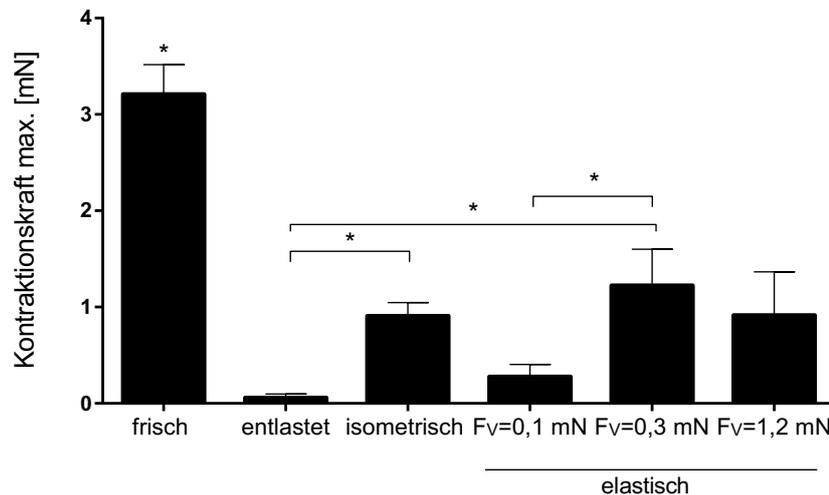


Abbildung 15: Maximale Kontraktionskraft der frischen und der kultivierten Herzmuskelschnitte. Die Kontraktilität nahm in allen kultivierten Schnitten während der Kultur signifikant ab. (n=6, MW±SEM) *: p<0,05 im One-way ANOVA mit Post hoc-Test gegen die frischen Schnitte getestet; Im Vergleich zu den entlastet kultivierten wiesen die isometrisch und mit 0,3 mN vorgespannten elastisch aufgehängten Schnitte einen signifikant besseren Krafterhalt während der Kultur auf. (n=6, MW±SEM) *: p<0,05 im One-way ANOVA mit Post hoc-Test

9.2.5 Gewebeelastizität

Die Gewebeelastizität gilt als Parameter des Strukturerhalts. Die kultivierten Muskelschnitte wiesen keine signifikante Veränderung der Gewebeelastizität im Vergleich zu den frischen Präparaten auf. Auch zwischen den einzelnen Kulturbedingungen zeigte sich in der Elastizität der Schnitte kein signifikanter Unterschied.

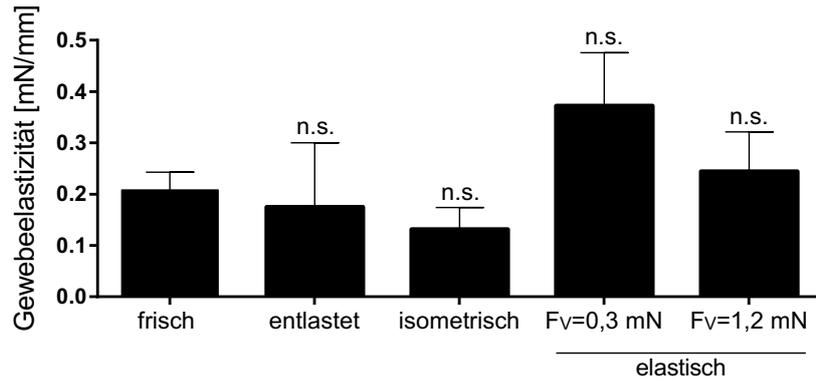


Abbildung 16: Vergleich der Gewebeelastizität der frischen und der kultivierten Herzmuskelschnitte. Die Gewebeelastizität veränderte sich in den Muskelpräparaten unter allen Kulturbedingungen nicht signifikant. Anhand der Gewebeelastizität konnte außerdem kein Unterschied im Strukturhalt des Gewebes zwischen den verschiedenen Kulturmethode eruiert werden. (n=6, MW±SEM) n.s.: p>0,05 im One-way ANOVA mit Post hoc-Test

9.3 Etablierung der Gewebekultur mit kontinuierlicher mechanischer Aktivität

Durch biomimetische Stimulation der Muskelschnitte sollte die physiologische Belastung des Herzmuskels während der Kultur simuliert werden, was zum besseren Gewebeerhalt führen sollte. Die Schnitte wurden dafür ausschließlich unter elastischer Aufhängung mit der diastolischen Vorspannkraft von 0,3 mN oder 1,2 mN kultiviert, während die Stimulation mit 0,1 Hz, 0,5 Hz oder 2 Hz angewandt wurde. Zur Kontrolle wurden unstimulierte Schnitte unter denselben Bedingungen kultiviert.

Der Vorteil der elastischen Aufhängung war die Möglichkeit der Daueraufzeichnung der aktiv und passiv entwickelten Kraft des Gewebes während der Stimulation. Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Aufzeichnung der Kontraktionen eines Gewebeschnittes über 48 Stunden bei optogenetischer Stimulation mit 0,1 Hz. Die Reizschwelle der Schnitte wurde am Anfang und am Ende der Kultur überprüft. Man erkennt eine deutliche Abnahme der Kontraktionskraft, eine Zunahme der Gewebespannung und einen Anstieg der Reizschwelle des Gewebes im Verlauf der Kultur. Im Folgenden wird auf jeden Parameter einzeln eingegangen, anschließend werden die strukturellen Veränderungen im Muskelgewebe beleuchtet.

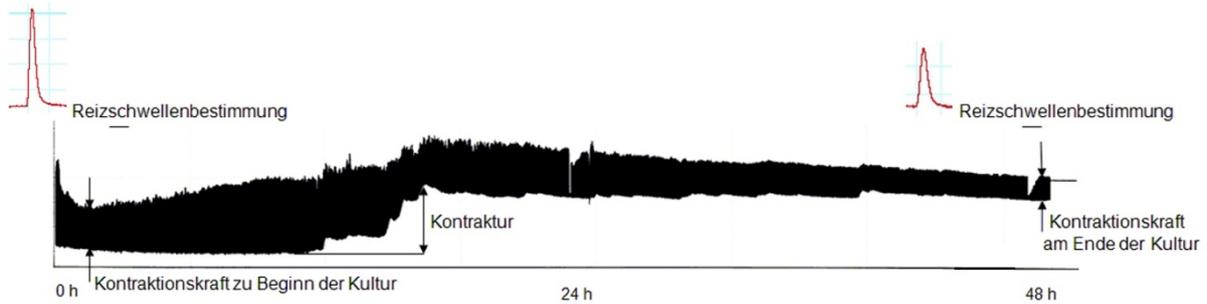


Abbildung 17: Daueraufzeichnung der Kontraktionskraft eines Gewebeschnittes während optogenetischer Stimulation. Die Kontraktionskraft der Muskelpräparate nahm im Verlauf der Kultur ab, während die diastolische Kraft und die Reizschwelle des Gewebes deutlich zunahm. Vergrößert dargestellt sind einzelne Kontraktionen jeweils zu Beginn und am Ende der Kultur.

9.3.1 Entwicklung der Kontraktilität

Abbildung 18 zeigt die Kontraktionskraft von Herzmuskelschnitten nach 48 Stunden bezogen auf die Kraft zu Kulturbeginn. Dabei ist unter allen Kulturbedingungen eine Reduzierung der Kontraktionskraft im Kulturverlauf zu beobachten. Es ist anzumerken, dass die unstimulierten Schnitte unter kontinuierlicher Kraftmessung einen deutlich geringeren Kraftabfall vermuten lassen als die Präparate, deren Kontraktionsamplitude nach der Kultur im Organbad ermittelt wurde (vgl. Abbildung 15).

Außerdem zeigte sich, dass die Stimulation des Gewebes einen Einfluss auf den Funktionserhalt des Gewebes hatte. Die Muskelschnitte mit der Vorspannkraft von 0,3 mN wiesen einen signifikant geringeren Krafterhalt nach Stimulation mit 0,5 Hz und 2 Hz als ohne Stimulation auf, wobei sich bereits die Stimulation mit 0,1 Hz negativ auf den Erhalt der Kontraktionskraft auszuwirken schien. Es kann somit angenommen werden, dass die kontinuierliche Erhöhung der Stimulationsfrequenz der mit 0,3 mN vorgespannten Schnitte zum immer schlechteren Funktionserhalt des Gewebes während der Kultur führte. Die mit der Vorspannkraft von 1,2 mN kultivierten Schnitte wiesen keinen signifikanten Funktionsverlust durch die Stimulation auf. Die Betrachtung der Mittelwerte führt jedoch zur Annahme, dass die Kraft des Gewebes auch unter dieser Kulturbedingung umso weniger erhalten werden kann, je schneller es stimuliert wird.

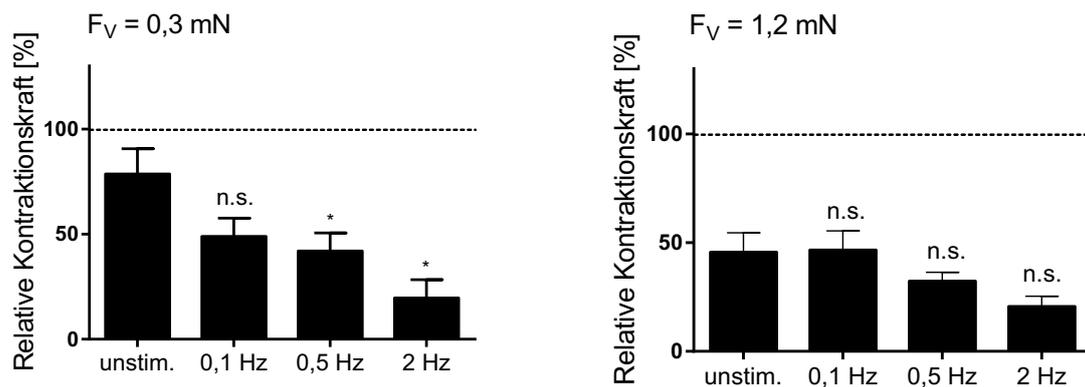


Abbildung 18: Einfluss der Stimulation mit verschiedenen Frequenzen auf den Krafterhalt der Gewebeschnitte. Die Kontraktionskraft der Schnitte am Ende der Kultur wurde auf die Kraft zu Kulturbeginn bezogen. Es kann angenommen werden, dass die Funktion des Gewebes mit Zunahme der Stimulationsfrequenz schlechter erhalten werden kann. (n=3-5, MW±SEM) *: p<0,05, n.s.: p>0,05 im One-way ANOVA mit Post hoc-Test gegen die unstimulierten Schnitte getestet

9.3.2 Tonische Kontraktur

Eine geringe Höhe der tonischen Kontraktur stand für einen besseren Erhalt der Herzmuskelzellen während der Kultur. Unter den Schnitten mit der Vorspannkraft von 0,3 mN war die tonische Kontraktur nur bei Stimulation mit 2 Hz signifikant stärker ausgeprägt als ohne Stimulation. Die mit 1,2 mN vorgespannten Schnitte wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der Kontraktur auf, jedoch führte die Stimulation mit 2 Hz auch unter diesen Bedingungen zu deutlich erhöhten Werten. Der Vergleich der Werte der unstimulierten Schnitte mit den verschiedenen Vorspannkraften untereinander lässt zudem auch keinen signifikanten Unterschied vermuten.

