

Zell-biomechanische Untersuchungen von Modellen des Herzmuskelgewebes

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Benjamin Wolters

aus
Jülich

Bonn, 2015

Anfertigung mit Genehmigung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Fürst
2. Gutachter: PD Dr. Bernd Hoffmann

Tag der Promotion: 29.03.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Für meine Eltern
- in Erinnerung an meinen Vater -

So guard your heart, with diligence, life's well-spring from it flows.
And give your heart to truth alone, there shall your soul repose.

-Unbekannt

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Herzmuskelzellen verschiedenen Ursprungs hinsichtlich ihres Calciumsignalverhaltens und der damit einhergehenden Zellkontraktion während der Erregungs-Kontraktionskopplung detailliert charakterisiert. Als Maß dazu diente der zeitliche Versatz zwischen dem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und der durch die Zelle ausgeübten Deformation elastischer Silikonkautschuksubstrate. Letztere wurden der physiologischen Gewebesteifigkeit des gesunden Herzmuskels nachempfunden und ermöglichten dadurch die Analyse der Zellen unter naturnahen Bedingungen. Für pränatale Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass die Kontraktionsfrequenz und der zeitliche Versatz untrennbar miteinander verbunden sind. Zellen mit hoher Kontraktionsfrequenz wiesen stets einen niedrigen Versatz auf, während Zellen mit niedriger Kontraktionsfrequenz länger für die Umsetzung des chemischen Signals in eine mechanische Zellantwort benötigten. Durch die hier entwickelte Software-gestützte Strukturanalyse zytoskelettaler Komponenten konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Zellform und der Ordnung und Orientierung ihrer Myofibrillen stark unterschieden. Schnell kontrahierende Zellen mit niedrigem Versatz waren länglich ausgerichtet und besaßen eine hohe innere Ordnung mit parallel zueinander orientierten Myofibrillen, während langsam schlagende Zellen mit hohem Versatz keine Vorzugsrichtung des Zellkörpers und der Myofibrillen aufwiesen. Eine direkte Abhängigkeit des Signalverhaltens von der Morphologie und der damit eingehenden inneren Ordnung konnte jedoch durch die kontrollierte und reproduzierbare Beeinflussung der Zellgeometrie widerlegt werden. Durch gezielte Separation des embryonalen Herzgewebes konnte vielmehr eine Abhängigkeit zwischen dem Zellursprung und dem Signalverhalten aufgezeigt werden. Dabei erwiesen sich Vorhofzellen als die schnell kontrahierende Zellpopulation mit niedrigem zeitlichen Versatz und Zellen ventrikulären Ursprungs als solche mit niedriger Frequenz und hohem zeitlichen Versatz. Darüber hinaus konnte das Signalverhalten durch Behandlung der beiden Zellpopulationen mit zwei unterschiedlichen Neurotransmittern zum Teil aktiv moduliert werden und gab somit Aufschluss über den zugrundeliegenden cAMP-abhängigen Regulationsmechanismus.

Zusätzlich wurde das Kopplungsverhalten pränataler, kardialer Myozyten in definierten multizellulären Systemen untersucht. Dazu musste zunächst eine Technik zur Anreicherung der Herzmuskelzellen aus einer primären Mischkultur mittels neuartiger Fusionsliposomen etabliert und auf ihre Effizienz hin untersucht werden. Als Alternative zu durchflusszytometrischen Analysen wurde ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren zur automatisierten Bildgebung entwickelt. Zur Auswertung der so erfassten Daten wurde eine

makrobasierte Zählroutine programmiert mit der sich die erfolgreiche Anreicherung kardialer Myozyten aus einer Mischkultur nach erfolgter Zelltrennung über eine Trennsäule nachweisen ließ.

Mit den so erhaltenen hochreinen Kardiomyozyten wurden Mikrogewebe unterschiedlicher Größe aufgebaut, die sich zusätzlich in ihrer Zusammensetzung aus atrialen und ventrikulären Zellen unterschieden. Die zuvor vereinzelt Zellen wurden mittels definierter Substratkonditionierung zur kontrollierten Adhäsion gebracht und bildeten nach Ausfüllen der begrenzten Adhäsionsflächen und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten funktionelle Synzytien, in denen die einzelnen Zellen sowohl elektro-chemisch als auch mechanisch miteinander koppelten. Unabhängig von der Mikrogewebe-Geometrie konnte gezeigt werden, dass sich das Signalverhalten atrialer Zellen zum Teil in den mehrzelligen Verbänden manifestierte, dieses aber nicht vollständig dominierte. Des Weiteren ließ sich für Verbände ventrikulären Zellursprungs eine höhere Kontraktionskraft nachweisen, als für solche gemischter Kardiomyozytenpopulationen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die bis hierher entwickelten Methoden eingesetzt, um das Kontraktionsverhalten humaner induziert-pluripotenter Stammzellen-abgeleiteter Kardiomyozyten näher zu untersuchen. Für diese Zellen konnte ebenfalls die charakteristische Korrelation der Kontraktionsfrequenz und des zeitlichen Versatzen nachgewiesen werden. Dies gab Rückschlüsse über die Zusammensetzung der künstlich generierten Herzmuskelzellen und erlaubte die Klassifizierung in Vorhof-artige und Ventrikel-artige Zellen. Auf Basis dieser Vorversuche konnte für die abgeleiteten Zellen eine niedrigere Kontraktionskraft als für Einzelzellen murinen Ursprungs ermittelt werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Herz	2
1.1.1. Erregungsleitung	3
1.1.2. Herzzyklus.....	4
1.1.3. Histologie des Herzmuskelgewebes.....	6
1.1.4. Kardiomyozyten	7
1.1.5. Membranpotenzial.....	20
1.1.6. Erregungs-Kontraktions-Kopplung.....	26
1.1.7. Calciumhomöostase.....	27
1.2. Myokardinfarkt und Herzversagen	29
1.2.1. Regeneration des Herzens	29
1.2.2. Kardiales Tissue Engineering.....	30
1.3. Ziele dieser Arbeit	33
2. Material und Methoden	35
2.1. Zellkultur	35
2.1.1. Zellisolation primärer kardialer Myozyten aus der Ratte.....	35
2.1.2. Gewebespezifische Trennung.....	36
2.1.3. Zellspezifische Trennung	36
2.1.4. Herstellung fusogener Liposomen.....	38
2.1.5. Aufreinigung kardialer Myozyten mittels fusogener Liposomen	38
2.1.6. Wachstumsbedingungen.....	39
2.2. Herstellung der Analysesubstrate	40
2.2.1. Herstellung von Glassubstraten.....	41
2.2.2. Herstellung elastischer Substrate ohne Mikrostruktur	41
2.2.3. Herstellung elastischer Substrate mit geordneter Mikrostruktur und fluoreszierenden Mikrokugeln	42
2.3. Substratconditionierung	44
2.3.1. Herstellung von Stempeln und Lochfolien.....	44
2.3.2. Fibronectinbeschichtung von Elastomersubstraten.....	45
2.4. Immunhistochemische Färbungen	47
2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz.....	47
2.5. Mikroskopie	48
2.5.1. Automatisierte Epifluoreszenzmikroskopie	48
2.5.2. Epifluoreszenzmikroskopie für simultane Zweikanalmessungen	50
2.5.3. Fluoreszenzmikroskopische Korrelationsanalyse	54
2.6. Digitale Bildverarbeitung	55
2.6.1. Quantifizierung der Aufreinigungseffizienz kardialer Myozyten	55

Inhaltsverzeichnis

2.6.2.	Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion ...	60
2.6.3.	Abschätzung der Kontraktionskräfte kardialer Myozyten	63
2.6.4.	Quantitative Analyse zytoskelettaler Strukturen	67
3.	Ergebnisse	72
3.1.	Zellspezifische Trennung mittels fusogener Liposomen	72
3.2.	Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten.....	75
3.2.1.	Zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion auf Einzelzellebene	75
3.2.2.	Zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion in Abhängigkeit der Zellarchitektur.....	77
3.2.3.	Zusammenhang zwischen Kontraktionsfrequenz und Calciumsignaldauer.....	81
3.3.	Generierung definierter und geordneter, funktioneller Zellformen.....	82
3.3.1.	Kontrollierbare und reproduzierbare Zellausrichtung.....	82
3.3.2.	Funktionalität definierter und geordneter Zellformen.....	85
3.4.	Quantitative Analyse des Signal- und Kontraktionsverhaltens kardialer Myozyten in Abhängigkeit der Zellform.....	88
3.4.1.	Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in definiert adhärenzten Kardiomyozyten.....	88
3.4.2.	Abschätzung der kontraktiven Kräfte kardialer Myozyten mit definierter Zellform.....	90
3.5.	Quantitative Analyse des Signal- und Kontraktionsverhaltens kardialer Myozyten in Abhängigkeit des Zellursprungs.....	93
3.5.1.	Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten	93
3.5.2.	Zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion in Abhängigkeit von Zellursprung und Zellarchitektur	94
3.5.3.	Beeinflussung des zeitlichen Versatzes in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten durch Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren	97
3.5.4.	Abschätzung der kontraktiven Kräfte atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten nach Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren	100
3.6.	Generierung definierter und funktionaler Herzmuskel-Mikrogewebe.....	102
3.6.1.	Kontrollierbare und reproduzierbare Gewebsstrukturen.....	102
3.6.2.	Elektro-chemische Kopplung in Herzmuskel-Mikrogewebe	107
3.6.3.	Erregungs-Kontraktionskopplung in definierten Herzmuskel-Mikrogewebe	109
3.6.4.	Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in definierten Herzmuskel-Mikrogewebe	113
3.6.5.	Abschätzung der kontraktiven Kräfte kardialer Myozyten in definierten Herzmuskel-Mikrogewebe	116

Inhaltsverzeichnis

3.7. Charakterisierung humaner, aus induziert pluripotenten Stammzellen-abgeleiteter Kardiomyozyten	118
3.7.1. Zellmorphologie iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten	118
3.7.2. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten.....	120
3.7.3. Abschätzung der kontraktile Kräfte iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten	122
4. Diskussion	124
4.1. Niedrige Fusogenität kardialer Myozyten ermöglicht zellspezifische Anreicherung....	124
4.2. Zellausrichtung und Sarkomeranordnung in definierten Geometrien bestimmen Muster der Substratdeformation.....	128
4.3. Der Zellursprung bestimmt den zeitlichen Versatz und die Zellform.....	132
4.4. cAMP-Signalweg als möglicher Regulationsmechanismus für Δt	138
4.5. Synchronisation mehrzelliger Systeme führt zu höheren Kontraktionskräften.....	141
4.6. Identifikation atrialer und ventrikulärer Zellen auf Basis des Δt	145
5. Ausblick.....	146
Anhang	148
Literaturverzeichnis.....	152
Danksagung.....	170

1. Einleitung

Das Kreislaufsystem durchzieht den Körper als Ferntransportsystem und ermöglicht den Zellen unterschiedlicher Gewebe den Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. Das zentrale Organ des Kreislaufsystems – das Herz – befördert bis zu 5 Liter Blut pro Minute durch die Blutgefäße des Körpers. Dazu schlägt es bis zu 100.000 Mal am Tag. Seine einzigartige Struktur ermöglicht den kontinuierlichen Blutstrom, sowohl im ruhenden Zustand als auch unter körperlicher Anstrengung. Die Fähigkeit zur koordinierten Kontraktion erhält das Herz durch spezialisierte Muskelzellen innerhalb der Herzwand, den Kardiomyozyten. Sie bilden den Hauptteil der Arbeitsmuskulatur und sind mechanisch und elektro-chemisch miteinander verbunden. Die Interaktion der Herzmuskelzellen untereinander oder mit ihrem umliegenden Bindegewebe wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine vermittelt. Einige sorgen für die Ausbildung spezifischer Zell-Zell-Verbindungen, während andere die erzeugte Kontraktionskraft in das umliegende Bindegewebe einleiten. All dies erlaubt schließlich eine Gesamtkontraktion des Herzens und die simultane Entleerung des Blutes aus den Hauptkammern zu dessen Beförderung durch den Lungen- und Körperkreislauf.

Aufgrund der zentralen Funktion des Herzens für die Aufrechterhaltung eines gesunden Organismus und dessen Fähigkeit zur funktionellen Selbstregulation stellen Erkrankungen des Herzens stets lebensbedrohliche Situationen dar. Die unzureichende Fähigkeit zur Selbsterneuerung nach Schädigung wie durch einen Herzinfarkt führt zur dauerhaften Verschlechterung der Herzfunktion. Mögliche präventive und therapeutische Maßnahmen sind von hoher Bedeutung und besonderem wissenschaftlichen Interesse.

Die Hauptaufgabe der kardialen Gewebezüchtung besteht in der Generierung von funktionellem Herzgewebe, welches als Ersatz für das geschädigte Myokard dienen soll. Die Eigenschaften des künstlichen Materials müssen dabei hohen Anforderungen entsprechen, um eine erfolgreiche Integration, Regeneration und Wiederherstellung der Pumpfunktion innerhalb möglichst kurzer Zeit zu gewährleisten. Hinzu kommt, dass sich derartige Anforderungen je nach Lage im Herzen stark unterscheiden. Ein detailliertes Verständnis von Kardiomyozyten für das gesamte Myokard ist daher eine zwingende Grundvoraussetzung für nachfolgende Therapieansätze für die diese Arbeit einen wichtigen Beitrag leisten soll.

Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über den momentanen Kenntnisstand zur Funktionsweise des Herzens und der Herzmuskelzellen gegeben werden.

1.1. Das Herz

Das Herz befördert Blut durch die Blutgefäße hin zum gesamten Körpergewebe. Basierend auf seiner Funktionsweise kann es als zwei in Reihe geschaltete Pumpen verstanden werden. Die rechte Herzhälfte, bestehend aus rechtem Vorhof und rechtem Ventrikel, pumpt das sauerstoffarme, aus dem Körperkreislauf stammende und durch die systemischen Venen ankommende Blut in den Lungenkreislauf. In der Lunge erfolgt der Gasaustausch des Blutes und es gelangt über die Pulmonalvenen zur linken Herzhälfte. Diese wird gebildet aus dem linken Vorhof und dem linken Ventrikel, die das mit Sauerstoff angereicherte Blut über die Aorta zurück in den systemischen Kreislauf schickt, um dort über immer feinere Arterien die Organe zu versorgen. Innerhalb des Herzens verhindern die Atrioventrikularklappen den Rückstrom von Blut aus den Ventrikeln in die Vorhöfe, in der rechten Hälfte die Trikuspidalklappe, auf der linken Seite die Mitralklappe. Die Trennung der Ventrikel von der jeweiligen großen Arterie erfolgt über die Pulmonalklappe zwischen rechtem Ventrikel und der Pulmonalarterie und die Aortenklappe zwischen linkem Ventrikel und der Aorta (Katz, 2011). Beide werden als Semilunarklappen zusammengefasst. Linker und rechter Ventrikel werden durch das Kammerseptum voneinander getrennt (Abb. 1-1).