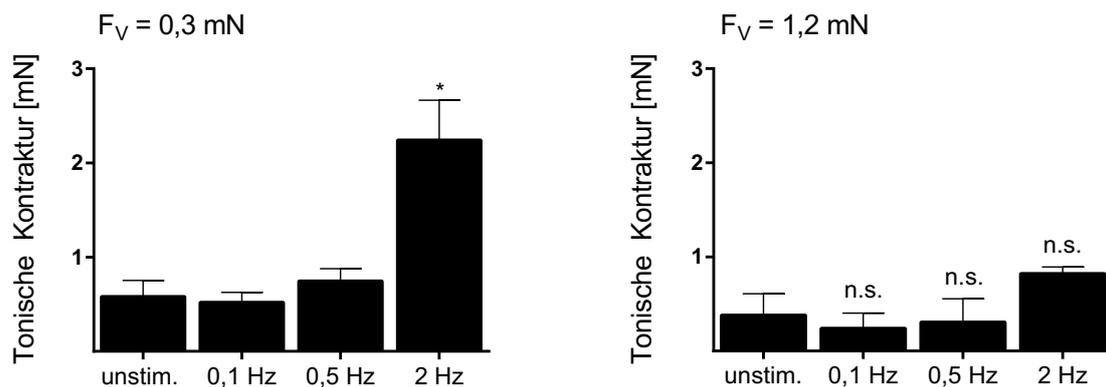


Abbildung 19: Einfluss der Stimulation mit verschiedenen Frequenzen auf die Höhe der tonischen Kontraktur der Herzmuskelschnitte. Die Stimulation mit 2 Hz führte in den mit der Vorspannkraft von 0,3 mN kultivierten Schnitten im Vergleich mit den unstimulierten Gewebepräparaten zu signifikant erhöhten Werten der tonischen Kontraktur. Auch bei Kultivierung mit der diastolischen Gewebespannung von 1,2 mN wiesen die Schnitte bei Stimulation mit 2 Hz erhöhte Werte auf. (n=2-5, MW±SEM) *: $p < 0,05$, n.s.: $p > 0,05$ im One-way ANOVA mit Post hoc-Test gegen die unstimulierten Schnitte getestet

9.3.3 Entwicklung der Reizschwelle

Obwohl die Herzmuskulatur aus einzelnen Zellen besteht, funktioniert sie durch Gap junctions an den Zellgrenzen als eine Einheit und wird deswegen als funktionelles Synzytium bezeichnet. Gap junctions sind zwischenzelluläre Kanäle, die von zwei benachbarten Zellen gebildet werden und aus insgesamt 12 Untereinheiten bestehen, den Connexinen (Boengler und Schulz, 2017). Bei Depolarisation mit einem definierten Schwellenpotenzial an einer beliebigen Stelle im Herzmuskel wird ein Aktionspotenzial ausgelöst. Die Gap junctions ermöglichen einen sehr schnellen Austausch von Ionen und Molekülen und somit die Ausbreitung von elektrischen Reizen, sodass es schließlich zur Kontraktion des ganzen Herzens in maximaler Stärke kommt, egal ob die Schwelle nur gering oder sehr deutlich überschritten wurde. Auf unterschwellige Reize hingegen erfolgt überhaupt keine Kontraktion. Wird auf einen ausgelösten Reiz im Herzgewebe nicht direkt mit maximaler Stärke reagiert, muss von einer Störung der Erregungsleitung im Herzen ausgegangen werden (Saffitz et al., 2007).

Um die Reizweiterleitung in den Herzmuskelschnitten zu untersuchen, wurde die Reizschwelle der Gewebeschnitte anhand der Stromstärke der Leuchtdiode, bei der 50% der zu dem Zeitpunkt der Kultur maximalen Kontraktionsamplitude erreicht wurden, ausgewertet. Zu Kulturbeginn wiesen die Muskelpräparate bei einer Stimulation mit dem schwächsten einstellbaren LED-Strom von ca. 8,8 mA bereits ihre maximal erreichbare Kontraktionskraft auf. Nach 48 Stunden waren die Reizschwellen für minimal erkennbare Kontraktionen und die maximal erreichbare

Kraft in allen Schnitten so weit auseinandergewichen, dass eine sehr viel höhere Stromstärke nötig war, um 50% der Kontraktionskraft des Muskelgewebes zu erreichen. Der Anstieg der Reizschwelle war signifikant. Es zeigte sich in dieser Hinsicht kein Unterschied zwischen den unstimulierten und den stimulierten Gewebepreparaten.

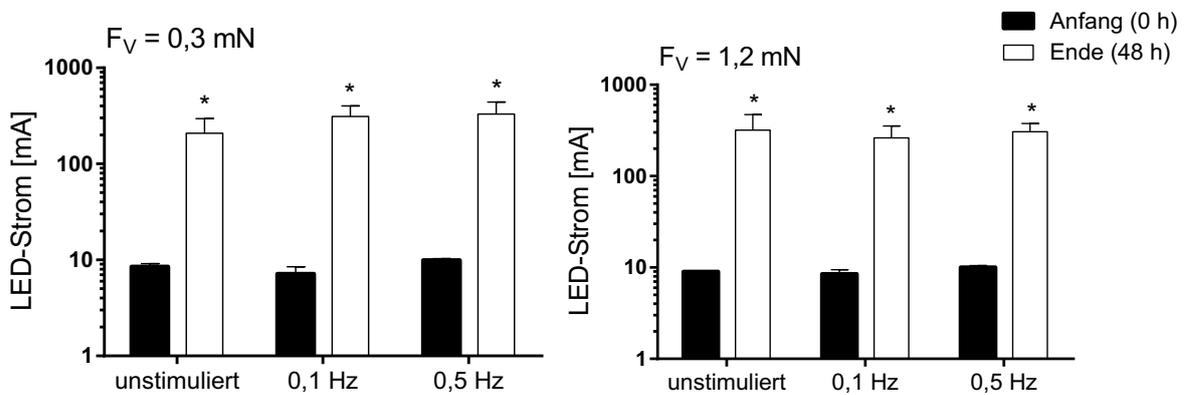


Abbildung 20: Entwicklung der Reizschwelle der Gewebeschnitte im Verlauf der Kultur. Zu Beginn der Kultur wiesen die Gewebepreparate bereits bei der Stimulation mit 8,8 mA ihre maximal erreichbare Kraft auf. Nach 48 h Kultur war die Reizschwelle für die Entwicklung der maximalen Kontraktionskraft so weit gestiegen, dass die EC50 um das mindestens 200-fache angestiegen war. (n=5, MW±SEM) *: $p < 0,05$ im Two-Way ANOVA mit Post hoc-Test

9.3.4 Strukturelle Veränderungen der Gewebeschnitte

Anordnung der Myofibrillen und Strukturverlust der Sarkomere

Für den Funktionserhalt des Muskelgewebes ist der Erhalt der räumlichen Struktur der Sarkomere maßgeblich. In der immunhistologischen Färbung der kultivierten Gewebeschnitte wiesen die Myofibrillen einen regelrechten Erhalt ihrer räumlichen Anordnung auf. Abbildung 21 zeigt beispielhaft den morphologischen Vergleich eines frischen mit einem während der Kultur elastisch aufgehängten Schnitt in der immunhistologischen Färbung mit anti- α -actinin und ToPro-3.

frisch

nach 48 h Kultur mit $F_V = 0,3 \text{ mN}$

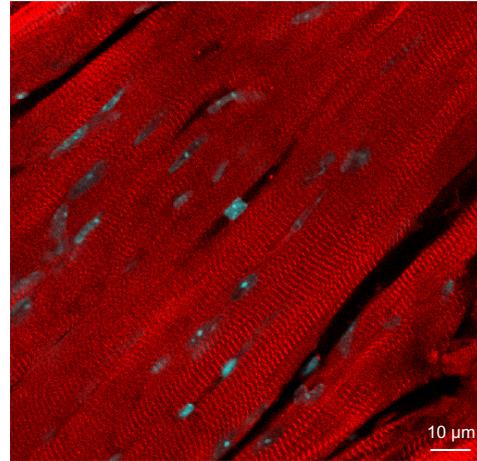
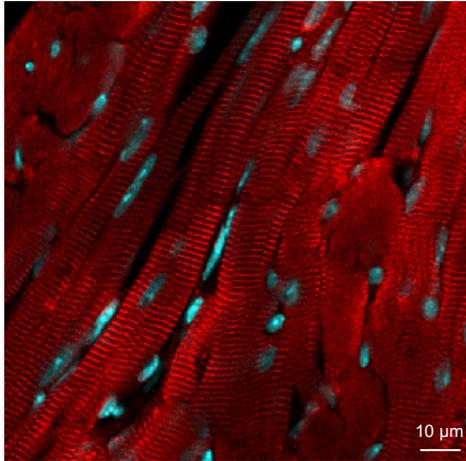


Abbildung 21: Vergleich der Anordnung der Sarkomere nach immunhistologischer Färbung der Myofibrillen (rot) und der Zellkerne (blau) in den Herzmuskelzellen eines frischen und eines kultivierten Gewebeschnittes mit der Vorspannkraft von 0,3 mN. Morphologisch zeigte sich kein Unterschied in der Anordnung der Myofibrillen zwischen dem frischen und dem kultivierten Schnitt.

Um den Strukturerthalt genauer zu untersuchen und eine potentielle Veränderung nach der Kultivierung darzustellen, wurde die Länge der Sarkomere in den Muskelzellen der einzelnen Schnitte ausgemessen. In den mit der diastolischen Gewebespannung von 1,2 mN kultivierten Präparaten konnte hierbei eine signifikante Längenzunahme der Sarkomere während der Kultur nachgewiesen werden, welche in den mit 0,3 mN vorgespannten Schnitten nicht festgestellt werden konnte. Im Two-Way ANOVA zeigte sich dementsprechend, dass die Höhe der diastolischen Vorspannkraft des Gewebes eine signifikante Zunahme der Länge der Sarkomere mit sich bringt. Die Variation der Stimulationsfrequenz hatte jedoch keine signifikante Auswirkung auf die Sarkomerlänge.

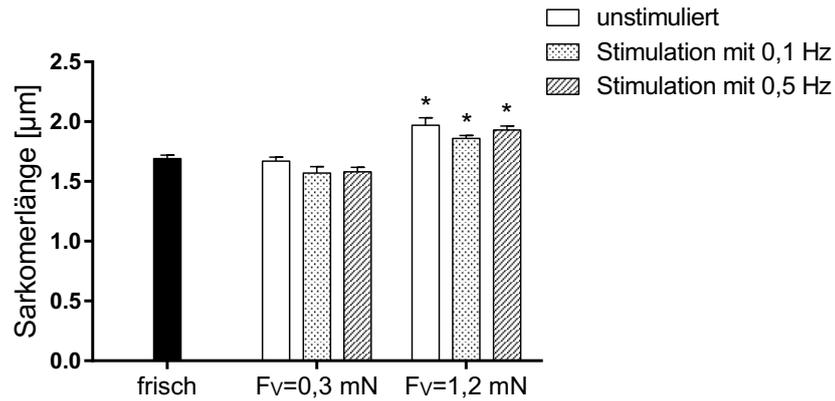


Abbildung 22: Einfluss der verschiedenen Kulturbedingungen auf die Sarkomerlänge der Herzmuskelzellen. Die Gewebeschnitte mit der diastolischen Vorspannkraft von 1,2 mN zeigten im Vergleich zu den Schnitten mit der Vorspannkraft von 0,3 mN eine signifikante Längenzunahme der Sarkomere im Verlauf der Kultur. Die diastolische Gewebespannung hat dementsprechend einen signifikanten Einfluss auf die Sarkomerlänge der Muskelschnitte, während die Variation der Stimulationsfrequenz keinen signifikanten Effekt mit sich bringt. (n=5, MW±SEM) *: p<0,05 im One-Way ANOVA mit Post hoc-Test gegen die frischen Schnitte getestet und im Two-Way ANOVA mit Post hoc-Test

Verteilung von Connexin-43 entlang der Zellmembran

In den Kardiomyozyten bestehen die Gap Junctions vorwiegend aus dem Protein Connexin-43. Aufgrund des starken Anstiegs der Reizschwelle der kultivierten Gewebeschnitte sollte die Verteilung von Connexin-43 entlang der Zellmembranen der kultivierten Herzmuskelschnitte untersucht und mit den frischen Schnitten verglichen werden.

Wie in Abbildung 23 zu sehen, zeigte sich in allen Präparaten eine selektive Konzentrierung des Proteins entlang der Glanzstreifen. Es konnte hierbei kein Unterschied zwischen den frischen und den kultivierten Schnitten beobachtet werden. Daraus kann gefolgert werden, dass während der Kultur keine räumliche Umverteilung von Connexin-43 stattfand.

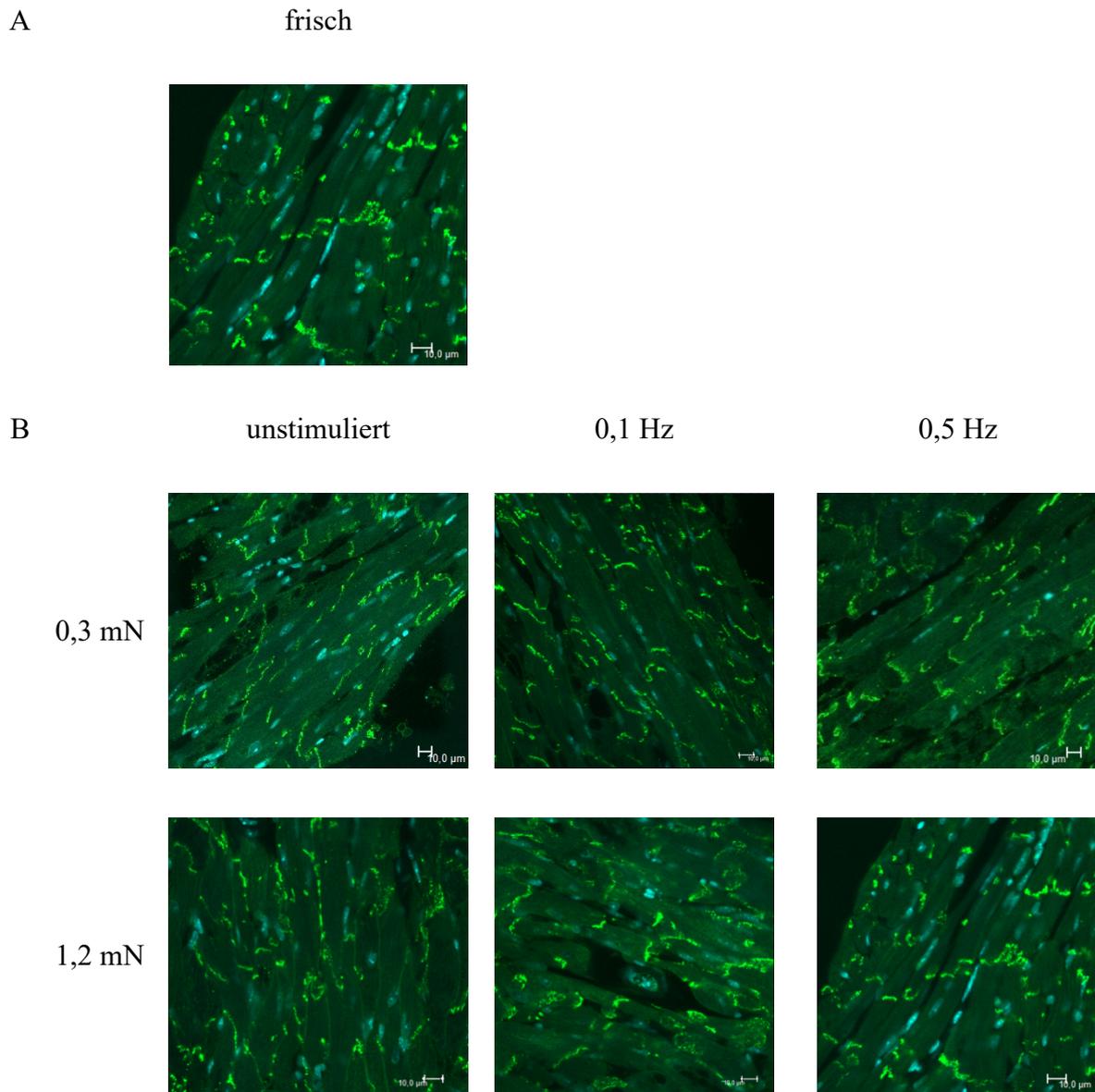


Abbildung 23: Immunhistologische Färbung zum Vergleich der Verteilung von Connexin-43 (hellgrün) entlang der Zellmembran der Herzmuskelzellen in frischen (A) und unter verschiedenen Bedingungen kultivierten (B) Gewebeschnitten. Das Protein Connexin-43 zeigte eine regelrechte Verteilung entlang der Glanzstreifen der kultivierten Zellen. Es konnte demnach keine Umverteilung des Proteins während der Kultur unter den verschiedenen Bedingungen beobachtet werden.

9.4 Erprobung protektiver Bedingungen

Bei der Erprobung protektiver Bedingungen, welche dazu beitragen sollten, den Gewebeerhalt unter Stimulation zu verbessern, wurden die Entwicklung der Kontraktilität und die Ausprägung der tonischen Kontraktur der Schnitte während der Kultur als Vergleichsparameter gewählt. Aufgrund des guten Kraft- und Strukturerhalts (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 21) der Muskelschnitte mit der diastolischen Gewebespannung von 0,3 mN wurde diese

Ausgangsbedingung für die Versuche gewählt. Im Folgenden werden die Maßnahmen zur Gewebeprotektion aufgeführt.

9.4.1 Oxidationsschutz durch β -Mercaptoethanol

Diese Maßnahme wurde zunächst an unstimulierten Gewebeschnitten erprobt. Dem Kulturmedium wurden 50 μ M der Disulfidbrücken reduzierenden Substanz β -Mercaptoethanol hinzugegeben, was als Oxidationsschutz des Gewebes dienen sollte. Die Kontraktionskraft der Schnitte unter dem Einfluss des Antioxidans war nach 48 Stunden Kultur signifikant höher als in den Schnitten ohne Hinzugabe der Substanz. Eine Verminderung der Höhe der tonischen Kontraktur zeigte sich jedoch in den Schnitten mit Oxidationsschutz nicht.

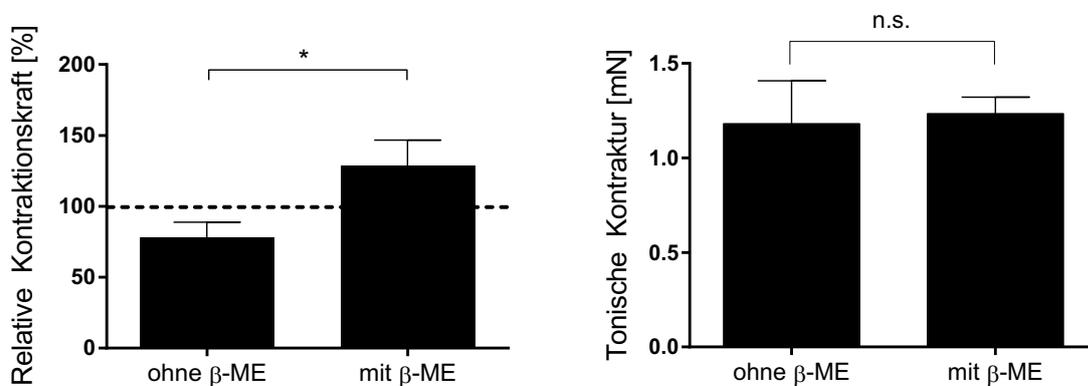


Abbildung 24: Einfluss der Substanz β -Mercaptoethanol auf den Gewebeerhalt während der Kultur. Zur Ermittlung des Einflusses des Antioxidans wurde die Kontraktionskraft der Schnitte am Ende der Kultur auf die Kraft zu Kulturbeginn bezogen. In den Gewebeschnitten unter dem Einfluss von β -Mercaptoethanol war die Kontraktionskraft der Gewebeschnitte nach 48 Stunden Kultur signifikant höher als in den Schnitten ohne Hinzugabe der Substanz, eine Verminderung der Höhe der tonischen Kontraktur der Gewebeschnitte konnte dadurch jedoch nicht erreicht werden. (n=3, MW \pm SEM) *: p<0,05, n.s.: p>0,05

9.4.2 Verbesserung der Sauerstoffversorgung

Durch die Muskelkontraktionen während der Stimulation erhöht sich der Sauerstoffbedarf des Herzwebes. Deswegen stellte der Versuch der besseren Sauerstoffversorgung eine Maßnahme des besseren Gewebeerhalts während der Kultur unter Stimulation dar. Dafür wurden die unstimulierten und die mit der Frequenz von 0,1 Hz stimulierten Schnitte mithilfe des Schüttlers „Rapid Rocker“ 70-mal pro Minute seitlich um 15° gekippt. Dies sollte im Vergleich zum horizontalen Kreisen mehr Sauerstoff an das Gewebe heranbringen. Da die Stimulation auch zur vermehrten Bildung von Radikalen führen kann, wurde auch in diesem Versuch β -Mercaptoethanol eingesetzt.

Es wurde deutlich, dass die stärkere Konvektion von Sauerstoff im Medium tatsächlich zu einem signifikant besseren Krafterhalt der Gewebeschnitte unter Stimulation führte. Auch die Höhe der tonischen Kontraktur der stimulierten Schnitte konnte mithilfe der stärkeren Sauerstoffkonvektion signifikant vermindert werden.

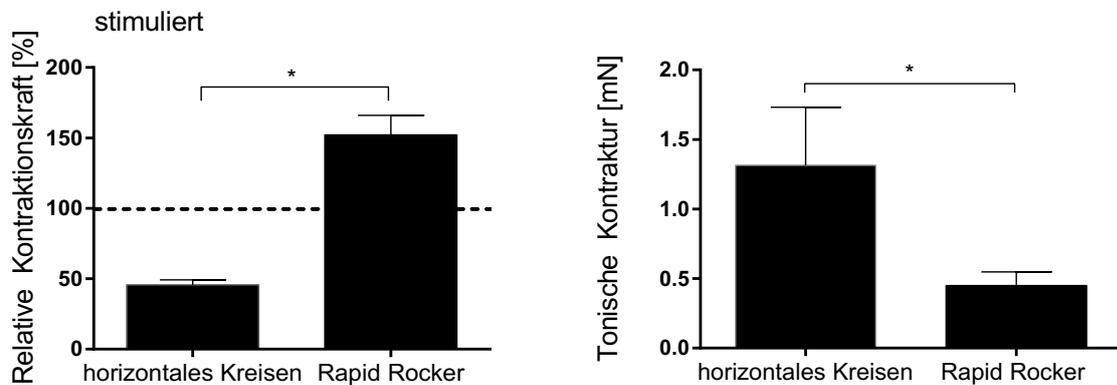


Abbildung 25: Einfluss der stärkeren Konvektion von Sauerstoff im Kulturmedium durch den Schüttler „Rapid Rocker“ auf den Krafterhalt und die Ausbildung der tonischen Kontraktur stimulierter Gewebeschnitte. Die stärkere Sauerstoffkonvektion wirkte sich signifikant positiv auf den Krafterhalt sowie die Höhe der tonischen Kontraktur der stimulierten Herzmuskelschnitte aus. (n=3-5, MW±SEM) *: p<0,05 im t-test

Durch die Versuche der Kultivierung mit dem Schüttler „Rapid Rocker“ zeigte sich jedoch auch, dass die Kontraktionskraft der unstimulierten Gewebeschnitte ebenso nach Optimierung der Sauerstoffversorgung während der Kultur anstieg und durch die optogenetische Stimulation gar nicht weiter gesteigert werden konnte. Eine Tendenz der Verminderung der tonischen Kontraktur durch die Stimulation war jedoch vorhanden.