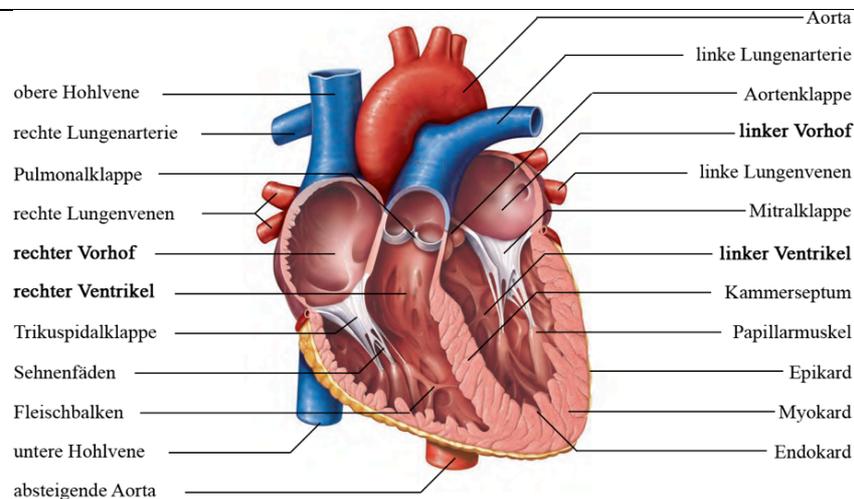


Abb. 1-1: Schematische Abbildung des Herzens (verändert nach Marieb & Hoehn, 2013).

Die Außenwand des Herzens besteht aus drei Schichten: dem Epikard (äußere Schicht), dem Myokard (mittlere Schicht) und dem Endokard (innere Schicht). Diese drei Schichten werden von einer dünnen, schützenden Membran umgeben, dem Perikard. Das Myokard trägt mit 95% den größten Teil des Organs bei und enthält das kontraktile Herzmuskelgewebe, welches für die Pumpleistung des Herzens verantwortlich ist (Tortora & Derrickson, 2009). Die Dicke des Myokards der vier Kammern variiert entsprechend ihrer Funktion und Beanspruchung.

Die Vorhöfe sind relativ dünnwandig, da sie niedrigeren Drücken ausgesetzt sind. Die beiden Hauptkammern müssen hingegen größere Drücke generieren, um das Blut über weitere Strecken zu treiben. Der Strömungswiderstand im Lungenkreislauf beträgt nur einen Bruchteil des totalen peripheren Widerstands des Körperkreislaufs, sodass der rechte Ventrikel mit circa 2 kPa einen wesentlich geringeren Mitteldruck generieren muss, als die linke Kammer mit 13,3 kPa (Silbernagl & Despopoulos, 2012). Das Endokard besteht aus einer dünnen Bindegewebsschicht, die nahtlos in das Endothelgewebe der großen Blutgefäße übergeht, wodurch der Reibungswiderstand des Blutstroms beim Austritt aus den Kammern minimiert wird. Das Bindegewebe kleidet die gesamte Innenfläche des Herzens aus und fungiert so außerdem als Isolator zwischen Vorhöfen und Ventrikeln und verhindert dadurch die unkontrollierte Reizweiterleitung über das Organ.

1.1.1. Erregungsleitung

Das Herz wird, genau wie skelettale Muskeln von Nervenenden innerviert. Diese spielen bei der Impulserzeugung jedoch nur eine regulatorische Rolle. Vielmehr besitzt das Herz, anders als Skelettmuskeln, die Fähigkeit zur eigenständigen und rhythmischen Erregung (Autorhythmie). Getrieben wird der Herzschlag durch elektrische Impulse, die von spezialisierten Herzzellen (Kardiomyozyten, 1.1.4) generiert und in verschiedene Regionen des Herzens weitergeleitet werden. Die initiale Erregung des Herzens erfolgt im Sinusknoten (*Sinoatrial-Knoten*, SA-Knoten). Er ist ein schmales Band am Übergang zwischen oberer Hohlvene in dem rechten Vorhof und besteht aus einer Ansammlung spontan depolarisierender Zellen (Keith & Flack, 1907). Ihre Besonderheit liegt in ihrem instabilen Ruhepotenzial. Übersteigt eine spontane Depolarisation der Zellen einen Schwellwert kommt es zur Ausprägung eines Aktionspotenzials (AP), welches sich über die Vorhöfe ausbreitet und diese zur Kontraktion veranlasst. Die Impulsausbreitung über das Gewebe wird über spezielle Zell-Zell-Kontakte (1.1.4.6) zwischen den einzelnen Herzmuskelzellen ermöglicht. Diese sogenannten Glanzsteifen verbinden Einzelzellen über durchlässige Kanäle (*Gap Junctions*) zu einem funktionellen Synzytium. Durch Weiterleitung des APs entlang der atrialen Muskelfasern, gelangt es im Vorhofseptum zum Atrioventrikular-Knoten (AV-Knoten). Von dort tritt es in die einzige elektrische Schnittstelle zwischen den Vorhöfen und den Ventrikeln ein, die His-Bündel, welche sich in die Tawara-Schenkel verzweigen. Der rechte und linke Ast setzen sich durch das Kammerseptum bis zur Herzspitze fort. Letztendlich wird das AP durch die schnell leitenden Purkinje-Fasern von der Herzspitze

seitlich aufwärts in das ventrikuläre Myokard geleitet und es kommt zur Kontraktion der beiden Hauptkammern (Tortora & Derrickson, 2009). Generell sind drei Bereiche des ausgewachsenen Herzens in der Lage, spontane Impulse zu erzeugen. Der SA-Knoten gilt als primäres Schrittmacherzentrum. Des Weiteren sind der AV-Knoten und die Purkinje-Fasern in der Lage, Schrittmacherpotenziale zu generieren. Im Normalfall ist die intrinsische Impulsfrequenz des SA-Knoten jedoch schneller als die des Erregungsleitungssystems und unterdrückt somit deren Schrittmacherpotenzial (Mangoni & Nargeot, 2008). Die Impulsfrequenzen der drei Regionen unterscheiden sich maßgeblich. Im menschlichen Herzen liegt die Entladungsrate unter normaler Beanspruchung im Sinusknoten bei 60 bis 100 Impulsen in der Minute, während die Rate in den unteren Schrittmachern bei 40 bis 55 im AV-Knoten und im Purkinje-System bei 25 bis 40 Schlägen in der Minute liegt (Katz, 2011). Kommt es zu einer Blockade des SA-Knoten, dominiert der AV-Knoten als Schrittmacherzentrum (James, 2003). Es liegt jedoch nahe, dass dieser einen Ausfall – insbesondere bei erhöhter körperlicher Beanspruchung – nicht auf Dauer kompensieren kann.

1.1.2. Herzzyklus

Die erste Phase im Herzzyklus ist die atriale Depolarisation. Sie ist im Elektrokardiogramm (EKG) als P-Welle sichtbar (Abb. 1-2, Phase 1) und bedingt nach kurzer Verzögerung im AV-Knoten (Phase 2) die atriale Systole. Durch die Kontraktion der Vorhofmuskulatur steigt der Druck in den Vorhöfen, welcher den Einstrom von Blut durch die geöffneten Segelklappen (rechts: Trikuspidalklappe, links: Mitralklappe) in die Ventrikel ermöglicht. Die dritte Phase lässt sich im EKG anhand des QRS-Komplexes erkennen. Er steht für die ventrikuläre Depolarisation, welche sich vom Apex des Herzens über die beiden Ventrikel ausbreitet (Phase 4). Dies löst die elektromechanische Kopplung aus, wodurch die Kardiomyozyten kontrahieren und es zur schlagartigen Erhöhung des intraventrikulären Drucks kommt. Dieser übersteigt letztendlich den atrialen Druck und die Segelklappen schließen sich, wodurch ein Rückstrom des Bluts in die Vorhöfe verhindert wird. Während der Zeit zwischen Segelklappenverschluss und Öffnung von Pulmonalklappe auf der rechten und Aortenklappe auf der linken Herzseite steigt der Druck in den Ventrikeln an, ohne dass eine Volumenänderung daraus resultiert. Deshalb spricht man hier von einer „isovolumetrischen Kontraktion“. Schließlich übersteigt der intraventrikuläre Druck den innerhalb der Aorta und Pulmonalarterie, wodurch sich die Taschenklappen öffnen. Das Blut folgt einem Druckgradienten und wird nun ausgeworfen. Zeitgleich sinkt der atriale Druck

und die Vorhöfe entspannen sich wieder. Neues Blut tritt so durch die venösen Zuflüsse in die Vorhöfe und der atriale Druck beginnt zu steigen, während die Atrioventrikularklappen verschlossen sind. Etwa 200 Millisekunden (ms) nach dem Beginn der ventrikulären Kontraktion, erfolgt in der fünften Phase die ventrikuläre Repolarisation, die sich in der T-Welle im EKG widerspiegelt.

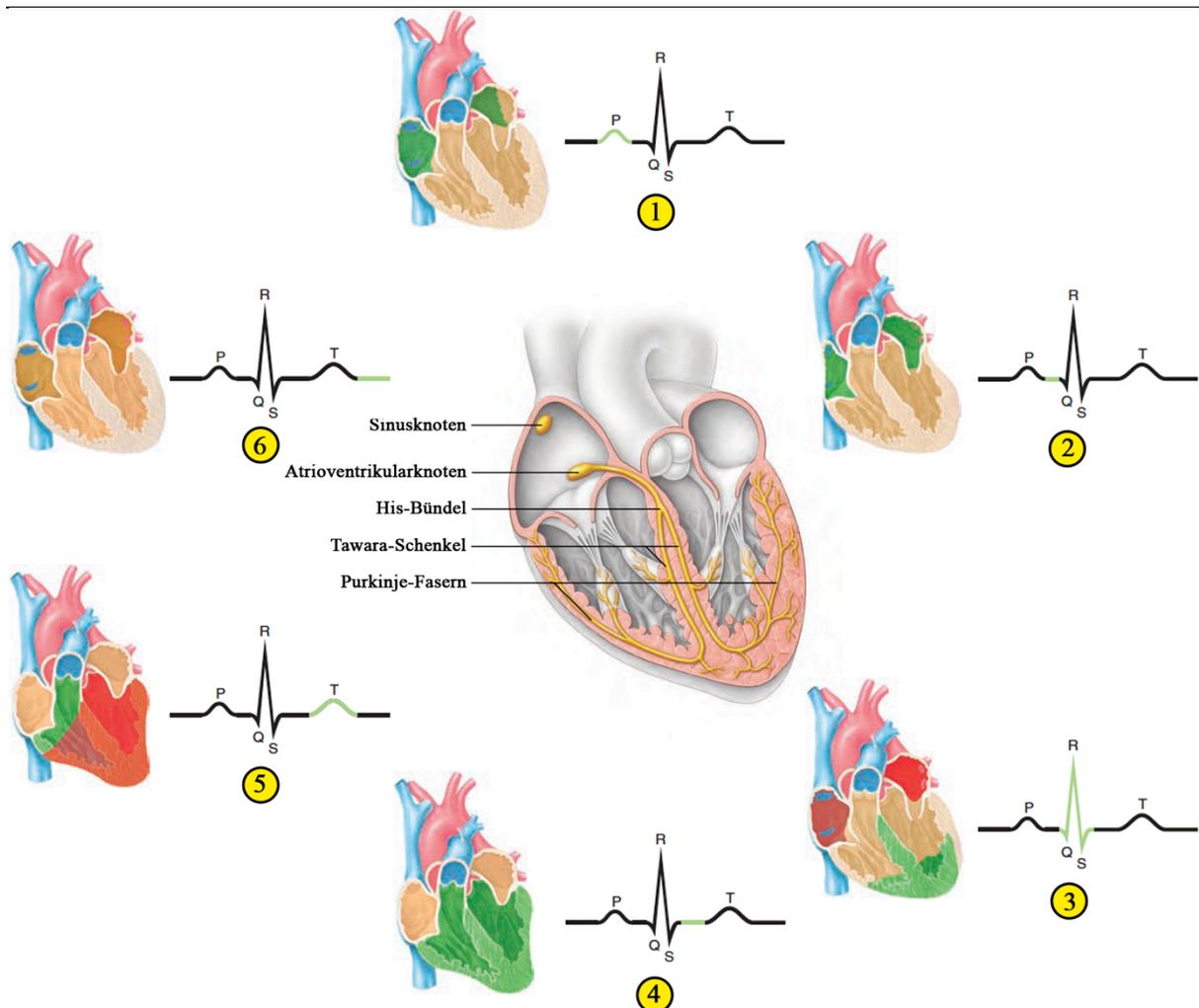


Abb. 1-2: Erregungsleitungssystem des Herzens und Koordination des Herzzyklus verdeutlicht anhand eines EKG-Bildes (verändert nach Marieb & Hoehn, 2013; Tortora & Derrickson, 2009).

Diese Repolarisation führt zu einer Verminderung der ventrikulären Spannung und die Ausstoßrate sinkt. Die Segelklappen bleiben weiterhin geschlossen und der atriale Druck steigt, bedingt durch den venösen Einstrom von sauerstoffreichem Blut aus der Lunge bzw. sauerstoffarmem Blut aus dem großen Kreislauf, allmählich weiter. Sobald der ventrikuläre Druck ausreichend gesunken ist, schließen sich Aorten- und Pulmonalklappe abrupt. Die Abnahme des ventrikulären Drucks ist durch die Fähigkeit zur vollständigen Erschlaffung der Muskelfasern determiniert (Lusitropie). Die Relaxation ist zum großen Teil durch das

sarkoplasmatische Retikulum (SR) reguliert. Obwohl der ventrikuläre Druck während dieser fünften Phase fällt, bleibt das Volumen in den Kammern gleich, da alle Klappen geschlossen sind. Deshalb spricht man hier von der „isovolumetrischen Relaxation“. Während sich die Ventrikel während der sechsten Phase weiter entspannen, fällt der intraventrikuläre Druck unter den zugehörigen atrialen Druck. An diesem Punkt öffnen sich die Atrioventrikularklappen und die Füllung der Kammern beginnt. Trotz des Einstroms fällt der Druck in den Ventrikeln kurzzeitig weiter, da sie sich immer noch in der Entspannungsphase befinden. Erst nach vollständiger Entspannung und anhaltendem Einstrom aus den Vorhöfen, steigt der Druck in den Kammern wieder langsam an. Am Ende der sechsten Phase kommt es zu einem Abfall des Druckgradienten entlang der Atrioventrikularklappen, sodass die Füllrate abnimmt. In ruhenden, gesunden Herzen sind die Kammern bereits zu Ende dieser Phase zu 90% gefüllt. Dies bedeutet gleichzeitig, dass 90% der ventrikulären Füllung vor der atrialen Kontraktion (erste Phase) stattfindet. Der vollständige Prozess ereignet sich innerhalb von circa 800 ms und offenbart sich nach außen hin als ein Schlag, der je nach Körpergröße und -Gewicht zwischen 70-100 ml Blut befördert. Die normale Frequenz beträgt im Ruhezustand 50-80 Schläge pro Minute. Jedoch können Schlagfrequenz und -Volumen je nach körperlicher Tätigkeit stark variieren.