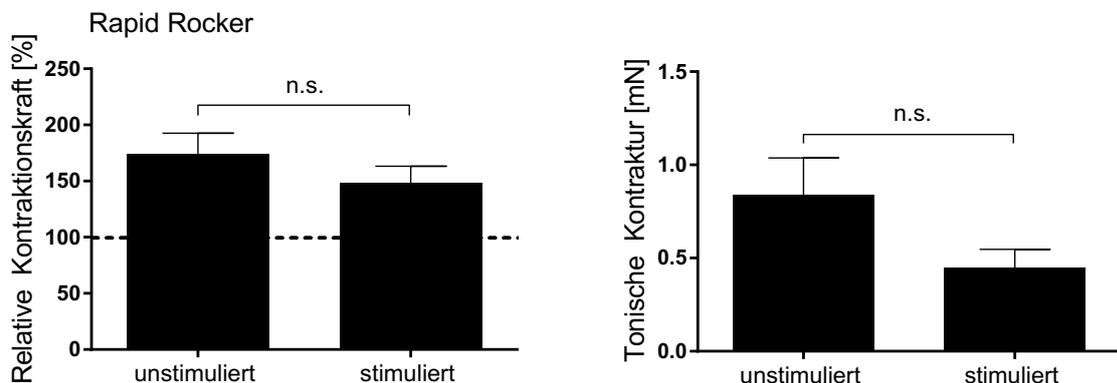


Abbildung 26: Krafterhalt und Ausbildung der tonischen Kontraktur der unstimulierten und stimulierten Schnitte während der Kultivierung auf dem Schüttler „Rapid Rocker“. Eine Steigerung der Kontraktionskraft durch die Stimulation des Gewebes konnte nicht nachgewiesen werden. Die stimulierten Schnitte zeigten jedoch tendenziell eine verminderte Höhe der tonischen Kontraktur. (n=3-5, MW±SEM) n.s.: p>0,05 im t-test

9.5 Simulation pathophysiologischer Einflüsse

Es sollte untersucht werden, ob durch die Zugabe des Peptidhormons Angiotensin II, welches in vivo zur Hypertrophie von Herzmuskelzellen führt (Mathieu et al., 2018), auch in den murinen Herzgewebeschnitten ein pathologischer Zustand ausgelöst werden kann. Es wurde jedoch ersichtlich, dass die Kontraktionskraft in den stimulierten und mit β -Mercaptoethanol angereicherten Schnitten durch die Substanz nicht beeinflusst werden konnte.

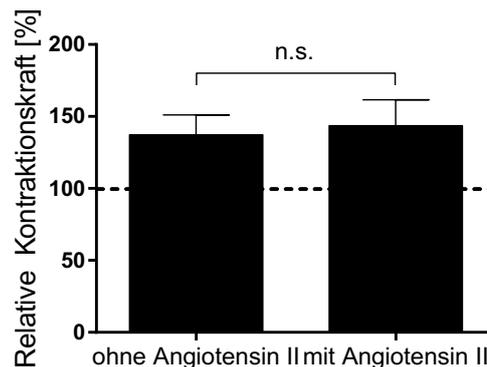


Abbildung 27: Einfluss von Angiotensin II auf die Entwicklung der Kontraktionskraft der stimulierten Gewebeschnitte während der Kultur. Das Peptidhormon zeigte keine signifikanten Auswirkungen auf den Krafterhalt des Herzmuskelgewebes. (n=5, MW \pm SEM) n.s.: p>0,05 im t-test

9.6 Auswirkung verschiedener Kulturbedingungen auf die Genexpression

Durch Untersuchung der Genexpression auf mRNA-Ebene kann eine potentielle zelluläre Dedifferenzierung der kultivierten Gewebeschnitte erkannt werden. Hierfür wurden folgende funktional bedeutsame Gene der Kardiomyozyten ausgewählt: MLC-2v, SLC2A1, GJA1, N2A und N2B.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Gewebeschnitte mit der diastolischen Gewebespannung von 0,3 mN auf dem Kreisschüttler kultiviert. Die Stimulationsfrequenz in den stimulierten Schnitten (stim.) betrug 0,1 Hz.

Sowohl das Gen MLC-2v, welches für die Myosin-Leichtkette 2 des ventrikulären Herzmuskels kodiert, als auch GJA1 waren in allen kultivierten Muskelschnitten signifikant schwächer exprimiert als in den frischen. Insbesondere führte die Zugabe von Angiotensin II zu den Gewebeschnitten zu keiner vermehrten Expression von MLC-2v. Im Gegensatz dazu stieg die Expression des Hypoxiemarkers SLC2A1 unter allen Kulturbedingungen signifikant während der Kultur an. Auffallend war hierbei eine signifikant geringere Expression von SLC2A1 in den Schnitten, welche unter Verwendung des Schüttlers „Rapid Rocker“ kultiviert wurden, verglichen mit der Kultur auf dem Horizontalschüttler. Das Verhältnis von N2A zu N2B als

Marker der Steifigkeit des Muskelgewebes war in allen Schnitten nach der Kultur signifikant erhöht.

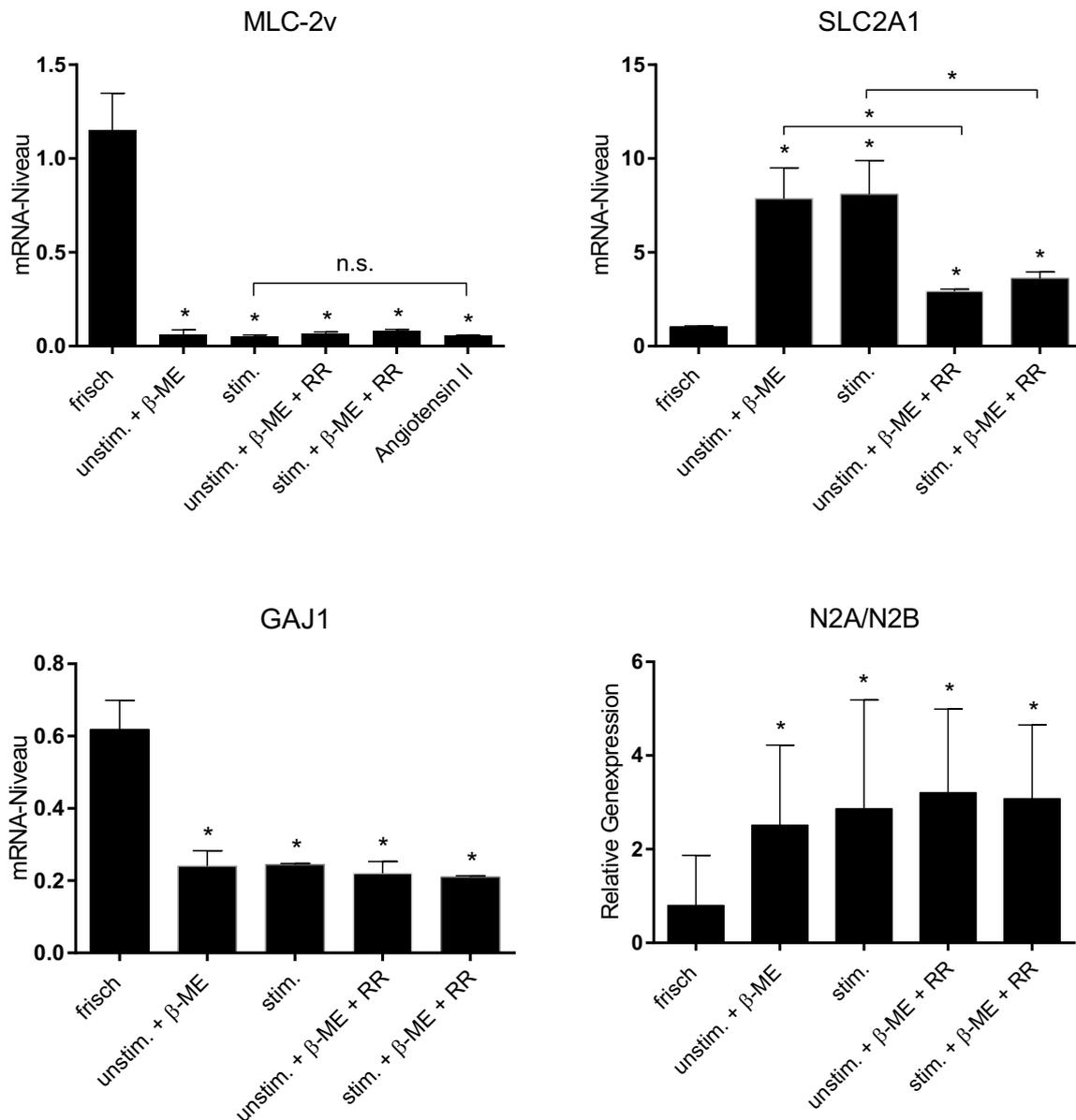


Abbildung 28: mRNA-Niveau kardialer Gene in den frischen und kultivierten Herzmuskelschnitten. Die Expression der Gene MLC-2v und GJA1 war in den kultivierten Schnitten signifikant geringer als im frischen Gewebe, während die Expression des Hypoxiemarkers SLC2A1 während der Kultur signifikant zunahm. Ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Expression von SLC2A1 konnte durch Verwendung des Schüttlers „Rapid Rocker“ beobachtet werden. Das Verhältnis der Expression von N2A zu N2B war in dem kultivierten Gewebe signifikant erhöht. (n=3-12, MW+SEM) *: p<0,05 im One-way ANOVA mit Post hoc-Test

10 Diskussion

10.1 Stand der Technik der Herstellung und Kultivierung von organotypischen Herzgewebeschnitten

Das Modell der organotypischen Herzschnitte wurde bisher in verschiedenen Bereichen der kardiovaskulären Forschung eingesetzt. Die erste Anwendung fand es bereits 1976 in der biochemischen Erforschung des Herzmuskels (Claycomb, 1976). Pharmakologische Substanzen wurden erstmals in den 1980ern an ihnen getestet (Neri et al., 1984). Zur gleichen Zeit wurden damit erste relevante Studien in der kardialen Elektrophysiologie gemacht (Katano et al., 1984), welche später sogar in Patch-clamp Experimenten resultierten (Burnashev et al., 1990). Im Jahr 2003 wurde schließlich demonstriert, dass neonatale Herzschnitte aus Ratten mehr repräsentative elektrophysiologische Eigenschaften als kultivierte Monolayer oder myokardiale Konstrukte aus dem Bereich des Tissue Engineering haben (Bursac et al., 2003). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden nur Rattenherzen für die Gewebeschnitte verwendet. Pillekamp et al. führten 2005 auf, dass die Gewebeschnitte auch aus Mäuseherzen präpariert werden können. Dies eröffnete die Möglichkeit, die kardialen Phänotypen von genetisch veränderten Mäusen mit der Gewebeschnitt-Technik zu untersuchen (Pillekamp et al., 2005). Pillekamp et al. zeigten weiterhin, dass eine Kultivierung von Gewebeschnitten aus neonatalen Mäuseherzen von bis zu 20 Stunden möglich ist (Pillekamp et al., 2007). Mit den ersten Präparationen von organotypischen Gewebeschnitten aus humanen ventrikulären Myokardbiopsien von Camelliti et al. war man bei der Präparation der Schnitte nicht mehr auf tierisches Myokard angewiesen, sodass der Aspekt der Speziesunterschiede irrelevant wurde (Camelliti et al., 2011). Angelehnt an die Arbeiten von Pillekamp et al. wurden in der eigenen Arbeitsgruppe die ersten Versuche zur Kultivierung humaner kardialer Gewebeschnitte auf organotypischen Membranen (PICM0RG50, Millipore, USA) gemacht. Die Präparate konnten über 28 Tage lang mit guter Vitalität erhalten werden, bereits nach einem Tag Kultur wiesen sie jedoch nur noch etwa 10% der Kontraktionskraft von frischem Herzmuskelgewebe auf. Nach dieser Periode konnten schließlich signifikante mechanische und elektrophysiologische Veränderungen des Gewebes nachgewiesen werden (Brandenburger et al., 2012).

10.2 Etablierung optimaler Kulturbedingungen

10.2.1 Bedeutung der mechanischen Belastung

Ziel dieser Arbeit war es, die bereits in der eigenen Arbeitsgruppe etablierte Methode der Langzeitkultivierung von humanen Herzmuskelschnitten auf murines Gewebe zu übertragen und diese hinsichtlich des Funktionserhalts der Gewebeschnitte zu verbessern. In den ersten Versuchen zeigte sich, dass die mechanisch entlastete Adhäsion an spezielle Membranen (PICMORG50, Millipore, USA) auch zu einem erheblichen Kraftverlust des murinen Herzgewebes während der Kultur führt (vgl. Abbildung 15).