1.1.3. Histologie des Herzmuskelgewebes

Das Arbeitsmyokard bildet den Hauptteil des Herzvolumens und besteht aus kontraktile Kardiomyozyten und Bindegewebszellen. Je nach Spezies variiert der Anteil an Myozyten im adulten Herzen dabei beispielsweise 30% beim Menschen (Katz, 2011) und bis 56% in Mäusen oder Ratten (Banerjee et al., 2007; Zak, 1974). Zu den nicht-myozytären Zellen im Herzen zählen glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten. Letztere sekretieren und modellieren die Extrazellulärmatrix (EZM), welche die Zellen wie ein Flechtwerk umgibt. Dieses Fasernetz besteht hauptsächlich aus Kollagen und Elastin und verbindet zum einen benachbarte Muskelfasern miteinander, zum anderen dient es der Stabilität und verhindert eine Überdehnung der Muskelzellen. Außerdem speichert es mechanische Energie während der Muskelkontraktion, die während der folgenden Diastole den Ausgangszustand wieder herzustellen hilft (Robinson, Factor & Sonnenblick, 1986).

1.1.4. Kardiomyozyten

Kardiomyozyten sind gestreifte, ein- bis mehrkernige, elektrochemisch erregbare Zellen des Herzmuskels und besitzen durchschnittlich eine Länge von 70 bis 150 Mikrometern (μm) und eine Breite von 20 bis 35 μm . Die Erregbarkeit von Kardiomyozyten ist, wie bei allen elektrisch stimulierbaren Zellen der Zusammensetzung ihrer Plasmamembran (Sarkolemma) geschuldet. Sie beherbergt eine Reihe von Ionenkanälen, Pumpen und Austauschern, die an der Generierung und Weiterleitung des APs beteiligt sind. Des Weiteren befinden sich an der Zelloberfläche Rezeptoren für extrazelluläre Liganden, wie beispielsweise Neurotransmitter, die von sympathischen oder parasympathischen Nervenfasern in der Nähe des Sarkolemmas ausgeschüttet werden. Durch sie werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die wiederum die Aktivität der Ionenkanäle beeinflussen. Von der Zelloberfläche bilden transmembrane Adhäsionsstrukturen und kreuzvernetzende Proteine wie α -Actinin, Talin oder Desmin, sowie zytoskelettale Komponenten die Verbindung zum kontraktilem Apparat der Kardiomyozyten (Walker & Spinale, 1999). Dieser Apparat verläuft entlang der Hauptachse der Zellen in Form segmentierter Myofibrillen, die in regelmäßigen Abständen in kontraktile Untereinheiten gegliedert sind (Sarkomere). Parallel dazu verlaufen die Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, das als zelleigener Calciumspeicher dient und auf das durch Transversaltubuli (T-Tubuli) Erregungen weitergeleitet werden (Abb. 1-3). T-Tubuli sind tiefe Einstülpungen in der Plasmamembran der Muskelzelle, die die schnelle Ausbreitung der Depolarisation entlang der Zellmembran ins Zellinnere ermöglichen. Sie verlaufen senkrecht zur Faserrichtung und bestehen wie die Zellmembran selber aus einer Lipiddoppelschicht, in die zahlreiche Calciumkanäle eingelagert sind. Darüber hinaus sind Kardiomyozyten über Glanzstreifen und den darin enthaltenen *Gap Junctions* mit benachbarten Zellen elektrochemisch gekoppelt und sind somit zur interzellulären Erregungsweiterleitung in der Lage. Im folgenden Abschnitt soll im Detail auf den der Zellkontraktion zugrunde liegenden Mechanismus und die wichtigsten beteiligten Zellbestandteile eingegangen werden.

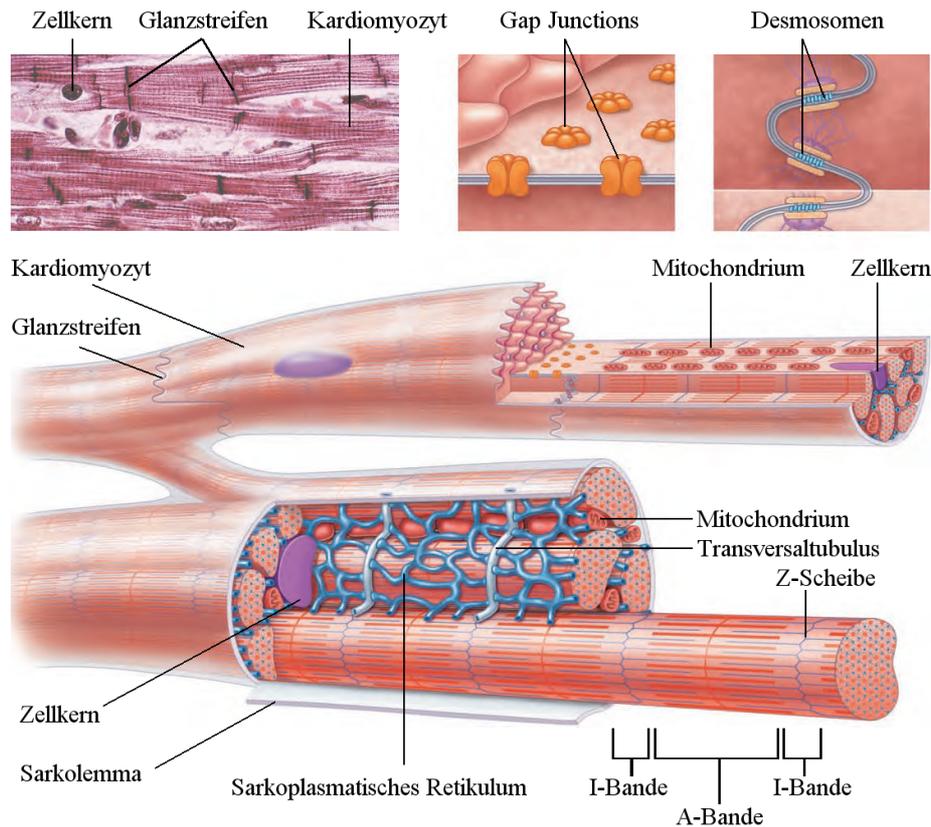


Abb. 1-3: Mikroskopische Anatomie des Herzmuskels. Das Mikroskopiebild (600-fache Vergrößerung) verdeutlicht die Verzweigung und Streifung der Kardiomyozyten (verändert nach Marieb & Hoehn, 2013).

1.1.4.1. Basalmembran

Die Basalmembran bildet die erste Grenze zwischen der Zellmembran und dem Extrazellularraum und besteht hauptsächlich aus Kollagen IV, den Glykoproteinen Laminin und Fibronectin sowie Proteoglykanen (Mescher, 2013). Sie ist die Schnittstelle zwischen der fibrillären Kollagenmatrix des Extrazellularrums und dem Fasernetzwerk, welches die Zelle umgibt. Sie dient außerdem als erste Barriere, die die Zellzugänglichkeit und den Austausch von Makromolekülen reguliert.

1.1.4.2. Sarkolemma

Das Sarkolemma ist aus einer Lipiddoppelschicht aufgebaut, die zu einem großen Anteil aus amphiphilen Phospholipiden besteht. Diese besitzen eine hydrophile Kopffregion, die mit der wässrigen Lösung in der Umgebung und im Zytoplasma wechselwirkt und eine hydrophobe Domäne, welche durch Zusammenlagerung mit den Fettsäureresten anderer Phospholipide die Membran für geladene Moleküle nahezu undurchlässig machen. Neben den gängigen Phospholipiden zählt auch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu den Bestandteilen des

Sarkolemmas, das unter bestimmten Umständen durch die Phospholipase C zu Inositol-1,4,5-triphosphat (InsP₃) hydrolysiert werden und als intrazelluläres Signalmolekül, unter anderem für die Calciumhomöostase (1.1.7), wirken kann (Méry et al., 2005; Berridge, 2009). Das Sarkolemma bildet darüber hinaus zwei Regionen, die für die Kopplung von Erregung und der resultierenden Kontraktion in der Zelle (Erregungs-Kontraktions-Kopplung, 1.1.6), aber auch für die Erregungsweiterleitung zwischen den Zellen von besonderer Wichtigkeit sind. Die T-Tubuli sind Membraneinstülpungen des Sarkolemmas und sind an ihrer Innenseite mit Ionenkanälen ausgekleidet. Ankommende APs können durch die T-Tubuli tief in die Muskelfaser eindringen, welche die vermehrt in ihnen lokalisierten Calciumkanäle in die Nähe des sarkoplasmatischen Retikulums bringen. T-Tubuli sind charakteristisch für ventrikuläre Zellen (Song et al., 2005). Während sie sich hier erst nach der Geburt vollends ausprägen, sind sie in Vorhofzellen generell weniger umfangreich vorhanden (Tidball, Cederdahl & Bers, 1991; Bootman et al., 2006). Die in den Glanzstreifen lokalisierten *Gap Junctions* durchbrechen die vom Sarkolemma aufgebaute Diffusionsbarriere und erlauben die rapide Weiterleitung von Reizen in Form interzellulärer Ionenströme (Katz, 2011).

1.1.4.3. Sarkoplasmatisches Retikulum

Das SR ist eine Form des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) in Myozyten. Während im ER Moleküle synthetisiert werden, fungiert das Membrannetzwerk des SR als Speicherorganelle der Zelle, welches die zytoplasmatische Calciumkonzentration reguliert (Kadambi & Kranias, 1997; Katz, 2011). Die sarkoplasmatische Calciumkonzentration beträgt während der Diastole zwischen 1 und 1,5 mM (Shannon, Guo & Bers, 2003) und ist damit um das 10.000-fache größer, als die des Zytoplasmas mit ~150 nM, (Failli et al., 1992; Thompson et al., 2000). Es lässt sich in vier Bereiche unterteilen: junktionales (JSR), corbuläres (lat. = Körbchen, CSR) und Netzwerk-SR (NSR) (Thiriet, 2013). Das JSR weitet sich an bestimmten Stellen mehrfach aus und bildet terminale Zisternen, die in unmittelbarer Nähe (12 bis 15 nm) zu den L-Typ Calciumkanälen der T-Tubuli stehen (Franzini-Armstrong, Protasi & Ramesh, 1999). Im JSR befindet sich der Hauptanteil der sensitiven Ryanodin-Rezeptoren (RyR, Jorgensen, Shen, Arnold, McPherson, & Campbell, 1993), die auf lokale Konzentrationserhöhungen von Calcium in dem schmalen Spalt mit der Freisetzung von sequestriertem Calcium reagieren (engl.: *calcium-induced calcium release*, CICR) (Endo, 1977; Fabiato, 1983). Das CSR enthält sowohl RyRs, als auch das Calcium-bindende Protein Calsequestrin (Jorgensen et al., 1993; Bootman et al., 2006). Letzteres ist über Triadin und

Junctin an das innere Ende des RyR gekoppelt, speichert durch schwache Bindung (je nach Isoform und Spezies: $k_d = 1$ bis $100 \mu\text{M}$) 18 bis 50 Calciumionen pro Molekül in den Zisternen des SR und spielt somit eine wichtige Rolle im Calciumhaushalt der Zelle (Beard, Laver & Dulhunty, 2004). Den Rücktransport von Calcium ins SR nach erfolgter Zellkontraktion bewerkstelligt die kardiale Isoform der sarko(endo)plasmatische Calcium-ATPase 2a (SERCA-2a) und bestimmt durch Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration maßgeblich die Relaxation des Muskels (Periasamy & Huke, 2001). SERCA-2a befindet sich hauptsächlich im NSR, welches als Röhrensystem die Sarkomere ummantelt und mit den Z-Banden kolokalisiert (Tuvia et al., 1999). Ihre Aktivität wird im Herzen neben der ATP-Hydrolyse durch die beiden Proteine Phospholamban (PLB) und Sarkolipin (SLN) reguliert (Periasamy, Bhupathy & Babu, 2008). In beiden Fällen handelt es sich um transmembrane Proteine des SR, die unmittelbar mit SERCA-2a wechselwirken. PLB ist ein 52 Aminosäuren großes Phosphoprotein, dessen Primärstruktur hoch konserviert in verschiedenen Spezies vorkommt. Bei niedrigem zytosolischen Calciumlevel interagiert PLB als Monomer mit einer zytosolischen Regulationsdomäne für SERCA-2a und inhibiert deren Transportfunktion durch Verringerung ihrer Calciumaffinität. Eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bedingt eine Abnahme der hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen SERCA-2a und PLB, wodurch es zur Aktivierung der Pumpe kommt (Periasamy et al., 2008). Darüber hinaus existiert ein zweiter PLB-vermittelter Regulationsmechanismus. Hierbei bindet PLB im dephosphorylierten Zustand als Monomer an SERCA-2a, begünstigt eine Oligomerisierung von SERCA-2a Pumpen und verlangsamt deren Aktivität durch gegenseitige sterische Hinderung (Voss, Jones & Thomas, 1994). Wird PLB phosphoryliert, löst sich sein zytoplasmatischer Teil von SERCA-2a und PLB Monomere aggregieren in der SR-Membran zu Pentameren. Dadurch lösen sich wiederum die SERCA-2a Aggregate und es kommt zu einer erhöhten Beweglichkeit der SERCA-2a Pumpen (Cornea et al., 1997). Im Gegensatz zu PLB ist die Funktionsweise von SLN noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten zwischen den Aminosäuresequenzen beider Transmembrandomänen geht man jedoch von einem ähnlichen Prinzip aus. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass beide an die gleiche regulatorische Untereinheit der SERCA-2a binden (Asahi et al., 2003).

1.1.4.4. Sarkomer

Die kleinsten kontraktilen Untereinheiten von Kardiomyozyten bilden die Sarkomere (Abb. 1-4). Diese lassen sich bereits durch lichtmikroskopische Betrachtung als abwechselnde dunkle und helle Bänder erkennen, die durch die Anordnung der (dicken) Myosin-II- und (dünnen) Aktinfilamente verursacht werden (Silbernagl & Despopoulos, 2012). Die äußeren Grenzen eines Sarkomers werden durch die Z-Scheiben (von „Zwischenscheibe“) definiert. Sie flankieren in regelmäßigen Abständen von ca. 2 μm (Pollack & Huntsman, 1974) die beiden Seiten des kontraktilen Apparats und stabilisieren dessen innere, hoch organisierte Struktur. In ihnen sind die Aktinfilamente verankert, welche sich von dort aus ins Zentrum des Sarkomers fortsetzen. Durch die dünnen Filamente wird das Licht nur einfach gebrochen, wodurch diese Bereiche als helle Banden im Mikroskop sichtbar werden (I-Banden, von „isotrop“). Die Region, in der sich die Aktin- und Myosinfilamente parallel überlappen, sind durch ihre dichte Packung doppelt lichtbrechend und somit dunkler (A-Bande, von „anisotrop“). Die H-Zone (von „hell“) enthält nur Myosinfilamente, die sich im Zentrum des Sarkomers zur M-Linie verdicken (Tortora & Derrickson, 2009; Marieb & Hoehn, 2013). Die Kontraktion einer Myofibrille ereignet sich über die Verkürzung der Sarkomere, die durch teleskopartiges Vorbeigleiten der Myosinfilamente an den Aktinfasern entsteht (Gleitfasermode; Huxley & Niedergerke, 1954).