Kardiomyozyten weisen zahlreiche mechanosensitive Rezeptoren zur Anpassung an die Wandspannung im Herzen auf, welche in der Diastole durch die passive Ventrikelfüllung und in der Systole durch die aktive Kontraktion des Herzmuskels bedingt ist (Russell et al., 2010). Verantwortlich für die adaptive Antwort der Zellen auf die mechanische Belastung sind zelluläre Prozesse der Aufnahme und der Umwandlung des physikalischen Stimulus in strukturelle und biochemische Reaktionen, die als Mechanotransduktion bezeichnet werden. Diese Prozesse beeinflussen die Pumpleistung des Herzens, aber auch die Proliferation, Differenzierung, das Wachstum und das Überleben von zellulären Komponenten des Myokards (Samarel, 2005). Die entlastete Kultivierung der Herzmuskelschnitte auf den Membranen führt im Vergleich zur Kraftentwicklung bei mechanischer Belastung zur Ausbildung von ungerichteten Kräften und zur ungleichmäßigen Kraftverteilung im Gewebe, welche zur Dedifferenzierung der Zellen führen und für die verminderte Vitalität und den Abfall der Kontraktionskraft am Ende der Kultur verantwortlich sein könnte.

Es konnte tatsächlich gezeigt werden, dass sowohl die Vitalität als auch die Kontraktilität des Herzmuskelgewebes unter definierter diastolischer Gewebespannung von 0,3 mN, was in etwa der mittleren enddiastolischen Wandspannung im Mäuseherzen entspricht (vgl. Kapitel 8.2.3), besser erhalten werden kann als unter mechanisch entlasteter Kultivierung. Der Vergleich mit den Gewebeschnitten, welche mit der Vorspannkraft von 0,1 mN kultiviert wurden, macht deutlich, dass die Höhe der Gewebespannung für den Krafterhalt eine entscheidende Rolle spielt (vgl. Abbildung 15).

Der physiologische Bereich der diastolischen Spannung im Mäuseherzen stellt hierbei klar das Optimum für den Erhalt der Kontraktilität der Schnittpräparate dar. Gleichermäßen imitiert eine zu hohe Gewebespannung den pathologischen Zustand der Vorlasterrhöhung im Herzgewebe, welcher sich beispielsweise im Rahmen einer Aortenklappeninsuffizienz einstellt. In den

murinen Herzmuskelschnitten führte die diastolische Gewebespannung von 1,2 mN, welche weit über der physiologischen enddiastolischen Wandspannung im Mäuseherzen liegt, zu einer Längenänderung der Sarkomere von 1,80 μm auf 2,00 μm während der Kultur, wobei die Zunahme der Sarkomerlänge einen gut untersuchten Parameter von diastolischer Dehnung des Muskelgewebes darstellt (vgl. Abbildung 22).

Die pathologisch erhöhte diastolische Vorspannkraft der Muskelgewebeschnitte führte nachweislich zu einem geringeren Erhalt der Kontraktionskraft während der Kultivierung (vgl. Abbildung 15).

Jedoch zeigte die kontrollierte Kraftmessung im Organbad am Ende der Kultur ebenso, dass auch durch die Anwendung von definierter diastolischer Gewebespannung im physiologischen Bereich des murinen Herzmuskelgewebes allein nur etwa die Hälfte der Höhe der Kontraktionskraft der Schnitte erhalten werden konnte (vgl. Abbildung 15).

Trotz Abnahme der Kontraktilität konnte dennoch gezeigt werden, dass essenzielle myokardiale Eigenschaften des Gewebes während der Kultur bewahrt werden konnten. Das kultivierte Herzmuskelgewebe wies eine unveränderte Reaktion bei Zugabe des β -Agonisten Isoproterenol auf (vgl. Abbildung 13). Aus Transplantationsstudien geht hervor, dass die Dichte an β -Adrenozeptoren in transplantierten Herzen nach Denervierung vergrößert ist, was zu einer stärkeren Reaktion auf Isoproterenol führt (Yusuf et al., 1987). In den Muskelschnitten schien sich demnach die β -Adrenozeptordichte nicht zu ändern. Gegen eine hochgradige Umdifferenzierung des Gewebes spricht die deutlich erkennbare Z-Streifung und die unveränderte Anordnung der Myofibrillen in den kultivierten Schnitten (vgl. Abbildung 21).

Die Abnahme der mRNA-Expression ausgewählter wichtiger kardiomyozytärer Gene lässt im Gegensatz dazu auf eine strukturelle Umdifferenzierung der Herzmuskelzellen während der Kultur schließen. Zu den signifikant schwächer exprimierten Genen zählten MLC-2v, GJA1, N2A und N2B (nicht gezeigt), welche für die Isoform der Myosin-Leichtkette 2 des ventrikulären Herzmuskels, das Transmembranprotein Connexin-43 und für zwei Isoformen des Strukturproteins Titin kodieren. Das Verhältnis der Expression von N2A zu N2B war im kultivierten Gewebe signifikant höher als in den frischen Schnitten (vgl. Abbildung 28). N2A ist die größere, weichere Isoform von Titin. Ein erhöhtes N2A/N2B-Verhältnis entsteht zum Beispiel im Rahmen der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) (Nagueh et al., 2004) und spricht für eine erhöhte Compliance und somit verminderte Steifigkeit des Muskelgewebes (Cazorla et al., 2000). Eine Abnahme der Steifigkeit der Herzmuskelschnitte konnte mittels isometrischer Kraftmessung im Organbad nicht detektiert werden (vgl. Abbildung 16), was diese als geeignete Methode zur Ermittlung der Gewebeelastizität in Frage stellt, und könnte einen

Hinweis auf eine unphysiologische Biomechanik trotz elastischer Aufhängung, unabhängig von der Höhe der diastolischen Gewebespannung, während der Kultur darstellen.

10.2.2 Möglichkeit der kontinuierlichen Stimulation und Kraftmessung

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass die Kultivierung von humanem Herzmuskelgewebe ohne mechanische Stimulation zur signifikanten Umstrukturierung und Dedifferenzierung der Kardiomyozyten führt, die sich in einer verringerten Expression der Myosin Leichtkette-2 und einer verminderten Kontraktionskraft äußert (Brandenburger et al., 2012). Im Gegensatz dazu hatten Berger et al. im Jahr 1994 gezeigt, dass elektrische Stimulation zur Bewahrung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von isolierten Herzmuskelzellen aus Ratten führt (Berger et al., 1994) und mehrere darauffolgende Studien belegten den fast vollständigen Erhalt der Kontraktilität beim Anwenden der Methode auf Herzmuskelschnitte über mehrere Tage in Kultur (Janssen et al., 1999, Watson et al., 2019, Ou et al., 2019).

Bei der Methode der elektrischen Stimulation wird dem Muskelgewebe ein externes elektrisches Feld angelegt, welches lokale Aktionspotentiale induziert, die sich gleichmäßig in die gekoppelten Nachbarzellen ausbreiten. Die Anwendung von elektrischem Strom am Gewebe führt jedoch zu irreversiblen elektrochemischen Reaktionen, die zur Bildung der giftigen Gase H_2 , O_2 oder Cl_2 und schließlich zu Änderungen des pH-Werts im Gewebeschnitt führen können (Bruegmann et al., 2010). Weitaus gewebeschonender ist die Methode der optogenetischen Stimulation (Govorunova et al., 2015), welche in der Neurowissenschaft weit verbreitet ist und auch in der kardiovaskulären Forschung bereits Anwendung findet (Arrenberg et al., 2010, Bruegmann et al., 2010, Bruegmann et al., 2016). Mithilfe gentechnischer Methoden wird das Gen ChR2, welches für den lichtempfindlichen Ionenkanal Channelrhodopsin-2 der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* kodiert, in Herzmuskelzellen exprimiert. Bei Bestrahlung der Zellen mit blauem Licht der Wellenlänge von 475 nm öffnen sich diese Kanäle und führen zu einem vermehrten Einstrom von Kationen in das Zellinnere, sodass es schließlich zur Depolarisation der Zellen kommt. Brügmann et al. wandten die Methode erstmals auf ChR2-exprimierende Kardiomyozyten in Monolayern an, welche aus genetisch veränderten murinen Stammzellen hergestellt wurden. Sie stellten dar, wie eine präzise lokale Stimulation von zweidimensionalen Kulturen von Herzmuskelzellen durch gepulste Beleuchtung eines Bereichs eine elektrische Aktivität in einzelnen Zellen hervorruft, welche sich anschließend auf alle Zellen eines Monolayers ausbreitet (Bruegmann et al., 2010).

Die optogenetische Stimulation der Herzmuskelschnitte der genetisch veränderten Mäuse führte zu morphologisch deutlich sichtbaren Kontraktionen des Muskelgewebes. Im ersten erprobten Ansatz der Aufhängung der Schnitte führte die Stimulation zu isometrischen Kontraktionen der Muskelzellen und ist dementsprechend vergleichbar mit den Arbeiten von Janssen et al. und Watson et al. (Janssen et al., 1999, Watson et al., 2019). Die isometrische Muskelkontraktion in Kultur bildet jedoch die physiologische Kontraktionsform im Herzmuskel nicht ausreichend ab. Die aus der elastischen Aufhängung resultierenden Kontraktionen der Muskelschnitte nähern sich der physiologischen auxotonen Kontraktionsform des Herzmuskels deutlich mehr an.

Die Messung der Kontraktionsamplitude der Schnitte am Ende der Kultur wurde vor der Möglichkeit der kontinuierlichen Aufzeichnung der elastischen Kontraktionen unter isometrischen Bedingungen im Organbad durchgeführt (vgl. Abbildung 15).

Der Unterschied in der Methode der Kraftmessung am Ende der Kultur könnte den geringeren Kontraktilitätsverlust der unstimulierten Schnitte in Abbildung 18 erklären: die elastisch aufgehängten Gewebeschnitte mit der diastolischen Vorspannkraft von 0,3 mN wiesen nach 48 Stunden noch bis zu 80% der Kontraktionskraft zu Kulturbeginn auf.

10.2.3 Bedeutung der Sauerstoffversorgung und der Verminderung von oxidativem Stress bei der Gewebekultivierung

Für die Erhaltung ihrer Struktur und für die ungestörte Erfüllung ihrer spezifischen Funktionen benötigen Zellen eine kontinuierliche Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Zur Gewinnung von ATP mithilfe der Atmungskette ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff zwingend notwendig. Die gewählte Schnittdicke von 300 µm gewährleistet die Diffusion von Sauerstoff und anderen wichtigen Nährstoffen in alle Zellen der Herzmuskelschnitte und sollte somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung des ruhenden Gewebes sicherstellen (Parrish et al., 1995). Da die Muskelkontraktion jedoch einen sauerstoffverbrauchenden Prozess darstellt (Monroe, 1964), steigt durch die Stimulation dementsprechend der Sauerstoffbedarf der Zellen, während sich die Situation der Sauerstoffversorgung nicht ändert. Es ist somit naheliegend, dass sich bei Stimulation der Herzmuskelschnitte ein Sauerstoffmangel im Gewebe einstellt, was die Funktion der Muskelzellen deutlich beeinträchtigen kann. Tatsächlich nahm die Kontraktilität der Präparate im Verlauf der Kultur umso mehr ab, je höher die Frequenz der Stimulation gewählt wurde (vgl. Abbildung 18) wobei sich die maximal angewandte Frequenz von 2 Hz noch deutlich unterhalb der physiologischen Herzfrequenz der Maus befindet, die etwa 13,3 Hz

beträgt (Offerhaus et al., 2021). Ein weiterer Parameter der ungenügenden Sauerstoffversorgung von Muskelgewebe ist die Ausbildung der ischämischen Kontraktur, welche dem starken Abfall von ATP in den Zellen geschuldet ist (Hearse et al., 1977). In den Herzmuskelschnitten äußerte sich diese im Anstieg der diastolischen Gewebespannung im Verlauf der Kultur. Die tonische Kontraktur war nach 48 Stunden in den Schnitten, die mit der subphysiologischen Frequenz von 2 Hz stimuliert wurden, sehr deutlich ausgeprägt, jedoch zeigten auch unstimulierte Gewebeschnitte einen Anstieg ihrer passiven Kraft (vgl. Abbildung 19). Auch die Kraft-Frequenz-Beziehung (engl. Force-Frequency-Relationship, kurz FFR) der kultivierten Schnitte deutet auf hypoxische Bedingungen im Herzmuskelgewebe hin (vgl. Abbildung 14). Bei einigen Tierarten, einschließlich Ratte und Maus, wird eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung in der Primärphase über den Niederfrequenzbereich bis zu ungefähr 0,5-1 Hz (Ratte) und 1-2 Hz (Maus) verzeichnet (Endoh, 2004). Marin et al. konnten 2005 zeigen, dass eine komplett negative Kraft-Frequenz-Beziehung in isolierten Rattenherzen mit einem reduzierten myokardialen Sauerstoffzufuhr zusammenhängt (Marin und Franchini, 2005), sodass auch ein Zusammenhang zwischen der gestörten FFR und einem Sauerstoffmangel in den murinen Herzgewebeschnitten angenommen werden kann.

Um die Sauerstoffversorgung des Herzmuskelgewebes zu verbessern, sollte die Verteilung des Gases innerhalb des Mediums, in dem sich die Schnitte in Suspension befinden, erleichtert werden. Dazu wurde ein Schüttler eingesetzt, welcher die Muskelschnitte, die zuvor nur 20-mal horizontal gekreist wurden, 60-mal pro Minute seitlich um 15° während der Kultivierung kippte. Die Muskelkontraktionen sollten zudem den Transport des im Medium verteilten Sauerstoffs in angeschnittene Kapillaren und zwischenzelluläre Bereiche des Gewebes gewährleisten.

Durch eine vermehrte Sauerstoffbereitstellung kann es jedoch auch zur vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen (engl. Reactive oxygen species, kurz ROS) kommen (Maimon et al., 2018), ebenso werden durch Belichtung der Schnitte vermehrt ROS im Gewebe generiert (Kumar Rajendran et al., 2019). ROS sind im biologischen Kontext für den Organismus wichtige Signalmoleküle (Shadel und Horvath, 2015), welche als unvermeidliche Nebenprodukte während der Energiegewinnung der Zellen entstehen, führen aber in erhöhter Konzentration durch ihre oxidierenden Eigenschaften zur Schädigung von zellulären und extrazellulären Makromolekülen (Poetsch, 2020). Die chemisch-organische Verbindung β -Mercaptoethanol schützt durch Steigerung der Bildung des Radikalfängers Glutathion (Takahashi et al., 1993) vor oxidativem Stress im Gewebe (Ross, 1988), demnach sollte sie den Schnitten zusätzlich zugegeben werden. Durch diese Maßnahme allein zeigte sich auch im unbelichteten

Herzmuskelgewebe ein deutlich besserer Krafterhalt des Muskelgewebes über den Verlauf der Kultur (Abbildung 24). Der Verminderung von oxidativem Stress durch die Substanz β -Mercaptoethanol scheint bei der Verbesserung des Funktionserhalts der Gewebepräparate demnach eine große Bedeutung zuzukommen.

Die Expression des Gens SLC2A1 in allen während der Kultivierung gekippten Präparaten war im Vergleich zu den gekreisten Schnitten signifikant geringer (vgl. Abbildung 28). SLC2A1 kodiert für den Glucosetransporter Glut-1, welcher durch den O₂-Sensor HIF-1 α induziert wird (Dayan et al., 2006) und stellt somit einen Hypoxiemarker dar. Der Befund spricht für die Verbesserung der Sauerstoffversorgung sowohl im unstimulierten als auch im stimulierten Muskelgewebe durch diese Maßnahme.

Die Erhöhung des Sauerstoffgehalts führte in den stimulierten Schnitten zu einem signifikanten Anstieg der Kontraktionsamplitude über den Ausgangswert hinaus. Auch die Ausbildung der tonischen Kontraktur konnte in den stimulierten Gewebeschnitten durch die Maßnahme der besseren Sauerstoffversorgung signifikant vermindert werden (vgl. Abbildung 25). Es wird deutlich, dass der Sauerstoffgehalt des Gewebes tatsächlich einen limitierenden Faktor bei der Stimulierung der Herzmuskelschnitte darstellt.

Insgesamt wurde jedoch auch klar, dass die kontinuierliche optogenetische Stimulation keinen zusätzlichen Vorteil beim Funktionserhalt des Gewebes mit sich brachte (vgl. Abbildung 26). Ebenso zeigte die Höhe der Expression der kardiomyozytären Gene MLC-2v, GJA1, N2A und N2B sowie das Verhältnis der Expression von N2A zu N2B in den stimulierten Gewebeschnitten keine Veränderung zum unstimulierten Gewebe (vgl. Abbildung 28), wodurch darauf geschlossen werden kann, dass die strukturelle Veränderung der Herzmuskelzellen während der Kultur durch die optogenetische Stimulation nicht vermindert werden konnte.

10.2.4 Veränderung der Reizweiterleitung während der Kultur

Herzmuskelzellen sind über Glanzstreifen zu einem funktionellen Synzytium verbunden. Kommunikationskontakte (engl. Gap junctions) bilden hierbei das strukturelle Gerüst für die funktionelle Kopplung der Zellen (Schinner et al., 2017) und ermöglichen dadurch die koordinierte Kontraktion des Herzmuskels (Hatanaka et al., 2004). In den Kardiomyozyten bestehen die Gap Junctions vorwiegend aus dem Protein Connexin-43 (Michela et al., 2015). Eine verminderte Expression des dafür codierenden Gens GJA1 oder eine veränderte Verteilung des Proteins entlang der Glanzstreifen können zu Störungen der Impulsausbreitung im Gewebe führen, die zum Funktionsverlust des Herzmuskels beitragen können (Peters et al.,

1993). So könnte die Abnahme der Expression von GJA1 in den kultivierten Gewebeschnitten (vgl. Abbildung 28) mit dem Anstieg der Reizschwelle des Gewebes im Verlauf der Kultur (vgl. Abbildung 20), zusammenhängen. Eine Umverteilung von Connexin-43 an den Glanzstreifen der Kardiomyozyten konnte in der immunhistologischen Färbung nach der Kultur jedoch nicht festgestellt werden (vgl. Abbildung 23). Wang et al. zeigten 2000, dass die zyklische Anwendung von mechanischer Belastung auf Herzmuskelzellen von Ratten zur vermehrten Expression von GJA1 und somit zum Anstieg des Proteins Connexin-43 in den Zellen führte (Wang et al., 2000). In den murinen Herzmuskelschnitten führte die kontinuierliche optogenetische Stimulation mit konsekutiver zyklischer Kraftentwicklung im Gewebe jedoch nicht zum Anstieg der Expression von GJA1 und auch der Anstieg der Reizschwelle konnte dadurch nicht verhindert werden (vgl. Abbildung 28 und Abbildung 20).

10.3 Simulation eines pathophysiologischen Zustandes

Die Kultivierung der Schnittpräparate ermöglicht es, Langzeitwirkungen von Substanzen auf das Herzmuskelgewebe zu untersuchen. Demnach wäre es denkbar, komplexe pathophysiologische Zustände wie Hypertrophie, Ischämie oder Entzündung im Gewebe durch das Einwirken bestimmter Substanzen nachstellen zu können.

Es gibt viele Faktoren, welche an der Pathophysiologie der Herzmuskelhypertrophie beteiligt sind. Eine große Rolle spielt hierbei die chronische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, insbesondere eine vermehrte Bildung von Angiotensin II mit multiplen Auswirkungen auf das Zellwachstum (Demos-Davies et al., 2014). Es sollte untersucht werden, ob die Zugabe von Angiotensin II zu den Gewebekulturen ebenso zur Hypertrophie der Herzmuskelzellen führt, welche durch einen Anstieg der Kontraktilität der Muskelschnitte und die vermehrte Expression von MLC-2v im Gewebe identifiziert werden kann (Takemoto et al., 2001). Nach der Kultivierungsdauer von 48 Stunden war die Kontraktionsamplitude der Gewebeschnitte, welchen Angiotensin II hinzugegeben würde, nicht verändert im Vergleich zu den Schnitten ohne Einwirkung des Peptidhormons (vgl. Abbildung 27). Ebenso zeigte sich kein Unterschied in der Höhe der Expression von MLC-2v (vgl. Abbildung 28). Demzufolge konnte durch die Zugabe von Angiotensin II kein pathologischer Zustand der Zellen der Herzmuskelpräparate herbeigeführt werden. Es bleibt zu eruieren, ob die Dosis für das Auslösen der Zellhypertrophie zu gering gewählt wurde oder ob das Peptidhormon im Gewebe vermehrt abgebaut wurde. Zudem ist es nicht ausgeschlossen, dass andere ausgewählte

Substanzen pathophysiologische Auswirkungen auf die Herzmuskelzellen der Gewebepräparate zeigen.

10.4 Limitationen

Die Anwendung der verschiedenen Kulturbedingungen auf die Muskelpräparate löst automatisch Reaktionen im Gewebe hervor. Im Falle der Anpassung an die mechanische Belastung war dies gewünscht, um physiologische Gegebenheiten zu simulieren, andere Bedingungen im Gewebe entstanden artifiziell bedingt. Es handelt sich bei den Herzmuskelschnitten um ein isoliertes System, welches keine hormonellen und neuronalen Einflüsse und die damit verbundenen Rückkopplungsschleifen aufweist. Die Einwirkung von Hormonen ist ein wichtiger Faktor bei der Entwicklung von Herzmuskelzellen (Watson et al., 2019) und die Abwesenheit von adrenerger Stimulation stellt einen künstlichen Zustand im Gewebe dar, der zur Dedifferenzierung der Zellen beitragen kann.

Des Weiteren wurde die Stimulationsfrequenz der Schnitte bewusst niedrig gewählt, um den Sauerstoffverbrauch des Gewebes möglichst gering zu halten. Bekannterweise ruft jedoch eine niedrige Stimulationsfrequenz starke Anpassungsreaktionen im Herzmuskelgewebe hervor, was zu Veränderungen der elektrochemischen Signalübertragung führen kann (Phadumdeo und Weinberg, 2018). Zudem ist es fraglich, ob durch die langsame Stimulation der Gewebeschnitte die physiologische mechanische Belastung des Herzens angemessen simuliert werden kann. Auch die Kontraktionsform der stimulierten Schnittpräparate ist in dieser Hinsicht kritisch zu betrachten. Die elastischen Muskelkontraktionen stellen nur Annäherungen an die physiologischen Bedingungen im Herzmuskel dar. Die dynamische Sequenz mechanischer Ereignisse im Herzen, welche sich aus der Systole mit der isovolumentrischen Kontraktion und Ejektion und der Diastole mit der isovolumentrischen Relaxation und Wiederauffüllung zusammensetzt, kann dadurch nicht korrekt abgebildet werden (Fukuta und Little, 2008). Zur adäquaten Simulation der mechanischen Abfolgen des Herzzyklus in den Gewebeschnitten wäre die Entwicklung eines deutlich komplexeren Simulationsmodells notwendig, was jedoch mit einem sehr großen Aufwand verbunden wäre. Hierbei müsste auch die Geometrie der Präparate berücksichtigt werden. Wenn sich die Muskelschnitte zusammenziehen, treten die Spannungs- und Dehnungsvektoren in einer 2D-Ebene parallel zur Faserrichtung auf. Im Gegensatz dazu unterliegt das lebende Herz konstanten dreidimensionalen Druck- und Volumenänderungen. Die Verwendung von geometrischen Modellen, die Spannung und

Dehnung in Druck und Volumen umwandeln, könnte dies in gewissem Maße verbessern (Pitoulis et al., 2019).

Im Falle der organotypischen Gewebeschnitte wurde optogenetisch stimuliert, wodurch es potenziell sowohl zu zytotoxischen als auch zu phototoxischen und exzitotoxischen Reaktionen im Gewebe führen kann (Maimon et al., 2018). Inwiefern dies auf die stimulierten Herzmuskelschnitte zutrifft, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht konkret untersucht, jedoch konnten die Strukturveränderungen und der Anstieg der Reizschwelle während der Kultur durch die Stimulation nicht verhindert werden.