Das dicke Filament besitzt eine Länge von 1,6 μm (Silbernagl & Despopoulos, 2012), einen Durchmesser von ca. 15 nm und besteht hauptsächlich aus Myosin-II (Berg, Tymoczko & Stryer, 2007). Myosin-II enthält zwei schwere (MHC, ~ 220 kDa) und vier leichte Ketten (MLC, ~ 20 kDa) (Clark et al., 2002). Die N-terminale Region einer MHC und zwei MLC bilden zusammen eine der beiden Kopfdomänen. Beide Myosinköpfchen besitzen je eine Bindestelle für G-Aktin im dünnen Filament und eine hydrolytisch aktive ATP-Bindestelle (Rayment et al., 1993; Milligan, 1996).

Die MLCs gehören zu den Proteinen der EF-Hand-Familie und ähneln in ihrer Struktur der des Calmodulins. Sie umschließen die α -Helix des Myosin-Kopfbereichs, um diese zu verstärken (Berg et al., 2007). Zusammen mit der flexiblen Halsregion des Myosin-Dimers bilden sie das schwere (*heavy*) Meromyosin Subfragment (HMM). Die C-terminale Region der beiden MHCs wird als leichtes (*light*) Meromyosin (LMM) bezeichnet und formt einen verlängerten Schaft. LMM spielt eine wichtige Rolle bei Polymerisation und mithilfe der Schwanzregion können sich mehrere Myosinmoleküle zu Bündeln höherer Ordnung zusammenlagern (Alberts et al., 2008).

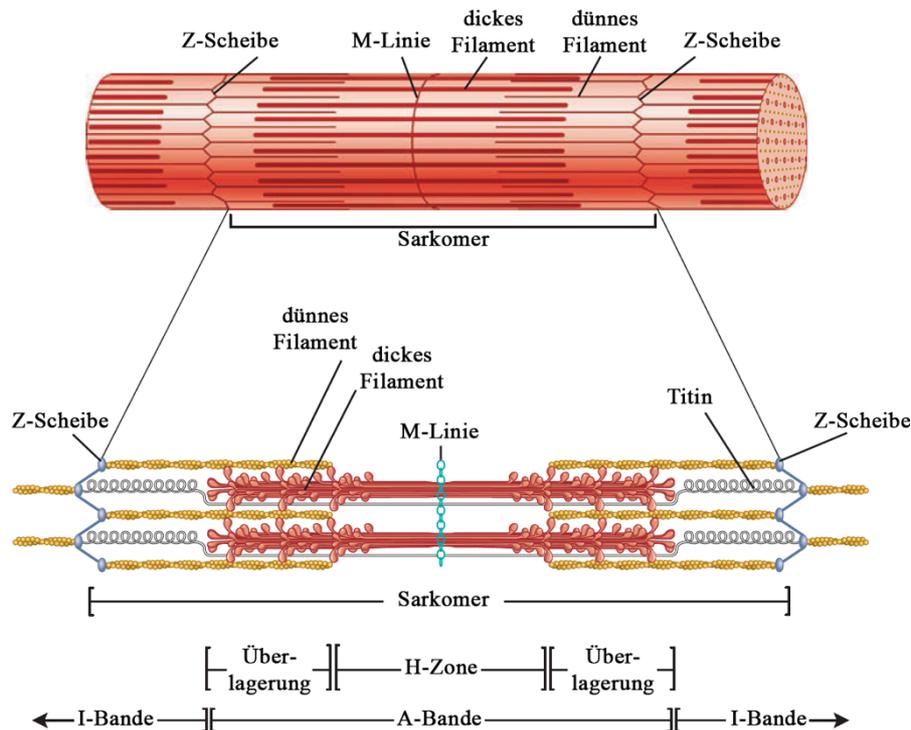


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Anordnung der Myofilamente innerhalb eines Sarkomers. Die dünnen Aktinfilamente verlaufen parallel zueinander und sind an einem Ende mit den Z-Scheiben des Sarkomers verbunden. Die dicken bipolaren Myosinbündel verlaufen ausgehend von der M-Linie zwischen den dünnen Filamenten (verändert nach Tortora & Derrickson, 2009).

Das dünne Filament wird aus zwei einzelnen, zu einer α -Helix gewundenen Aktinfilamenten (F-Aktin, von „filamentös“) gebildet, die zusätzlich mit den regulatorischen Proteinen Tropomyosin und drei verschiedenen Troponinen assoziiert sind (Lodish et al., 2007). Ihre Länge von $\sim 1 \mu\text{m}$ wird durch die Hilfsproteine Nebulin, Tropomodulin und CapZ reguliert. Der C-Terminus von Nebulin ist, ebenso wie F-Aktin in die Z-Scheiben verankert, während dessen N-terminales Ende bis zum Ende des dünnen Filaments reicht und dort mit Tropomodulin interagiert (Millevoi et al., 1998; McElhinny et al., 2001). Die Länge des Nebulins entspricht der des Filaments und erfüllt dadurch vermutlich die Rolle eines molekularen Lineals (Kruger, Wright & Wang, 1991). CapZ kolokalisiert mit α -Actinin in den Z-Scheiben und bildet mit ihm zusammen einen Ankerkomplex für das Plusende des dünnen Filaments (Papa et al., 1999). Am Minusende übernimmt diese Rolle Tropomodulin und somit verhindern beide die Depolymerisation des F-Aktins (Weber et al., 1994). Jeder Myosinkopf besitzt eine ATPase-Aktivität, die durch Interaktion mit Aktin aktiviert wird. Die dynamische Arbeit der Myosinköpfe generiert durch Verschiebung der dünnen entlang der dicken Filamente Kräfte, die zur Muskelkontraktion führen. Die Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin ist Calcium-abhängig und wird durch den regulatorischen Troponin-

Tropomyosin-Komplex kontrolliert (Weber & Murray, 1973). Troponin (Tn) ist ein kooperativer Komplex, der von drei Proteinen gebildet wird (TnC, TnI und TnT). TnC ist ein Calmodulin-verwandtes Protein und gehört zur Familie der Calcium-bindenden EF-Hand Proteine. Es besteht aus einer C-terminal und einer N-terminal globulären Domäne, die über eine zentrale α -Helix miteinander verbunden sind. Jede Domäne enthält ein Paar eines Helix-Schleife-Helix Metallionen-Bindemotifs (Farah & Reinach, 1995). In der quergestreiften Muskulatur von Säugerzellen existieren drei Isoformen von TnC: schnelles und langsames skelettales TnC und das kardiale TnC. Während in den skelettalen Isoformen alle vier EF-Hand-Motive zur Bindung von Calcium in der Lage sind, existiert in der kardialen Isoform aufgrund von Aminosäuresubstitutionen nur eine funktionale Bindestelle in der N-terminalen Domäne (van Eerd & Takahashi, 1975). TnI fungiert als inhibitorische Untereinheit des Tn-Komplexes. Im Sperrzustand ist die N-terminale Region des TnI an TnC und TnT gebunden, sein C-Terminus bindet stark an Aktin. Die Bindung von Calcium induziert eine Reduktion der Bindeaffinität des C-Terminus zu Aktin, während die zum regulatorischen N-Terminus von TnC steigt (Davis & Tikunova, 2008) und letztlich zur Lösung von der Aktinbindestelle führt. Kardiales TnI besitzt einen regulatorischen Serinrest, der durch Proteinkinase A vermittelte Phosphorylierung die Calcium-Sensitivität von TnC reduziert. TnT vermittelt die Bindung des TnC/TnI Dimers an Aktin und Tropomyosin (TM). TM ist ein stabförmiges, fibrilläres Strukturprotein und besteht aus zwei gewundenen Ketten. Seine primäre Funktion ist, in Zusammenarbeit mit dem Tn-Komplex, die Regulation der Interaktion zwischen dem dicken und dem dünnen Filament. Als integraler Bestandteil ist es entlang der α -helikalen Furche des dünnen Filaments ausgerichtet und blockiert im relaxierten Zustand der Muskelzelle die Myosin-Bindestelle an dessen äußerer Domäne. Durch Calcium-Bindung erfährt TM eine Tn-vermittelte Konformationsänderung und legt durch eine Positionsänderung die Bindestellen für Myosin frei.

1.1.4.5. Zell-Matrix-Kontakte

In der Zellmembran sind die Filamente in Fokaladhäsionen (FAs) verankert (Abercrombie & Dunn, 1975). Dabei handelt es sich um 2-5 μm lange, sowie 250-500 nm breite Proteincluster, die das Zytoskelett über transmembrane Integrinrezeptoren mit der EZM verbinden (Abb. 1-5). Diese besteht aus einem maschenartigen Netzwerk kreuzvernetzter Proteine und Polysaccharide, deren Zusammensetzung sich je nach Gewebstyp unterscheidet. Die

Hauptvertreter umfassen verschiedene Kollagene, Laminin, Elastin und Fibronectin (FN) welche mit Hyaluronsäure und Proteoglykanen ineinandergreifen (Eyckmans et al., 2011).

Die Bestandteile von FAs können nach ihrer Funktion in mehrere Gruppen von Fokaladhäsions-Proteinen (FAPs) unterteilt werden: (1) transmembrane Integrine und Syndecane, (2) Zytoskelettale Proteine ohne enzymatische Aktivität mit direkter oder indirekter Verbindung zu Aktin sowie teilweise Integrin, wie z.B. α -Actinin, Paxillin, Talin, Tensin, Vinculin usw. (Zaidel-Bar et al., 2004) und (3) enzymatisch aktive Proteinen, z.B. eine Reihe von Proteinkinasen, wie Mitglieder der SRC Familie, Fokaladhäsionskinasen (FAKs) usw. (Zamir & Geiger, 2001).

Speziell die zytoplasmatischen Proteine ermöglichen durch vielfältige Regulationsmechanismen, wie beispielsweise Konformationsänderungen oder regulierte Bindungsaffinitäten die stabile Interaktion des Zytoskeletts mit der EZM und erlauben so die Übertragung von Kräften während Adhäsion, Kontraktion, Zellmigration oder Matrixumgestaltung (Gilmore et al., 1993; Geiger, Spatz & Bershadsky, 2009; Shattil, Kim & Ginsberg, 2010). Die Bindung der Integrin-Heterodimere an die EZM wird über zweiwertige Kationen vermittelt (Mould, Akiyama & Humphries, 1995) und erfolgt dabei häufig über den $\alpha_5\beta_1$ Rezeptor an das RGD-Bindemotif (Arg-Gly-Asp). Neben der Übertragung intrazellulär generierter Kräfte (*inside-out signaling*) können Integrine auch Informationen aus der Umgebung in die Zelle vermitteln (*outside-in signaling*) und ermöglichen so eine bidirektionale mechanische Kommunikation zwischen der Zelle und ihrer Umgebung (Hynes, 2002). Die Bindung von Integrinen an ihre EZM-Liganden und deren mechanische Beanspruchung führt zu einer Anhäufung weiterer Integrine im Bereich der Adhäsionen (Giancotti, 1999). FAs spielen im intakten Gewebe eine untergeordnete Rolle, da sie für Einzelzellen eher artifizielle Strukturen darstellen.

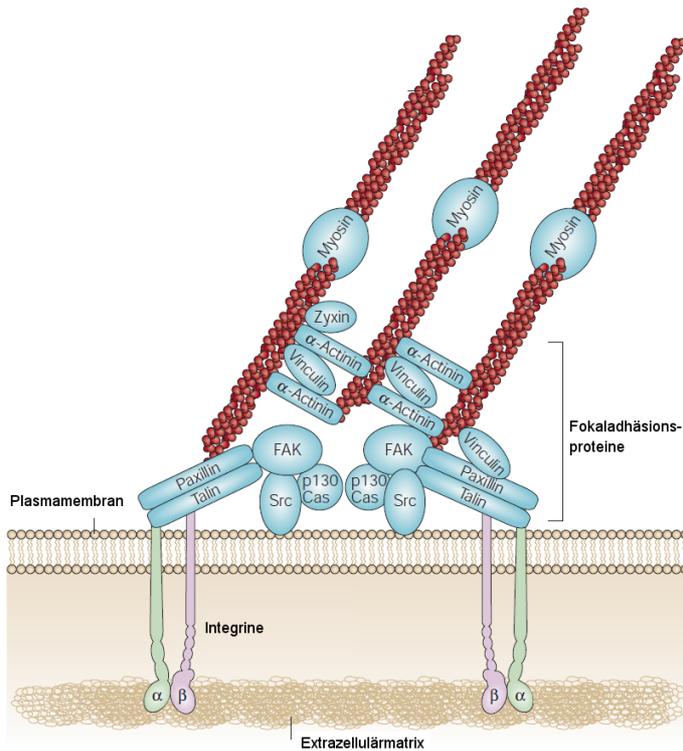


Abb. 1-5: Schematische Darstellung einer Fokaladhäsion und der wichtigsten, an ihrer Bildung beteiligten Bestandteile. Die Kopfdomänen von Integrin binden an die EZM, die zytoplasmatischen Reste vermitteln über Adapterproteine den Kontakt zum Aktin-Zytoskelett und zur Fokaladhäsionskinase (FAK), (verändert nach Mitra, Hanson, & Schlaepfer, 2005).

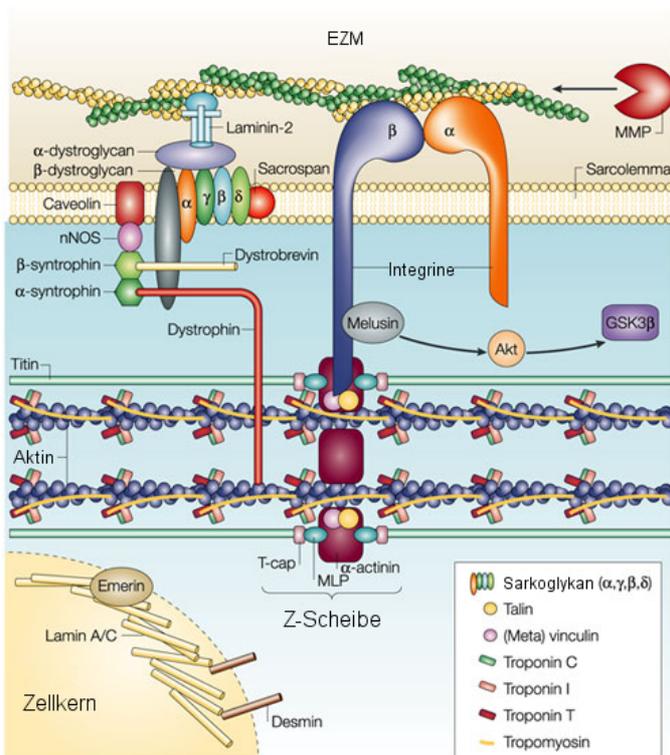


Abb. 1-6: Schematische Darstellung eines Costamer-Komplexes. Zwei Laminin-Rezeptoren, ein Dystrophin/Glykoprotein-Komplex und ein Integrin-Rezeptor-Komplex gehören zur Costamerstruktur (Pardo, D'Angelo Siliciano & Craig, 1983), die den kontraktilem Apparat entlang der Myofibrillen mit der umgebenden EZM verknüpfen (verändert nach Liew & Dzau, 2004).