Es ist dennoch positiv zu vermerken, dass auch ohne den Einfluss der optogenetischen Stimulation die Kontraktionskraft der Gewebeschnitte durch die Anpassung an die angewandten Kulturbedingungen erhalten werden konnte.

10.5 Ausblick

Im Vergleich zu anderen Modellsystemen des Herzens bieten die Herzmuskelschnitte den entscheidenden Vorteil der Erhaltung der nativen Zusammensetzung des Myokards (Kang et al., 2016) bei gleichzeitig hoher experimenteller Verfügbarkeit, welche durch die Möglichkeit der Kultivierung sogar noch weiter gesteigert werden kann. Die Kultur der Schnitte ermöglicht nicht nur die Durchführung von physiologischen und sicherheitspharmakologischen Langzeitstudien an gesundem Herzmuskelgewebe. Durch einheitliche Induzierung von pathophysiologischen Zuständen könnten auch Untersuchungen an pathologisch verändertem Gewebe vorgenommen werden. Die Herstellung von Muskelpräparaten aus transgenen Mäusen bietet beispielsweise das enorme Potential der funktionalen Untersuchung von experimentellen Gendelektionen auf multizellulärer Ebene.

Bei der Kultivierung ist es jedoch wichtig, dass die Funktion und die Struktur des Herzmuskelgewebes erhalten bleiben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass der mechanischen Belastung der Schnitte während der Kultivierung hierbei eine große Bedeutung zukommt. Versuche zur Verminderung der Inaktivitätsatrophie des Muskelgewebes können bei der Verwendung von transgenen Mäusen optogenetisch durchgeführt werden. Durch die Anwendung der optogenetischen Stimulation kommt es jedoch zu phototoxischen Reaktionen im Gewebe, welche dafür verantwortlich sein könnten, dass damit kein positiver Effekt auf den Gewebeerhalt erzielt werden konnte. Die Stimulation der Schnittpräparate kann jedoch auch mit elektrischem Strom erfolgen. Ob die Einwirkung von niedrig dosiertem Strom bereits zu Schäden im Gewebe führt oder die strukturellen und funktionellen Veränderungen während der

Kultur dadurch vermindert werden können, gilt es zu untersuchen. Die elektrische Stimulation bringt vor allem den Vorteil mit sich, dass sie leicht an humanem Herzmuskelgewebe anwendbar ist, wohingegen aufwendige molekularbiologische Techniken wie die Transfektion mit viralen Vektoren eine Möglichkeit der Anwendung der optogenetischen Stimulation auf menschliches Myokard darstellen.

Es muss generell bedacht werden, dass es notwendig sein könnte, die Schnitte mit einer Frequenz zu stimulieren, welche der physiologischen Herzfrequenz möglichst nahekommt, um der Inaktivitätsatrophie des Gewebes entgegenzuwirken. Bei Stimulierung mit der physiologischen Frequenz des Mäuseherzens von etwa 13,3 Hz ist jedoch der Sauerstoffverbrauch im Gewebe so hoch, dass neue Möglichkeiten der Verbesserung der Sauerstoffversorgung in den Schnitten gefunden werden müssen. Da das menschliche Herz eine niedrigere physiologische Frequenz im Vergleich zu Nagetieren aufweist, muss bei der Verwendung von humanem Myokard die Sauerstoffversorgung individuell an die dort etablierten Bedingungen angepasst werden. Es ist außerdem denkbar, dass sich die Auswirkungen der biomimetischen Stimulation auf den Gewebeerhalt erst nach einem längeren Zeitraum der Regeneration in Kultur zeigen, was sich in längeren Perioden der Kultivierung zeigen würde. Alle weiteren erprobten Kulturbedingungen könnten problemlos auf Schnittpräparate aus explantierten humanen Herzen übertragen werden.

Humane Gewebeschnitte, bei deren Interpretation keine Speziesunterschiede beachtet werden müssen, stellen eine gute Ergänzung zu den bestehenden tierischen Modellsystemen dar. Zudem ermöglicht die Verwendung von explantierten Herzen zur Herstellung der Präparate die gezielte Untersuchung von insuffizientem Myokard. Es sind noch weitere Einsatzbereiche von humanen Herzmuskelschnitten denkbar. Die Möglichkeit der Kultivierung eröffnet die Perspektive, das Einwachsen von verschiedenen Stammzelltypen in humanes Myokard funktional zu untersuchen, was neue Ansätze für die Stammzelltherapie der Herzinsuffizienz liefern könnte. Die Co-Kultivierung der Herzschnitte mit anderen Zelltypen könnte zur Entwicklung von noch komplexeren Modellsystemen führen. So könnte beispielsweise der Einfluss von Entzündungszellen bei der Fibrosierung oder der Integration der Stammzellen untersucht werden (Brandenburger et al., 2012).

In Zukunft wird sich zeigen, für welche der vielfältigen Anwendungen sowohl murine als auch humane Herzmuskelschnitte Verwendung finden werden.

11 Literaturverzeichnis

- ARRENERG, A. B., STAINIER, D. Y., BAIER, H. & HUISKEN, J. 2010. Optogenetic control of cardiac function. *Science*, 330, 971.
- BARCLAY, C. J. 2005. Modelling diffusive O₂ supply to isolated preparations of mammalian skeletal and cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil*, 26, 225.
- BELL, R. M., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2011. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 50, 940.
- BERGER, H. J., PRASAD, S. K., DAVIDOFF, A. J., PIMENTAL, D., ELLINGSEN, O., MARSH, J. D., SMITH, T. W. & KELLY, R. A. 1994. Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture. *Am J Physiol*, 266, H341.
- BOENGLER, K. & SCHULZ, R. 2017. Connexin 43 and Mitochondria in Cardiovascular Health and Disease. *Adv Exp Med Biol*, 982, 227.
- BRANDENBURGER, M. 2011. Etablierung und Charakterisierung von Langzeitkulturen humaner Herzschnitte. *Dissertation, Medizinische Universität zu Lübeck*.
- BRANDENBURGER, M., WENZEL, J., BOGDAN, R., RICHARDT, D., NGUEMO, F., REPEL, M., HESCHELER, J., TERLAU, H. & DENDORFER, A. 2012. Organotypic slice culture from human adult ventricular myocardium. *Cardiovasc Res*, 93, 50.
- BRUEGMANN, T., BOYLE, P. M., VOGT, C. C., KARATHANOS, T. V., AREVALO, H. J., FLEISCHMANN, B. K., TRAYANOVA, N. A. & SASSE, P. 2016. Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *J Clin Invest*, 126, 3894.
- BRUEGMANN, T., MALAN, D., HESSE, M., BEIERT, T., FUEGEMANN, C. J., FLEISCHMANN, B. K. & SASSE, P. 2010. Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nat Methods*, 7, 897.
- BURNASHEV, N. A., EDWARDS, F. A. & VERKHRATSKY, A. N. 1990. Patch-clamp recordings on rat cardiac muscle slices. *Pflugers Arch*, 417, 123.
- BURSAC, N., PAPADAKI, M., WHITE, J. A., EISENBERG, S. R., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. & FREED, L. E. 2003. Cultivation in rotating bioreactors promotes maintenance of cardiac myocyte electrophysiology and molecular properties. *Tissue Eng*, 9, 1243.
- BUSSEK, A., WETTWER, E., CHRIST, T., LOHMANN, H., CAMELLITI, P. & RAVENS, U. 2009. Tissue slices from adult mammalian hearts as a model for pharmacological drug testing. *Cell Physiol Biochem*, 24, 527.
- CAMELLITI, P., AL-SAUD, S. A., SMOLENSKI, R. T., AL-AYOUBI, S., BUSSEK, A., WETTWER, E., BANNER, N. R., BOWLES, C. T., YACOUB, M. H. & TERRACCIANO, C. M. 2011. Adult human heart slices are a multicellular system suitable for electrophysiological and pharmacological studies. *J Mol Cell Cardiol*, 51, 390.

- CAMELLITI, P., GALLAGHER, J. O., KOHL, P. & MCCULLOCH, A. D. 2006. Micropatterned cell cultures on elastic membranes as an in vitro model of myocardium. *Nat Protoc*, 1, 1379.
- CAMELLITI, P., MCCULLOCH, A. D. & KOHL, P. 2005. Microstructured cocultures of cardiac myocytes and fibroblasts: a two-dimensional in vitro model of cardiac tissue. *Microsc Microanal*, 11, 249.
- CASHA, A. R., CAMILLERI, L., MANCHE, A., GATT, R., GAUCI, M., CAMILLERI-PODESTA, M. T., GRIMA, J. N., SCARCI, M. & CHETCUTI, S. 2017. Physiological rules for the heart, lungs and other pressure-based organs. *J Thorac Dis*, 9, 3793.
- CAZORLA, O., FREIBURG, A., HELMES, M., CENTNER, T., MCNABB, M., WU, Y., TROMBITAS, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 86, 59.
- CLAYCOMB, W. C. 1976. Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation. Possible control of deoxyribonucleic acid synthesis and cell differentiation by adrenergic innervation and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *J Biol Chem*, 251, 6082.
- DAYAN, F., ROUX, D., BRAHIMI-HORN, M. C., POUYSSEGUR, J. & MAZURE, N. M. 2006. The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Cancer Res*, 66, 3688.
- DE BOER, T. P., CAMELLITI, P., RAVENS, U. & KOHL, P. 2009. Myocardial tissue slices: organotypic pseudo-2D models for cardiac research & development. *Future Cardiol*, 5, 425.
- DEMOS-DAVIES, K. M., FERGUSON, B. S., CAVASIN, M. A., MAHAFFEY, J. H., WILLIAMS, S. M., SPILTOIR, J. I., SCHUETZE, K. B., HORN, T. R., CHEN, B., FERRARA, C., SCELLINI, B., PIRODDI, N., TESI, C., POGGESI, C., JEONG, M. Y. & MCKINSEY, T. A. 2014. HDAC6 contributes to pathological responses of heart and skeletal muscle to chronic angiotensin-II signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307, H252.
- DEMPSTER, J. *Strathclyde Electrophysiology Software* [Online]. Available: http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/software_ses.htm [Accessed 13.09.2022].
- ENDO, M. 2004. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol*, 500, 73.
- FUKUTA, H. & LITTLE, W. C. 2008. The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. *Heart Fail Clin*, 4, 1.
- GLUKHOV, A. V., FEDOROV, V. V., LOU, Q., RAVIKUMAR, V. K., KALISH, P. W., SCHUESSLER, R. B., MOAZAMI, N. & EFIMOV, I. R. 2010. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res*, 106, 981.
- GOPALAN, S. M., FLAIM, C., BHATIA, S. N., HOSHIJIMA, M., KNOELL, R., CHIEN, K. R., OMENS, J. H. & MCCULLOCH, A. D. 2003. Anisotropic stretch-induced hypertrophy in neonatal ventricular myocytes micropatterned on deformable elastomers. *Biotechnol Bioeng*, 81, 578.