Costamere sind spezielle Proteinkomplexe in Skelett- und Herzmuskelzellen, die erstmals von Pardo beschrieben wurden (Pardo et al., 1983). *In vivo* bestehen Costamere von adulten Myozyten aus einem komplexen Netzwerk aus Proteinen, die zum großen Teil auch in typischen FAs vorkommen, wie beispielsweise Vinculin, Talin, Integrin und vor allem α -Actinin (Abb. 1-6). Des Weiteren besitzen Costamere noch spezifische Proteine, wie beispielsweise Desmin als Intermediärfilament sowie Plectin, dem eine besondere Rolle in der Verbindung der Z-Scheiben mit der Plasmamembran zukommt. In Myozyten verbinden sie über Integrine (und dem Dystrophin/Glykoprotein-Komplex) die Z-Scheiben der Sarkomere mit der Plasmamembran (Plasmalemma) (Danowski et al., 1992). Dystrophin fungiert als Bindeglied zwischen Aktin und β -Dystroglykan, einem die Zellmembran überbrückenden Protein, das wiederum an das außerhalb der Muskelzelle liegende α -Dystroglykan bindet. α -Dystroglykan ist einer der wichtigsten Rezeptoren für Proteine der Basalmembran (Clark et al., 2002). Costamere dienen in erster Linie der geordneten mechanischen Kopplung der kontraktile Einheit an die EZM (Imanaka-Yoshida et al., 1999). Mutationen in den costamerspezifischen Proteinen können Fehlfunktionen in der Kontraktion von Myozyten auslösen (Frank et al., 2006).

1.1.4.6. Zell-Zell-Verbindungen

Zellkontakte bilden spezialisierte Regionen der Plasmamembran, die sich je nach Funktion in drei Kategorien einordnen lassen: (1) undurchlässige Verbindungen, die einen internen Bereich chemisch vom Rest seiner Umgebung abgrenzen; (2) Kontakte zur Strukturierung und Verstärkung der Gewebsintegrität und (3) Schnittstellen der interzellulären Kommunikation zum Austausch von Nähr- und Botenstoffen. Innerhalb dieser Strukturen sind verschiedene Membranproteine spezifisch angeordnet. Zur ersten Gruppe zählen die *Tight Junctions*. Sie umzäunen bestimmte Regionen in der Zellmembran und verhindern dadurch die freie Diffusion von Molekülen zwischen apikalen und basolateralen Membranen in Endothel- oder Epithelzellen (Hartsock & Nelson, 2008). Durch den reziproken Kontakt benachbarter Verbindungslinien zweier Zellen kann die Dichtheit der Verbindung reguliert und parazelluläre Permeabilität moduliert werden. Die zweite Gruppe der Zellkontakte bilden die strukturenbildenden *Adherens Junctions* (AJs) und Desmosomen (Abb. 1-7). Beide besitzen an der Innenseite der Plasmamembran eine dichtgepackte Schicht aus Proteinen (Plaques), die die Filamente des Zytoskeletts über transmembrane Glykoproteine miteinander verbinden.

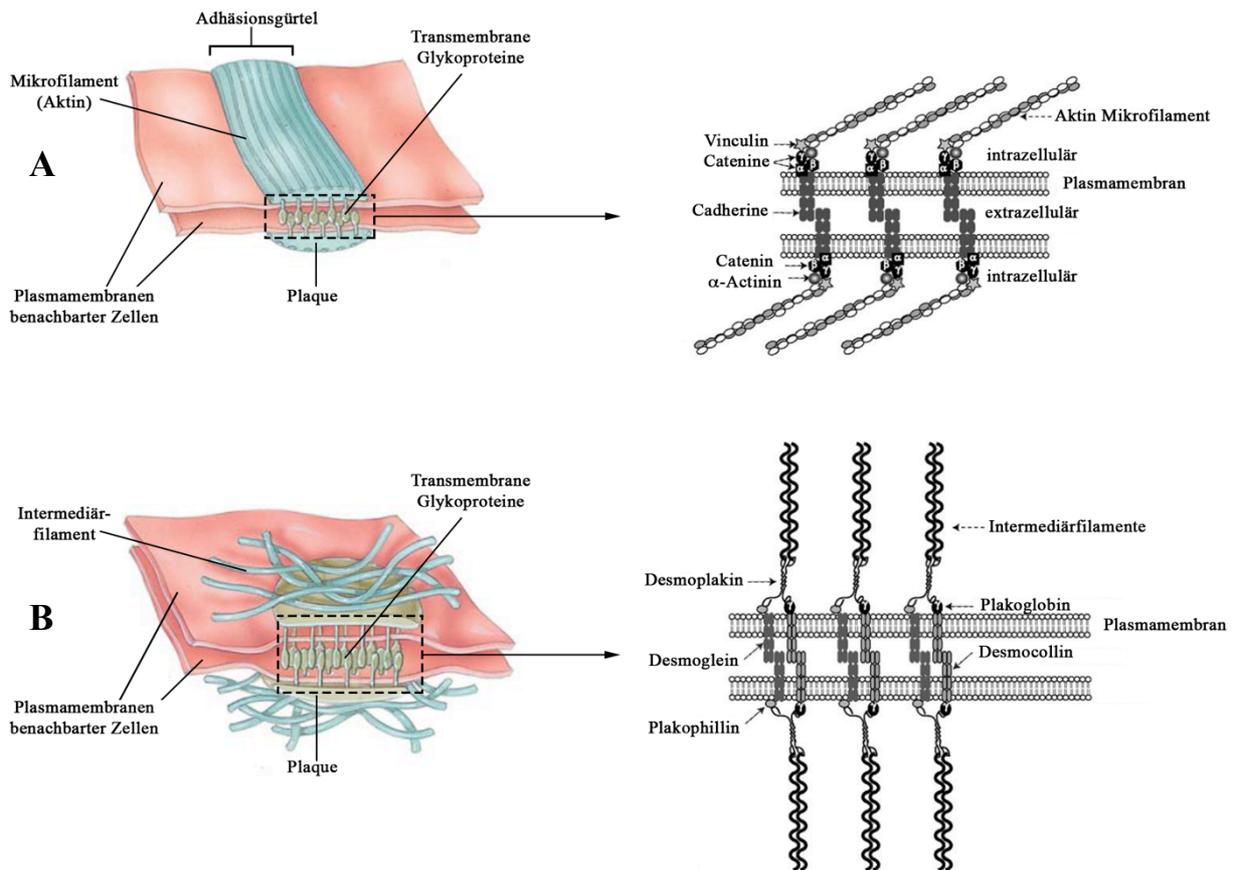


Abb. 1-7: Schematische Darstellung strukturegebender Zellkontakt-Typen: A Adhärenzverbindungen (AJs) bilden einen Adhäsionsgürtel, der hauptsächlich aus Cadherinen und Aktinfilamenten aufgebaut ist und benachbarte Zellen miteinander verbindet; B Desmosomen bestehen, ähnlich wie AJs transmembranen Glykoproteinen, deren zyttoplasmatisches Ende jedoch mit Intermediärfilamenten verbunden sind. Sie tragen zur strukturellen Stabilität von Zellen und Geweben bei (verändert nach Tortora & Derrickson, 2009 und Katz, 2011).

In den AJs tragen Aktin-bindende Adapterproteine (α -Actinin, Vinculin) zur Bündelung der Aktinfilamente bei und verbinden diese über Catenine mit den Interzellularraum überbrückenden Cadherinen, die die Zellen letztendlich miteinander verbinden. Catenine sind neben der Zell-Zell-Adhäsion auch in der Signalweiterleitung beteiligt (Gottardi & Gumbiner, 2004). α -Catenin dient in AJs als Mechanosensor, der sowohl über Myosin generierte als auch aus der Umgebung wahrgenommene Spannung in ein chemisches Signal umwandelt. Durch Dehnung kommt es zu einer Streckung des Proteins und so zu einer Freilegung seiner Vinculin-Bindestelle. Über Vinculin assoziieren vermehrt Aktin Filamente mit AJs, um der erhöhten Kraft zwischen zwei Zellen entgegenzuwirken (Yonemura et al., 2010). Darüber hinaus sind Catenine nicht nur Bestandteile der AJs, sondern können auch in den Kern translozieren und als Co-Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (z.B. β -Catenin, Brembeck et al., 2004). In Kardiomyozyten sind die dort *Fascia Adherens*

genannten AJs vor allem in den Glanzstreifen lokalisiert und tragen dort zur Kraftübertragung während der Zellkontraktion bei.

Desmosomen existieren in zwei Stadien, die sich in ihrer Haftfestigkeit unterscheiden. Im „schwachen“ Zustand ähnelt ihre Haftfestigkeit der von AJs. Der „hyper-adhäsive“ Zustand erlaubt Zellen im Verbund großem mechanischem Stress standzuhalten (Garrod et al., 2005). Diese Eigenschaft haben sie ihrem Aufbau zu verdanken. Sie besitzen ebenfalls intrazelluläre Plaques, die sich in ihrer Zusammensetzung jedoch von denen der AJs unterscheiden. Sie vermitteln eine heterotypische Bindung benachbarter Zellen über die Cadherine Desmoglein und Desmocollin. Über Desmoplakin entsteht die desmosomale Adhäsion zwischen Intermediärfilamenten (Keratin in Epithelzellen und Desmin in Kardiomyozyten) und den Armadilloproteinen Plakophilin bzw. Plakoglobin (auch γ -Catenin) (Garrod & Chidgey, 2008), die wiederum die Catenine binden. Je nach Anforderung an das Gewebe sind die beteiligten Zellen in der Lage, über die Calcium-Affinität desmosomaler Strukturen die Bindungsstärke zu regulieren (Calciumunabhängigkeit: „hyper-adhäsiv“, Calciumabhängigkeit: „schwach“; D. R. Garrod et al., 2005). Mutationen in Genen, die für Proteine des Desmosomen-Intermediärfilament-Komplexes kodieren führen zu verschiedenen Krankheitsbildern, beispielsweise *Epidermolysis bullosa simplex* (Lane & McLean, 2004), bei der epidermale Zellen sich im Verband voneinander oder aber der Basalmembran lösen, was zu einer großflächigen Bläschenbildung der Haut führt. Die Gene für Desmoplakin, Plakoglobin und Plakophilin für die Ausprägung der *arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie* identifiziert (Dokuparti et al., 2005). Sie ist durch den fortschreitenden Verlust von Herzmuskelzellen und deren Ersatz durch Bindegewebszellen und damit einhergehenden Arrhythmien und plötzlichem Herzversagen charakterisiert.

Gap Junctions (GJs) bilden die dritte Gruppe der Zellverbindungen. Sie stellen eine Ansammlung von Kanälen dar, die die Membranen benachbarter Zellen durchqueren und deren Zytoplasma miteinander verbinden (Abb. 1-8). Im Vergleich zu den *Tight Junctions* verbleibt zwischen den Membranen eine, mit dem Elektronenmikroskop erkennbare Lücke. Zur Bildung dieser Kanäle trägt jede Zelle mit einem Halbkanal (Connexon) bei, der wiederum aus sechs membrandurchspannenden Connexin-Untereinheiten besteht (Goodenough, Goliger & Paul, 1996). Durch deren hexagonale Anordnung formen sie eine Pore, die Stoffe mit einer Molekülmasse von bis etwa 1 kDa durchlässt (Loewenstein & Loewenstein, 1981). Somit sind neben Ionen (z.B. Calcium) auch zahlreiche organische Stoffe (z.B. ATP) dazu befähigt, zwischen Zellverbänden zu diffundieren und diese sowohl elektrisch als auch metabolisch miteinander zu koppeln. Die elektrische Kopplung erlaubt es,

dass sich die Erregung von Muskelzellen im Myokard auf ihre Nachbarzellen ausbreitet und somit eine Erregungswelle über weite Teile des Organs ausbreitet (Silbernagl & Despopoulos, 2012). Die Gen-Familie der Connexine (Cx) umfasst in der Maus 20, im Menschen 21 Mitglieder (Söhl & Willecke, 2004). Sie unterscheiden sich strukturell hauptsächlich in der Länge ihrer C-terminalen Domäne, worauf ihre unterschiedliche Größe (25 bis 62 kDa) und schließlich ihre Nomenklatur (z.B. Cx25) zurückzuführen ist (Beyer, Paul & Goodenough, 1990). Die Amino-Enden einiger Connexine besitzen Konsensussequenzen für eine potenzielle *N*-Glykosylierung, diese werden jedoch nicht verwendet (Rahman, Carlile & Evans, 1993; Wang et al., 1995). Zwar zeigen Connexine eine charakteristische Verteilung in verschiedenen Gewebstypen, jedoch exprimieren viele Zelltypen mehr als nur eine Isoform.

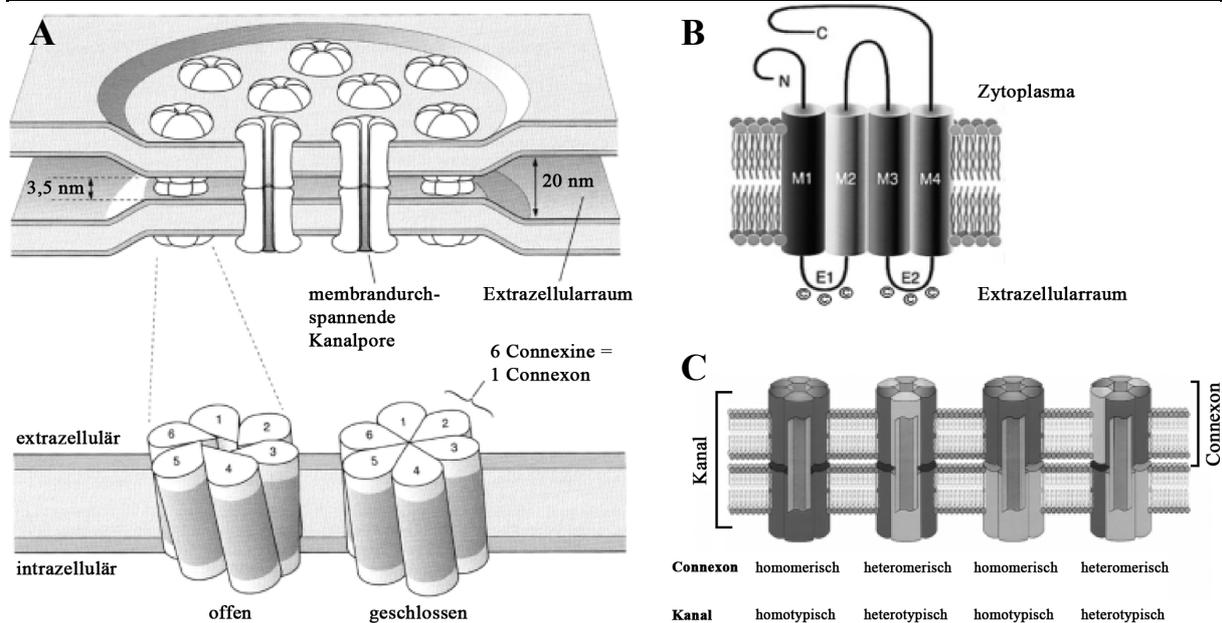


Abb. 1-8: Schematische Darstellung von Gap Junctions. (A) Jede gegenüberliegende Zelle trägt mit einem Halbkanal (Connexon) zu der Bildung eines GJ Kanals bei. Jeder Halbkanal (ca. 1,5-2,0 nm im Durchmesser) ist ein Hexamer, bestehend aus Connexinen, die durch Konformationsänderung die Öffnung regulieren. (B) Topologisches Modell eines Connexins. Die transmembranen Domänen werden durch zwei extrazelluläre (E1 & E2) und einen zytoplasmatischen Loop (zwischen M2 & M3) miteinander verbunden. (C) Anordnungsmöglichkeiten der Halbkanäle (verändert nach Willecke et al., 2002).

Je nach Kombination und Anordnung der verschiedenen Connexine bezeichnet man die Halbkanäle als homomerisch (d.h. sechs identische Connexine bilden ein Connexon) oder heteromerisch (mehr als eine Isoform bildet das Connexon) (Segretain & Falk, 2004). Sind beide Halbkanäle der benachbarten Zellen in ihrer Zusammensetzung identisch spricht man von homotypischen, bei unterschiedlicher Zusammensetzung von heterotypischen Kanälen (Dedek et al., 2006). Demnach existiert theoretisch eine Vielzahl von Möglichkeiten, jedoch

sind nicht alle Isoformen miteinander kombinierbar. Beispiele für heteromere Connexone sind Cx26/Cx32 in der Leber (Sosinsky, 1995), Cx46/Cx50 in der Linse des Auges (Jiang & Goodenough, 1996) und Cx26/Cx30 in der Innenohrschnecke (Sun et al., 2005). Die beschriebene Diversität ist von hoher Bedeutung, da die Kombination der interzellulären Kanäle unterschiedliche physiologische Eigenschaften mit sich bringen, insbesondere die Variation der Molekül-Permeabilität (Harris, 2007). Diese wird nicht zwingend durch die Größe oder Ladungsverhältnisse innerhalb der von ihnen gebildeten Pore bestimmt (Veenstra et al., 1995; Wang & Veenstra, 1997). Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Connexine besitzen eine beachtlich kurze Halbwertszeit von teilweise weniger als fünf Stunden (Fallon & Goodenough, 1981; Laird, Puranam & Revel, 1991). Es wird vermutet, dass dies Teil eines Regulationsmechanismus darstellt, mit dem Zellen auf vorherrschende physiologische Ansprüche reagieren können (Segretain & Falk, 2004). Je nach Typ oligomerisieren sie entweder im endoplasmatischen Retikulum oder im Golgi Netzwerk (Koval, 2006), von dem zunächst angenommen wurde, dass es alle Connexine im Verlauf ihrer Biosynthese passieren. Ihr Transport an die Zelloberfläche erfolgt typischerweise über Mikrotubuli (Johnson et al., 2002). An der Zellmembran angekommen, werden die Connexone in die Plasmamembran integriert und diffundieren zunächst frei durch die Lipiddoppelschicht (Thomas et al., 2005) und im Zusammenspiel mit N- und E-Cadherin-vermittelten Adhäsionsereignissen (Jongen et al., 1991; Wei et al., 2005) docken Connexone benachbarter Zellen aneinander, um einen GJ Kanal zu bilden. Neue GJ werden dabei am äußeren Rand eines Plaques gebildet, während ältere Kanäle im Zentrum des Plaques akkumulieren (Lauf et al., 2002), um dort internalisiert und schließlich degradiert zu werden (Gaietta et al., 2002).

1.1.5. Membranpotenzial

Die Autorhythmie des Herzens ist ein fundamentaler physiologischer Prozess in höheren Organismen. Seine Aktivität wird durch spezielle Populationen von Herzzellen bestimmt, die periodisch spontane, elektrische Oszillationen generieren (Katz, 2011). Der genaue Ablauf zur Initiierung dieses Schrittmacherzyklus in diesen Zellen ist noch nicht vollends geklärt. Es ist allerdings bekannt, dass die Bildung dieser Aktionspotenziale aus dem Öffnen und Schließen von Ionenkanälen resultiert, die das Sarkolemma der Zelle auskleiden. Ihr Expressionsmuster unterscheidet sich in den verschiedenen Regionen des Herzens und je nach

Typ besitzen sie unterschiedliche molekulare und pharmakologische Eigenschaften, die ihre selektive Durchlässigkeit beeinflussen (Amin, Tan & Wilde, 2010). Die Plasmamembran ist aufgrund ihrer Zusammensetzung für geladene Moleküle weitestgehend undurchlässig. Ionenkanäle fungieren als Schleusen, indem sie die Aktivierungsenergie, die für den Durchtritt durch die Zellmembran nötig ist, senken. Das Ruhepotenzial einer Zelle wird bestimmt durch die Konzentration positiv und negativ geladener Ionen innerhalb und außerhalb der Zellmembran, die relative Permeabilität der Zellmembran für diese Ionen sowie Ionenpumpen, die diese Ladungsträger aktiv unter ATP-Verbrauch entgegen ihres Konzentrationsgradienten transportieren und somit die Homöostase der intrazellulären Ionenkonzentrationen aufrecht erhalten. Während eines APs ändert sich die Permeabilität eines Ionenkanals für ein bestimmtes Ion, wodurch letzteres in der Lage ist, passiv entlang eines elektro-chemischen Gradienten die Membran zu durchqueren (Grant, 2009). Der elektro-chemische Gradient bestimmt dabei, ob sich ein Ion von Außen ins Zellinnere bewegt oder umgekehrt. Der Einstrom von Kationen führt dabei zur Depolarisation, ein Ausstrom zur Repolarisation der Zelle.

1.1.5.1. Ruhepotenzial

Von allen in der Zelle vorhandenen Ionen sind die Konzentrationen von Natrium (Na^+), Kalium (K^+) und Calcium (Ca^{2+}) maßgeblich an der Bildung des Membranpotenzials (E_m) beteiligt, wobei das Ruhepotenzial (E_m) hauptsächlich durch K^+ -Ionen bestimmt wird. Das Ruhepotenzial einer Zelle lässt sich mittels der, an die Nernst-Gleichung angelehnten Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung berechnen, die zusätzlich die relative Permeabilität eines Ions durch die Membran berücksichtigt (Goldman, 1943; Hodgkin & Katz, 1949):

$$E_m = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K \cdot [\text{K}^+]_o + P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_o + P_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_o}{P_K \cdot [\text{K}^+]_i + P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_i + P_{\text{Ca}} \cdot [\text{Ca}^{2+}]_i}$$

Betrachtet man anstelle der relativen Permeabilität eines Ions die Leitfähigkeit der einzelnen spezifischen Ionenkanäle, ergibt sich:

$$E_m = \frac{g_K \cdot E_K + g_{\text{Na}} \cdot E_{\text{Na}} + g_{\text{Ca}} \cdot E_{\text{Ca}}}{g_K + g_{\text{Na}} + g_{\text{Ca}}} = \frac{g_K}{g_{\text{tot}}} \cdot E_K + \frac{g_{\text{Na}}}{g_{\text{tot}}} \cdot E_{\text{Na}} + \frac{g_{\text{Ca}}}{g_{\text{tot}}} \cdot E_{\text{Ca}}$$

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Leitfähigkeit der Zellmembran für Na^+ und Ca^{2+} unter normalen Bedingungen weitaus kleiner ist, als für K^+ wird deutlich, dass das Ruhepotenzial hauptsächlich durch das Gleichgewichtspotenzial E_K bestimmt wird (Hille, 1992). Im Inneren einer Herzmuskelzelle liegt die Konzentration von Kalium ($[\text{K}^+]_i$) bei etwa 150 mM, außerhalb der Zelle ($[\text{K}^+]_o$) bei ca. 4 mM (Klabunde, 2011). Somit wird ein Einstrom dieser Ionen durch ihren chemischen Gradienten begünstigt. Neben Ionenpumpen, die für die Aufrechterhaltung dieser Ionenkonzentrationen verantwortlich sind, wird diese zusätzlich durch die Anwesenheit von nicht-permeablen, negativ geladenen Proteinen im Zellinneren beeinflusst. Aufgrund $[\text{K}^+]_i > [\text{K}^+]_o$ ist dieses bestrebt, dem Konzentrationsgefälle aus der Zelle heraus zu folgen. Dem chemischen Gradienten steht jedoch die dadurch generierte Potenzialdifferenz entgegen.

Dieses sogenannte Gleichgewichtspotenzial ergibt sich aus der Nernst-Gleichung und lautet für K^+ :

$$E_K = \frac{RT}{zF} \log \frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{K}^+]_i} = -96 \text{ [mV]}$$

mit der Gaskonstante R , der Temperatur in Kelvin, der Ionenwertigkeit z (für K^+ : $z = 1$) und der Faraday-Konstante F . Das Gleichgewichtspotenzial ist also das elektrische Potenzial, das notwendig ist, um K^+ an einer Diffusion ins Äußere der Zelle entlang seines Konzentrationsgradienten zu hindern. Das Ruhepotenzial einer ventrikulären Herzmuskelzelle beträgt -90 mV, welches dem Gleichgewichtspotenzial von K^+ nahekommt. Aus der Differenz der beiden Werte resultiert für K^+ eine positive elektrochemische Kraft (+6 mV), die zu einem langsamen „Durchsickern“ von K^+ aus der Zelle führt. Neben K^+ spielt Na^+ eine bedeutende Rolle in der Entstehung des E_m . Für Na^+ ergibt sich mit $[\text{Na}^+]_i = 20 \text{ mM} < [\text{Na}^+]_o = 145 \text{ mM}$ der umgekehrte Fall. Aus der Nernst-Gleichung ergibt sich ein Gleichgewichtspotenzial von $E_{\text{Na}} = +52 \text{ mV}$. Der Wert verdeutlicht, dass das Innere der Zelle theoretisch positiv geladen sein müsste, um Na^+ am Einstrom bis zum Konzentrationsausgleich zu hindern. Da das Ruhepotenzial jedoch negativ ist, ergibt sich für Na^+ eine starke elektrische Kraft (-142 mV), die es in die Zelle „zieht“. Die Membranpermeabilität für Na^+ ist jedoch so gering, dass auch hier nur ein niedriger Durchtritt in die Zelle erfolgt. Ähnlich verhält es sich mit dem Ca^{2+} . Sein Gleichgewichtspotenzial beträgt $E_{\text{Ca}} = +134 \text{ mV}$ (mit $[\text{Ca}^{2+}]_i = 100 \text{ nM} \ll [\text{Ca}^{2+}]_o = 2,5 \text{ mM}$ und $z = 2$) und die resultierende elektrochemische Kraft beläuft sich auf -224 mV. Aufgrund der geringen Membranpermeabilität ist auch sein Einstrom in die Zelle relativ gering (Klabunde, 2011).

1.1.5.2. Natrium-Kalium-ATPase

Das E_m ist auf die Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten und somit auf die Ungleichverteilung von Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle angewiesen. Dies wird durch Energie verbrauchende Ionenpumpen bewerkstelligt. Sowohl während des Ruhe- als auch des Aktionspotenzials kommt es zur Änderung der intrazellulären Ionenkonzentration für K^+ , Na^+ und Ca^{2+} . Dem wirkt unter anderem die ATP-getriebene Na^+/K^+ -ATPase entgegen. Sie befindet sich im Sarkolemma und tauscht pro ATP-Molekül drei Na^+ -Ionen aus dem Inneren der Zelle gegen zwei K^+ -Ionen aus dem Extrazellularraum aus und wirkt somit zusätzlich elektrogen, d.h. sie generiert ein negatives Potenzial, da sie dem Innenraum eine positive Ladung pro Zyklus entzieht. Im ruhenden Organismus macht sie 20-30% des gesamten ATP-Bedarfs aus (Berg et al., 2007). Sie setzt sich aus einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit zusammen. Ihre α -Untereinheit besteht aus zehn α -helikalen transmembranen und einer großen intrazellulären Domäne. Die β - und γ -Untereinheit besitzen hauptsächlich regulatorische Funktionen (Kaplan, 2002). Im Ausgangszustand ist ATP an die intrazelluläre Nukleotid-Bindestelle der α -Untereinheit gebunden. Durch Bindung von drei Na^+ an die zytosolischen Bindestellen der α -Untereinheit wird die inhärente ATPase-Aktivität der Pumpe stimuliert. Die K^+ -Bindestellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt in einem Stadium niedriger Affinität (Widmaier, Raff & Strang, 2007). Durch Hydrolyse des ATPs wird Energie auf das eingeschlossene Na^+ übertragen und dessen Ionenaktivität erhöht (Glynn & Karlsh, 1990). Nach Dissoziation des ADPs vollzieht die α -Untereinheit eine Konformationsänderung und entlässt Na^+ durch Senkung ihrer Bindeaffinität in die Extrazellularflüssigkeit. Die neue Konformation des Transporters exponiert nun die Bindestellen für K^+ an der Außenseite der Zelle und erlaubt durch erhöhte Affinität die Bindung von zwei K^+ . Dies bedingt die Abspaltung von anorganischem Phosphat (P_i), wodurch die anfängliche Konformation des Pumpen-Proteins wiederhergestellt und die Affinität zu K^+ reduziert wird. Die Bindestellen setzen K^+ ins Zytoplasma frei und der Zyklus kann von neuem beginnen (Kaplan, 2002).

1.1.5.3. Aktionspotenzial

Auch wenn die absoluten Potenzialdifferenzen recht niedrig erscheinen, generieren sie jedoch enorme elektrische Potenzialgradienten, da sie über sehr dünne Schichten wirken. Wird ein Myozyt depolarisiert, steigt ihr E_m von ursprünglich -90 mV auf +30 mV an. Die so entstandene Potenzialdifferenz wirkt über die 6 nm dünne Plasmamembran (van Meer,

Voelker & Feigenson, 2008) und generiert somit Potenzialgradienten von umgerechnet 40.000 V/mm, die groß genug sind, um die Öffnung von Ionenkanälen zu veranlassen (Katz, 2011).