- GOVORUNOVA, E. G., SINESHCHEKOV, O. A., JANZ, R., LIU, X. & SPUDICH, J. L. 2015. NEUROSCIENCE. Natural light-gated anion channels: A family of microbial rhodopsins for advanced optogenetics. *Science*, 349, 647.
- HARDING, S. E., ALI, N. N., BRITO-MARTINS, M. & GORELIK, J. 2007. The human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte as a pharmacological model. *Pharmacol Ther*, 113, 341.
- HATANAKA, K., KAWATA, H., TOYOFUKU, T. & YOSHIDA, K. 2004. Down-regulation of connexin43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts in vivo. *Jpn Heart J*, 45, 1007.
- HEARSE, D. J., GARLICK, P. B. & HUMPHREY, S. M. 1977. Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention. *Am J Cardiol*, 39, 986.
- HEROLD, V. 2010. *In vivo MR-Mikroskopie am kardiovaskulären System der Maus*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- JANSSEN, P. M., LEHNART, S. E., PRESTLE, J. & HASENFUSS, G. 1999. Preservation of contractile characteristics of human myocardium in multi-day cell culture. *J Mol Cell Cardiol*, 31, 1419.
- JOST, N., VIRAG, L., BITAY, M., TAKACS, J., LENGYEL, C., BILICZKI, P., NAGY, Z., BOGATS, G., LATHROP, D. A., PAPP, J. G. & VARRO, A. 2005. Restricting excessive cardiac action potential and QT prolongation: a vital role for IKs in human ventricular muscle. *Circulation*, 112, 1392.
- KANG, C., QIAO, Y., LI, G., BAECHLE, K., CAMELLITI, P., RENTSCHLER, S. & EFIMOV, I. R. 2016. Human Organotypic Cultured Cardiac Slices: New Platform For High Throughput Preclinical Human Trials. *Sci Rep*, 6, 28798.
- KATANO, Y., AKERA, T., TEMMA, K. & KENNEDY, R. H. 1984. Enhanced ouabain sensitivity of the heart and myocardial sodium pump in aged rats. *Eur J Pharmacol*, 105, 95.
- KUMAR RAJENDRAN, N., GEORGE, B. P., CHANDRAN, R., TYNGA, I. M., HOURELD, N. & ABRAHAMSE, H. 2019. The Influence of Light on Reactive Oxygen Species and NF-small ka, CyrillicB in Disease Progression. *Antioxidants (Basel)*, 8.
- LEE, H. J., KIM, Y. M., ONO, T. & HAN, J. Y. 2017. Genome Modification Technologies and Their Applications in Avian Species. *Int J Mol Sci*, 18.
- MAIMON, B. E., DIAZ, M., REVOL, E. C. M., SCHNEIDER, A. M., LEAKER, B., VARELA, C. E., SRINIVASAN, S., WEBER, M. B. & HERR, H. M. 2018. Optogenetic Peripheral Nerve Immunogenicity. *Sci Rep*, 8, 14076.
- MARIN, R. M. & FRANCHINI, K. G. 2005. Reduced oxygen supply explains the negative force-frequency relation and the positive inotropic effect of adenosine in buffer-perfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H131.

- MATHIEU, S., EL KHOURY, N., RIVARD, K., PARADIS, P., NEMER, M. & FISET, C. 2018. Angiotensin II Overstimulation Leads to an Increased Susceptibility to Dilated Cardiomyopathy and Higher Mortality in Female Mice. *Sci Rep*, 8, 952.
- MEYER, T., STUERZ, K., GUENTHER, E., EDAMURA, M. & KRAUSHAAR, U. 2010. Cardiac slices as a predictive tool for arrhythmogenic potential of drugs and chemicals. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 6, 1461.
- MICHELA, P., VELIA, V., ALDO, P. & ADA, P. 2015. Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol*, 768, 71.
- MONROE, R. G. 1964. Myocardial Oxygen Consumption during Ventricular Contraction and Relaxation. *Circ Res*, 14, 294.
- NAGUEH, S. F., SHAH, G., WU, Y., TORRE-AMIONE, G., KING, N. M., LAHMERS, S., WITT, C. C., BECKER, K., LABEIT, S. & GRANZIER, H. L. 2004. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 110, 155.
- NERI, B., CINI-NERI, G. & D'ALTERIO, M. 1984. Effect of anthracyclines and mitoxantrone on oxygen uptake and ATP intracellular concentration in rat heart slices. *Biochem Biophys Res Commun*, 125, 954.
- OFFERHAUS, J. A., SNELDERWAARD, P. C., ALGUL, S., FABER, J. W., RIEBEL, K., JENSEN, B. & BOUKENS, B. J. 2021. High heart rate associated early repolarization causes J-waves in both zebra finch and mouse. *Physiol Rep*, 9, e14775.
- OHLER, A. & RAVENS, U. 1994. Effects of E-4031, almokalant and tedisamil on postrest action potential duration of human papillary muscles. *J Pharmacol Exp Ther*, 270, 460.
- OLINGA, P., GROEN, K., HOF, I. H., DE KANTER, R., KOSTER, H. J., LEEMAN, W. R., RUTTEN, A. A., VAN TWILLERT, K. & GROOTHUIS, G. M. 1997. Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 38, 59.
- OU, Q., JACOBSON, Z., ABOULEISA, R. R. E., TANG, X. L., HINDI, S. M., KUMAR, A., IVEY, K. N., GIRIDHARAN, G., EL-BAZ, A., BRITTIAN, K., ROOD, B., LIN, Y. H., WATSON, S. A., PERBELLINI, F., MCKINSEY, T. A., HILL, B. G., JONES, S. P., TERRACCIANO, C. M., BOLLI, R. & MOHAMED, T. M. A. 2019. Physiological Biomimetic Culture System for Pig and Human Heart Slices. *Circ Res*, 125, 628.
- PACHER, P., NAGAYAMA, T., MUKHOPADHYAY, P., BATKAI, S. & KASS, D. A. 2008. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc*, 3, 1422.
- PARRISH, A. R., GANDOLFI, A. J. & BRENDEL, K. 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sci*, 57, 1887.

- PETERS, N. S., GREEN, C. R., POOLE-WILSON, P. A. & SEVERS, N. J. 1993. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation*, 88, 864.
- PHADUMDEO, V. M. & WEINBERG, S. H. 2018. Heart rate variability alters cardiac repolarization and electromechanical dynamics. *J Theor Biol*, 442, 31.
- PILLEKAMP, F., REPPPEL, M., DINKELACKER, V., DUAN, Y., JAZMATI, N., BLOCH, W., BROCKMEIER, K., HESCHELER, J., FLEISCHMANN, B. K. & KOEHLING, R. 2005. Establishment and characterization of a mouse embryonic heart slice preparation. *Cell Physiol Biochem*, 16, 127.
- PILLEKAMP, F., REPPPEL, M., RUBENCHYK, O., PFANNKUCHE, K., MATZKIES, M., BLOCH, W., SREERAM, N., BROCKMEIER, K. & HESCHELER, J. 2007. Force measurements of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in an in vitro transplantation model. *Stem Cells*, 25, 174.
- PITOULIS, F. G., WATSON, S. A., PERBELLINI, F. & TERRACCIANO, C. M. 2019. Myocardial slices come to age: An intermediate complexity in vitro cardiac model for translational research. *Cardiovasc Res*.
- POETSCH, A. R. 2020. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comput Struct Biotechnol J*, 18, 207.
- RUSSELL, B., CURTIS, M. W., KOSHMAN, Y. E. & SAMAREL, A. M. 2010. Mechanical stress-induced sarcomere assembly for cardiac muscle growth in length and width. *J Mol Cell Cardiol*, 48, 817.
- SAFFITZ, J. E., HAMES, K. Y. & KANNO, S. 2007. Remodeling of gap junctions in ischemic and nonischemic forms of heart disease. *J Membr Biol*, 218, 65.
- SAITO, S., MASUDA, K., MORI, Y., NAKATANI, S., YOSHIOKA, Y. & MURASE, K. 2017. Mapping of left ventricle wall thickness in mice using 11.7-T magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*, 36, 128.
- SAMAREL, A. M. 2005. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289, H2291.
- SCHINNER, C., VIELMUTH, F., ROTZER, V., HIERMAIER, M., RADEVA, M. Y., CO, T. K., HARTLIEB, E., SCHMIDT, A., IMHOF, A., MESSOUDI, A., HORN, A., SCHLIPP, A., SPINDLER, V. & WASCHKE, J. 2017. Adrenergic Signaling Strengthens Cardiac Myocyte Cohesion. *Circ Res*, 120, 1305.
- SHADEL, G. S. & HORVATH, T. L. 2015. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*, 163, 560.
- SHEIKH, F., LYON, R. C. & CHEN, J. 2015. Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease. *Gene*, 569, 14.

- TAKEMOTO, M., NODE, K., NAKAGAMI, H., LIAO, Y., GRIMM, M., TAKEMOTO, Y., KITAKAZE, M. & LIAO, J. K. 2001. Statins as antioxidant therapy for preventing cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*, 108, 1429.
- WANG, T. L., TSENG, Y. Z. & CHANG, H. 2000. Regulation of connexin 43 gene expression by cyclical mechanical stretch in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 267, 551.
- WATSON, S. A., DUFF, J., BARDI, I., ZABIELSKA, M., ATANUR, S. S., JABBOUR, R. J., SIMON, A., TOMAS, A., SMOLENSKI, R. T., HARDING, S. E., PERBELLINI, F. & TERRACCIANO, C. M. 2019. Biomimetic electromechanical stimulation to maintain adult myocardial slices in vitro. *Nat Commun*, 10, 2168.
- WHO. 2015. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> [Accessed 07.04.2016].
- WHO. 2020. Available: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates> [Accessed 13.09.2022].
- YUSUF, S., THEODOROPOULOS, S., MATHIAS, C. J., DHALLA, N., WITTES, J., MITCHELL, A. & YACOUB, M. 1987. Increased sensitivity of the denervated transplanted human heart to isoprenaline both before and after beta-adrenergic blockade. *Circulation*, 75, 696.
- ZHANG, J. Z., BEHROOZ, A. & ISMAIL-BEIGI, F. 1999. Regulation of glucose transport by hypoxia. *Am J Kidney Dis*, 34, 189.

12 Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Dendorfer für die großartige Zusammenarbeit, welche nicht motivierender und inspirierender sein hätte können.

Evelyn Fein danke ich für die gute Einarbeitung und das Heranführen an das Präparieren der Herzmuskelschnitte.

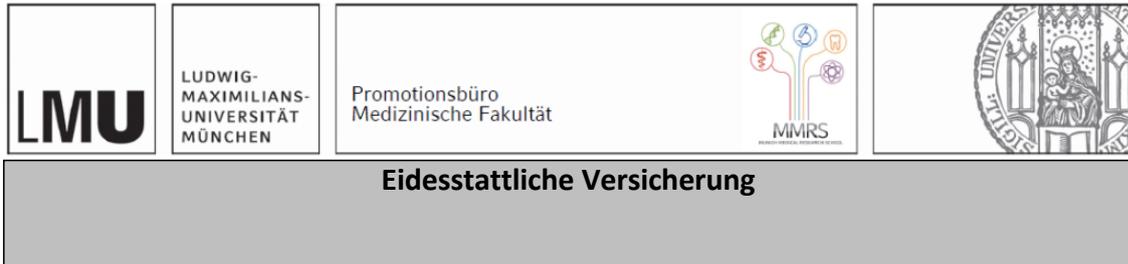
Ein großer Dank geht auch an Prof. P. Sasse und Prof. T. Brüggemann aus dem Institut für Physiologie I der Universität Bonn, welche uns die genetisch veränderten Mäuse zur Verfügung gestellt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich Dr. Mei Ping Wu, Dr. Xiaochun Cao-Ehlker und Dr. Karolina Plöbl für jede Hilfestellung und gemeinsame Problemlösung.

Meinen Eltern und meiner Schwester Daniela danke ich für die unermüdliche Unterstützung und Hilfe und das Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten.

Ich bin ebenso dankbar für alle meine Freunde, die mir immer wieder zeigen, dass sie an mich glauben und immer ein offenes Ohr für mich haben.

13 Affidavit



Fischer, Carola Hildegard

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Ein optogenetischer Ansatz zur funktionserhaltenden Langzeitkultur von organotypischen Schnittpräparaten des Myokards

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Regensburg, 15.05.2023
Ort, Datum

Carola Fischer
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

14 Publikationsliste

FISCHER, C., MILTING, H., FEIN, E., REISER, E., LU, K., SEIDEL, T., SCHINNER, C., SCHWARZMAYR, T., SCHRAMM, R., TOMASI, R., HUSSE, B., CAO-EHLKER, X., POHL, U. & DENDORFER, A. 2019. Long-term functional and structural preservation of precision-cut human myocardium under continuous electromechanical stimulation in vitro. *Nat Commun*, 10, 117.

CAO-EHLKER, X., FISCHER, C., LU, K., BRUEGMANN, T., SASSE, P., DENDORFER, A. & TOMASI, R. 2023. Optimized Conditions for the Long-Term Maintenance of Precision-Cut Murine Myocardium in Biomimetic Tissue Culture. *Bioengineering (Basel)*, 10.