Aktionspotenziale entstehen durch eine spontane Depolarisation der Zellmembran. An dieser Stelle werden das AP einer Ventrikelzelle, stellvertretend für das Arbeitsmyokard und das einer Schrittmacherzelle näher betrachtet (Abb. 1-9). Grundlegender Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist der Ursprung der für die Generierung des APs notwendigen Depolarisation. APs des Arbeitsmyokards werden durch die Depolarisation benachbarter Zellen ausgelöst, während Schrittmacherzellen in der Lage sind, diese spontan selber zu generieren. Beide Arten der APs im Herzen unterscheiden sich jedoch maßgeblich von denen in Nerven- oder Skelettmuskelzellen. So dauert das AP in einer typischen Nervenzelle gerade einmal 2 ms, in einer Skelettmuskelzelle zwischen 2-5 ms. In einer Ventrikelzelle hingegen beläuft sich die Dauer auf 200-400 ms.

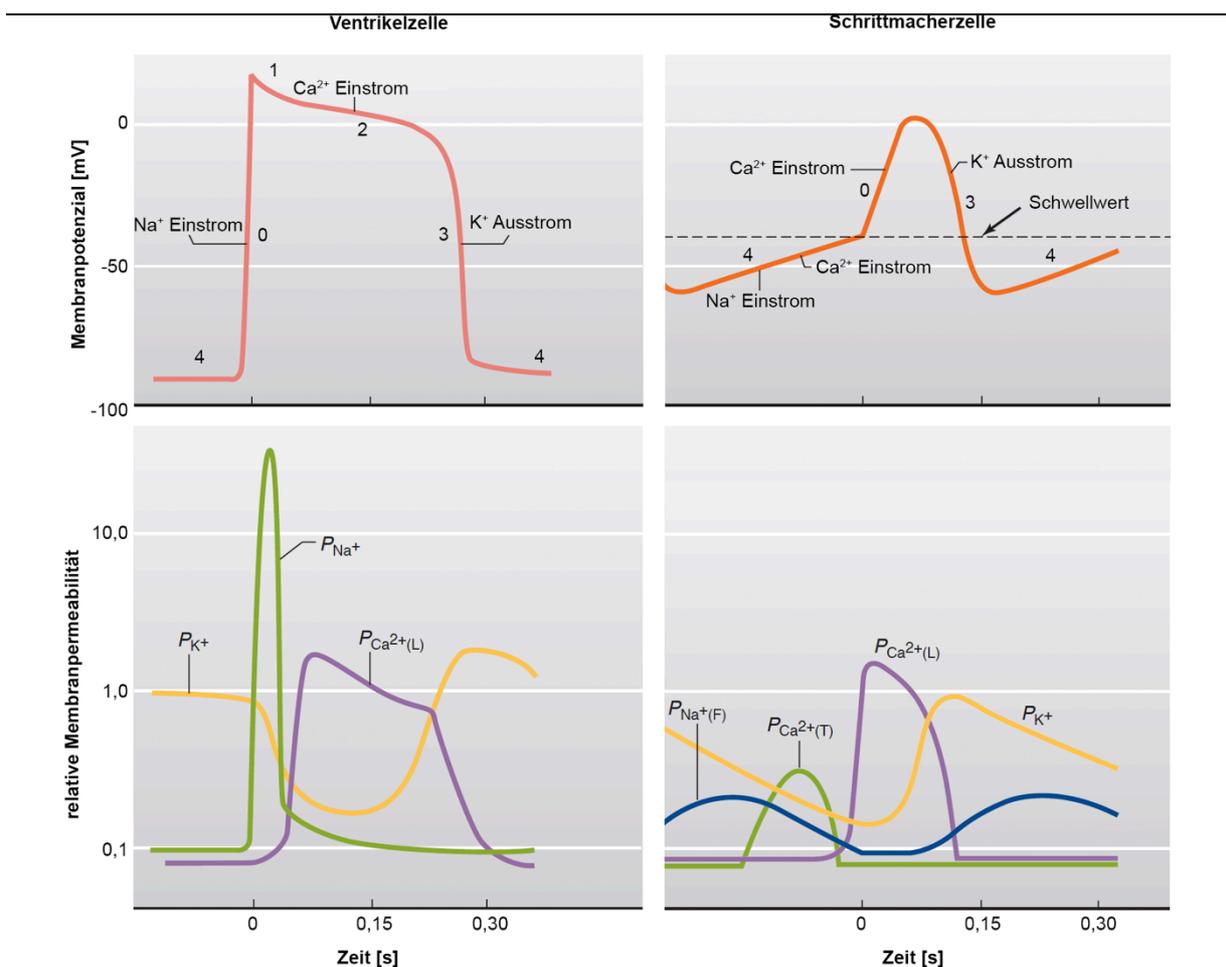


Abb. 1-9: Die Phasen des Aktionspotenzials einer ventrikulären Herzmuskelzelle und einer Schrittmacherzelle und die zugehörigen Membranpermeabilitäten (P) für Kalium (K⁺), Natrium (Na⁺) und Calcium (Ca²⁺) während des Aktionspotenzials (verändert nach Widmaier et al., 2007).

Das AP einer Ventrikelzelle lässt sich in fünf Phasen unterteilen. Sie besitzen ein „echtes“ Ruhepotenzial (Phase 4), bei dem das E_m dem E_K nahekommt. Wird die Plasmamembran einer Ventrikelzelle durch eine an sie angrenzende Zelle von -90 mV auf ca. -70 mV depolarisiert, öffnen sich zunächst spannungsgesteuerte, schnelle Na^+ -Kanäle, wodurch es zu einem vorübergehenden Einstrom von Na^+ kommt (I_{Na}). Gleichzeitig fällt die Leitfähigkeit für K^+ , das E_m steigt rapide an und nähert sich E_{Na} (Phase 0). Durch die Depolarisation werden spannungsgesteuerte Dihydropyridin-Rezeptor-assoziierte L-Typ (engl.: *long-lasting*) Ca^{2+} -Kanäle geöffnet. Es folgt eine kurze Repolarisation der Zelle, die durch das Öffnen von transienten K^+ -Kanälen und die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle hervorgerufen wird (Phase 1). Die Repolarisation wird durch den anhaltenden Ca^{2+} -Einstrom (I_{Ca}) verzögert und das AP erreicht eine Plateauphase (Phase 2). Um das AP zu beenden, werden die Ca^{2+} -Kanäle wieder geschlossen und stattdessen spezielle K^+ -Kanäle geöffnet, sodass die Leitfähigkeit für dieses Kation wieder ansteigt und das E_m durch dessen Ausstrom repolarisiert wird (Phase 3) bis es schließlich wieder das Ruhepotenzial erreicht (Huppelsberg & Walter, 2009). Während der Phasen 0 bis 3 ist das Herz nicht erregbar (Refraktärzeit). Die Refraktärzeit dient als Schutzmechanismus im Herzen, indem es die Frequenz der AP und somit der Kontraktion des Herzens limitiert. Dies verschafft dem Herzen genügend Zeit, sich mit Blut zu füllen und dieses auszuwerfen.

Schrittmacherzellen besitzen im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen kein stabiles Ruhepotenzial. Vielmehr generieren sie regelmäßig spontane APs. Diese lassen sich in drei Phasen einteilen. Zum Ende der Repolarisationsphase (Phase 3) einer Zelle öffnen sich unspezifische Kationenkanäle, die einen langsamen aber stetigen Einstrom von Na^+ gestatten und die Zelle allmählich depolarisieren. Dieser Ionenstrom wird als „*funny current*“ (I_f) bezeichnet. Sobald das E_m einen Wert von etwa -50 mV erreicht, öffnen sich die transienten Ca^{2+} -Kanäle und ermöglichen den $I_{Ca,T}$, wodurch die Zelle weiter depolarisiert wird (Phase 4). Erreicht diese langsame diastolische Spontandepolarisation den Schwellwert von ca. -40 mV, werden zusätzlich spannungsgesteuerte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle geöffnet und der nun verstärkte $I_{Ca,L}$ führt zum AP (Phase 0). Zum Ende dieser Phase nehmen I_f und $I_{Ca,T}$ ab, da sich ihre Kanäle nun wieder schließen. Durch Öffnung von K^+ -Kanälen und dem damit einhergehenden I_K wird E_m wieder repolarisiert (Phase 3). Dieser Ausstrom führt darüber hinaus zu einer Hyperpolarisation des E_m . Diese ist notwendig um die unspezifischen Ionenkanäle erneut zu öffnen und den Zyklus von Neuem beginnen zu lassen (Klabunde, 2011). Deshalb werden diese Kanäle auch *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels* (HCN) genannt (DiFrancesco, 2010).

1.1.6. Erregungs-Kontraktions-Kopplung

Für die Übersetzung eines elektrischen Impulses in eine mechanische Antwort eines Myozyts ist die „Erregungs-Kontraktionskopplung“ verantwortlich. Hierbei wird ein Myozyt durch das ankommende Aktionspotenzial depolarisiert, wodurch sich L-Typ Calciumkanäle in den T-Tubuli öffnen. Der L-Typ-Calciumkanal ist ein spannungsgesteuerter Ionenkanal, der bei einer Depolarisation der Zellmembran den RyR im SR aktiviert, was zu einem Einstrom von Calciumionen in das Zytosol der Muskelzelle führt. Diese Aktivierung erfolgt im Skelettmuskel durch direkte Proteininteraktionen, während ein extrazellulärer Calciumeinstrom keine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu wird der RyR im Herzmuskel von Calcium, das über den Dihydropyridin-Rezeptor in die Zelle eingeströmt ist, geöffnet (CICR). Hierbei wird weiteres Calcium aus dem SR ins Sarkoplasma abgegeben, wodurch die intrazelluläre Calciumkonzentration von etwa 10^{-7} auf 10^{-5} mol/l ansteigt (Klabunde, 2011). Im Ruhezustand und damit niedrigen intrazellulären Calciumkonzentration blockiert ein Komplex aus mehreren Hilfsproteinen die Bindestelle für Myosin am Aktin (siehe 1.1.4.4). Sobald der Calciumspiegel innerhalb der Zelle steigt, wird TnI durch TnC zur Loslösung vom Aktin veranlasst, wodurch TM eine Konformationsänderung vollzieht und in seine normale Position zurück gleitet. Hierdurch werden die Bindestellen am Aktin zugänglich für Myosinbindungen, die anschließend an den Aktinfilamenten entlangwandern.

In Abwesenheit von ATP binden die Myosinköpfe fest an ein Aktinfilament (Abb. 1-10). Dieser Zustand wird jedoch durch die Bindung von ATP an die konservierte ATPase-Domäne des Myosins rasch beendet. Durch eine Konformationsänderung verringert sich die Bindeaffinität des Myosins und Aktin dissoziiert. Das Nukleotid wird durch die ATPase zu ADP und P_i hydrolysiert, die weiterhin fest am Myosin gebunden bleiben. Der Myosinkopf geht in eine schräggestellte Haltung über, wodurch er sich unter der nächsten Bindestelle positioniert. Eine zunächst schwache Bindung des Myosinkopfs an seiner neuen Bindestelle bedingt die Abspaltung des P_i und gleichzeitig die feste Bindung des Kopfs an Aktin. Durch die freiwerdende Energie der ATP-Hydrolyse vollzieht der Myosinkopf nun den nötigen Arbeitshub, der das Aktinfilament um circa 11 nm zur Mitte des Sarkomers verschiebt. Im Zuge des Arbeitshubs verliert der Myosinkopf die Bindung zu seinem gebundenen ADP, wodurch er seine ursprüngliche Konformation zurück erlangt und in einen neuen Kontraktionszyklus eintreten kann (Alberts et al., 2008).

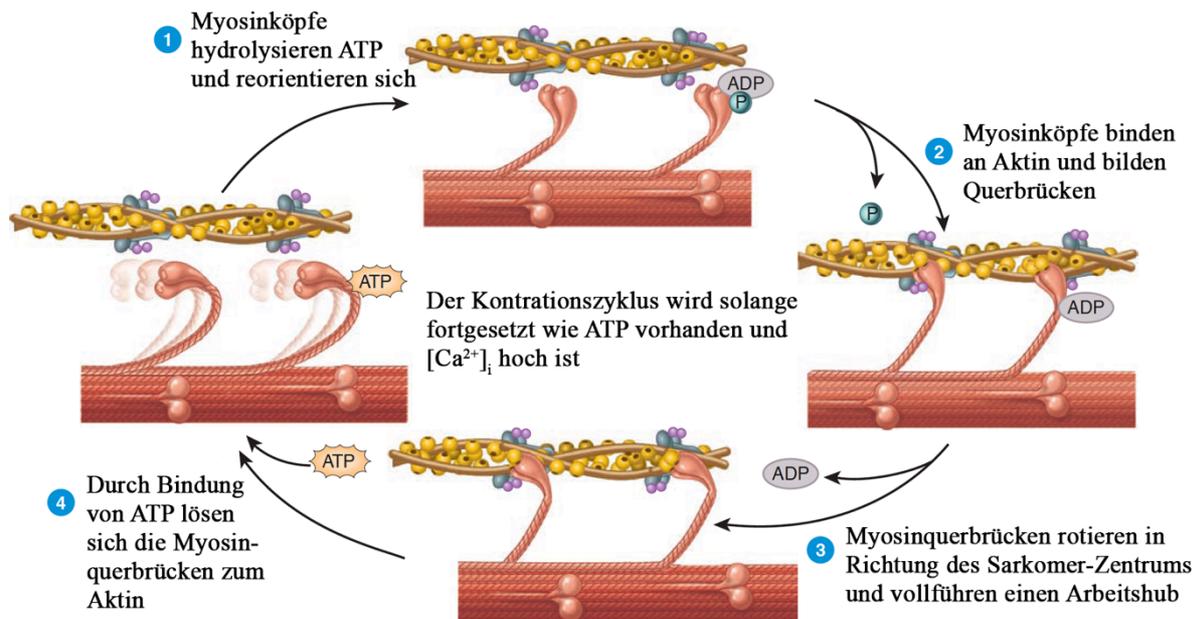


Abb. 1-10: Schematische Darstellung des Kontraktionszyklus. Durch repetitive Zyklen der Ausbildung von Querbrücken zwischen Myosin und Aktin generieren die Myofilamente einen Arbeitshub (mechanische Kraft) und die Sarkomere verkürzen sich (verändert nach Tortora & Derrickson, 2009).

1.1.7. Calciumhomöostase

Durch aktive Senkung der intrazellulären Calciumkonzentration wird die Ausgangskonformation des Tn sowie des TM wieder hergestellt, was zur Relaxation der Myofibrille führt (Rüegg, 1998). Die Erniedrigung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration erfolgt über die Aufnahme von Ca^{2+} durch SERCA-2a in das SR und durch aktiven Transport in den Extrazellulärraum über Calcium-Transporter im Sarkolemma (Woodcock & Matkovich, 2005).

1.1.7.1. Natrium-Calcium-Austauscher

Der Natrium-Calcium-Austauscher (engl.: Na^+/Ca^{2+} -exchanger, NCX) stellt mit 7 bzw. 28 prozentiger Beteiligung (Ratte bzw. Hase) nach der SERCA-2a (mit 92 bzw. 70%) den zweiwichtigsten Mechanismus zur Entfernung von Ca^{2+} aus dem Zytosol dar (Bers, 2002) und bewerkstelligt den Hauptanteil des gesamten trans-sarkolemmalen Ca^{2+} -Ausstroms (Reuter & Seitz, 1968). Dieses plasmamembranständige Transportprotein katalysiert den Antiport von Na^+ gegen Ca^{2+} . Die NCX Familie besteht aus drei Isoformen, wobei NCX1 die kardiale Isoform darstellt (Nicoll, Longoni & Philipson, 1990; Nicoll et al., 1996; Li et al., 1994). NCX bestehen aus neun transmembranen α -Helices, die durch Loop-Sequenzen miteinander verbunden sind. Zwischen der fünften und sechsten Helix befindet sich eine

große hydrophile zytoplasmatische Domäne (Nicoll et al., 1999). In NCX1 bilden die Helices 2/3 und 7/8 zusammen mit ihren jeweiligen Loops die Kationen-Bindestellen, während die intrazelluläre Domäne regulatorische Stellen besitzt, über die die Aktivität des Antiporters moduliert werden kann. So kann der Austauscher z.B. mittels Phosphorylierung durch Proteinkinase A und C aktiviert werden. NCX nutzen den durch die Na^+/K^+ -ATPase aufgebauten Na^+ -Gradienten und sind im Gegensatz zu ihr nicht direkt ATP-getrieben, hängen jedoch letztendlich von ihm ab (Schillinger et al., 2003). Er wirkt ebenso wie die Na^+/K^+ -ATPase elektrogen, da er drei Na^+ gegen ein Ca^{2+} austauscht. Die Richtung des Transports ist reversibel und hängt von den Konzentrationen der beteiligten Ionen ab. Bei einem starken Anstieg von $[\text{Na}^+]_i$ funktioniert der Austauscher in entgegengesetzte Richtung und trägt somit nicht nur Ca^{2+} -Homöostase, sondern auch zur Signalgebung bei (Egger & Niggli, 1999).

1.1.7.2. Plasmamembran Calcium-ATPase

Die Plasmamembran Calcium-ATPase (PMCA) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein und fungiert neben NCX als Ca^{2+} ausschleusendes Enzym. Anders als bei nicht-erregbaren Zellen, in denen sie der einzige Transporter für Ca^{2+} aus der Zelle heraus darstellt, trägt sie in Kardiomyozyten mit einer 10 bis 15 Mal geringeren Aktivität als NCX nur geringfügig zur Kontrolle der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei (Oceandy et al., 2007). Sie gehört zusammen mit der Na^+/K^+ -ATPase und SERCA zu den P-Typ Ionenpumpen und bezieht wie sie ihre Energie aus der Hydrolyse von ATP. Bei niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wird ihre Aktivität durch einen Abschnitt ihrer zytosolischen C-terminalen Region inhibiert. Steigt $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bildet dieses mit dem Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin einen Komplex, der durch Bindung an eine regulatorische Untereinheit der PMCA ihre Affinität für das Kation um das 20 bis 30-fache erhöht (Siegel et al., 2005).

1.2. Myokardinfarkt und Herzversagen

Koronare Herzerkrankungen sind weltweit die Todesursache Nummer 1. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation starben im Jahr 2012 17,5 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen und stellten damit 31% der globalen Sterbefälle dar (World Health Organization, 2014). Der Myokardinfarkt ist die häufigste Erscheinungsform koronarer Herzerkrankungen. Er resultiert aus zeitweisem oder anhaltendem Verschluss der Hauptkoronararterien, wodurch die Blutversorgung in bestimmten Bereichen des Herzmuskels (hauptsächlich des linken Ventrikels) drastisch abnimmt. Aufgrund seines hohen Energie- und Sauerstoffbedarfs führt bereits eine 20 minütige Blutleere (Ischämie) zu irreversiblen Schäden und ein massives Zellsterben tritt zunächst in den inneren Schichten des Herzens auf, das sich innerhalb von drei bis sechs Stunden in die äußeren Bereiche ausbreitet (Ruvinov, Sapir & Cohen, 2012). Das nekrotische Gewebe löst eine Entzündungsreaktion aus, durch die Neutrophile und Makrophagen in den Infarkt einwandern. Während das nekrotische Gewebe durch Makrophagen phagozytiert wird, wandern proliferierende Fibroblasten und Endothelzellen aus dem umliegenden Gewebe in die Wunde ein und bilden dort zur provisorischen Stütze das sogenannte Granulationsgewebe, welches über die Zeit in kollagenhaltiges Narbengewebe ummodelliert wird (Laflamme & Murry, 2005).

Der Verlust von kontraktilem Gewebe führt zur Abnahme der Pumpleistung des Herzens. Diese Änderung kann zunächst durch das erhöhte links-ventrikuläre Volumen und der damit einhergehenden erhöhten Kontraktilität des nicht-infarzierten Gewebes kompensiert werden (Frank-Starling-Mechanismus), verstärkt aber auch die mechanische Beanspruchung der Ventrikelwand (Jessup & Brozena, 2003). Dies begünstigt die fortschreitende Fehlfunktion und führt letztendlich zur chronischen Herzinsuffizienz.

1.2.1. Regeneration des Herzens

Die Kapazität des Herzens zur Regeneration von funktionalem Herzmuskelgewebe ist stark begrenzt und steht damit im Kontrast zu anderen Organen und Geweben des menschlichen Körpers. Schäden am Herzen führen häufig zu chronischem Herzversagen durch den Verlust und die unzureichende Regeneration von Kardiomyozyten. Für lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass das Herz ausschließlich aus vollends differenzierten Zellen besteht, die nicht in der Lage zur Selbsterneuerung sind. Allerdings konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, dass es auch im adulten Herzen zur Bildung neuer Kardiomyozyten kommen kann. Bergmann und Kollegen konnten für den menschlichen Organismus bis zu einem Alter von

25 Jahren eine Erneuerungsrate von 1% pro Jahr feststellen, welche bis zum 75. Lebensjahr auf 0,45% pro Jahr sinkt (Bergmann et al., 2009). Andere Studien ermittelten sogar 22% sich erneuernder Myozyten pro Jahr (Kajstura et al., 2010). Trotz der unterschiedlichen Ergebnisse weisen jedoch beide Studien im Falle eines Herzinfarkts auf eine eintretende Vermehrung des Bindegewebes (Fibrose) hin, die zu einer Ummodellierung des Herzmuskels mit einhergehendem Funktionsverlust und letztendlich zum Herzversagen führt.

Der genaue Mechanismus zur Zellerneuerung im Herzen ist noch nicht geklärt. Ein Ansatz geht davon aus, dass adulte Myozyten nach vollendeter Differenzierung wieder in den Zellzyklus einsteigen und sich teilen können. Diese Art der Zellregeneration ist für Fische und Amphibien bekannt. In Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten „de-differenzieren“, um daraufhin wieder zu proliferieren (Jopling et al., 2010). Dieser Prozess ließ sich auch in Mäusen und Ratten durch genetische Manipulation oder Behandlung mit bioaktiven Molekülen erzielen (Campa et al., 2008; Novoyatleva et al., 2010) und konnte somit zur Gewebsregeneration beitragen (Hassink et al., 2008; Bersell et al., 2009). Eine andere Art der endogenen Regeneration wird durch ortsansässige Populationen kardialer Vorläufer- oder Stammzellen ermöglicht. Pools aus Vorläufer- oder Stammzellen wurden auf Basis bestimmter Marker hinsichtlich ihres kardiomyogenen Potenzials charakterisiert (Bollini, Smart & Riley, 2011).

1.2.2. Kardiales Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein schnell wachsender wissenschaftlicher und technologischer Bereich und zielt auf die Reparatur oder den Ersatz von geschädigtem und dysfunktionalem Gewebe (Langer & Vacanti, 1993). Aufgrund der geringen intrinsischen Regenerationsfähigkeit des Herzens sind derartige Strategien von besonderem therapeutischen Interesse. Der Verlust funktionalen Gewebes führt in der Regel stets zu signifikanter und fortschreitender Verschlechterung der Kontraktionsfähigkeit des Herzens und bedingt letztendlich die Entwicklung lebensbedrohlicher Gesundheitszustände. Insbesondere der Mangel an Spendern und Transplantaten, aber auch sonstiger Therapiemethoden zur Kompensation des geschädigten Herzmuskels verdeutlichen die Schärfe von Herzerkrankungen im Gesundheitswesen.

In den vergangenen zehn Jahren wurden im Bereich der kardialen Gewebszüchtung verschiedene Strategien entwickelt, die auf Basis von Kombinationen aus Zellen, biokompatiblen Materialien und bioaktiven Molekülen beruhen (Vunjak-Novakovic et al.,

2011). Ein Ansatz befasst sich mit der Entwicklung und Applikation zellfreier biokompatibler, zum Teil injizierbarer Biomaterialien (z.B. Hydrogelen), die zum Beispiel als strukturelle Stütze oder Füllmaterial für Wunden dienen sollen, um den durch Bildung von Narbengewebe bedingten Umbau des Herzmuskels entgegenzuwirken (Singelyn & Christman, 2010; Tous et al., 2011). Diese Biomaterialien sollen darüber hinaus als Vehikel fungieren, die den Transport und langfristigen Verbleib embryonaler beziehungsweise adulter Spenderzellen in einer für sie vorteilhaften Mikroumgebung im infarzierten Empfängergewebe ermöglichen (Martinez & Kofidis, 2011; Nunes et al., 2011; Segers & Lee, 2011).

Die zweite Strategie beinhaltet die *in vitro* Generierung kardialer Mikrogewebe (Vunjak-Novakovic et al., 2011; Ye & Black, 2011). Hierbei werden kardiale Zellen zunächst unter kontrollierten Wachstumsbedingungen kultiviert (z.B. in Perfusionsbioreaktoren) und die Gewebsbildung durch physikalische oder biochemische Stimulanzen begünstigt. Nach vollendeter Maturierung soll das gewonnene Gewebe schließlich auf beschädigtes Myokardgewebe implantiert werden, um dieses zu stützen oder gar zu ersetzen.

Ein dritter Ansatz befasst sich mit einer Kombination aus Biomaterialien und bioaktiven Komponenten zur lokalisierten und kontrollierten Wirkstofffreisetzung (Segers & Lee, 2007; Ruvinov, Harel-Adar & Cohen, 2011). Diese Kombination soll die Vorteile einer mechanischen Stützfunktion aus dem ersten Ansatz mit gleichzeitiger Freisetzung von Therapeutika, die bisher eventuell noch unbekannte Selbstheilungsprozesse begünstigen, miteinander vereinen. Der technologische Fortschritt im Bereich des kardialen *Tissue Engineerings* ist nur durch die intensive interdisziplinäre Zusammenarbeit verschiedener Wissenschaftsbereiche möglich. Dazu gehören vor allem die Biomedizin, Bioingenieurwesen und die Zellbiologie. In den kommenden Jahren werden Zellreprogrammierung und die Verwendung humaner pluripotenter Stammzellen unverzichtbare Schlüsseltechnologien für den Erkenntnistransfer aus den Tiermodellen der Grundlagenforschung in die klinische Anwendung darstellen (Burrige et al., 2012). Wichtige Erfolge lassen sich bereits heute z.B. in den Ingenieurwissenschaften verzeichnen, die zur Entwicklung von mittlerweile unverzichtbar gewordenen Perfusionsbioreaktoren geführt haben, in denen optimale Wachstumsbedingungen für *in vitro* generiertes Herzgewebe herrschen (Radisic et al., 2008; Diamantouros et al., 2013). Fortschritte in der Nanotechnologie führten zu Verfahren der mikro- bis nanoskopisch genauen Oberflächenstrukturierung oder -Beschichtung zur Generierung definierter bzw. anisotroper Wachstumsmuster sowie vieler weiterer Verfahren (Kelleher & Vacanti, 2010; Dvir et al., 2011; Zhang et al., 2011b). In Kombination mit den

Materialwissenschaften, die Biomaterialien beschreiben und optimieren, werden sich in Zukunft maßgeschneiderte Wachstumsmatrizen generieren lassen, die Zellen hinsichtlich ihrer mechanischen und biochemischen Eigenschaften eine naturnahe Mikroumgebung bieten können (Davis et al., 2005; Ma, 2008; Lutolf, Gilbert & Blau, 2009). Das Hauptkriterium funktionaler Herzmuskelgewebe ist die Fähigkeit der Signalweiterleitung und die Kopplung zwischen Reiz und Kontraktion. Untersuchungsmethoden der Biophysik – darin eingeschlossen Elektrophysiologie und modernste bildgebende Verfahren – ermöglichen eine immer genauere und mehrdimensionale Charakterisierung elektrischer und mechanischer Eigenschaften des künstlich generierten Gewebes (z.B. Patch-Clamp, Calcium Imaging, Zellkraftmessungen, AFM, usw.). Um die damit einhergehend zunehmende Komplexität erhobener Daten zu bewältigen, bedarf es Ansätze aus der Bioinformatik. Die Verwendung von *in silico* Modellen stellt in den Ingenieurwissenschaften einen gängigen Ansatz dar. Basierend auf physikalischen, mechanischen und (bio-)chemischen Gesetzmäßigkeiten und empirisch erhobenen Daten, werden diese Modelle dazu herangezogen kosten- und zeitintensive Versuche durch Simulationen zu ersetzen und/oder durch neue Erkenntnisse zu erweitern (Olivares & Lacroix, 2013).

1.3. Ziele dieser Arbeit

Die Erhaltung sowie die Wiederherstellung von Funktionen spezialisierter Gewebe setzt das Verständnis der Einzelkomponenten voraus. So trägt jede Zelle mit ihrer Funktion zu der eines multizellulären Gesamtorganismus bei. Der Mechanismus der elektro-chemischen und mechanischen Kopplung kardialer Myozyten ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die Schnittstelle dieser beiden Prozesse bildet die Erregungs-Kontraktionskopplung. Sie ermöglicht die Übersetzung chemischer in mechanische Signale und veranlasst Herzmuskelzellen nach Überschreitung einer Reizschwelle zur Kontraktion. Die notwendigen elektrischen Impulse werden im adulten Herzen im Schrittmacherzentrum des rechten Vorhofs generiert. In embryonalem Herzmuskelgewebe besitzen, je nach Entwicklungsstadium, nahezu alle Zellen die Fähigkeit zur spontanen Kontraktion. Dies macht sie zu attraktiven Modellsystemen für die Untersuchung zellmechanischer Prozesse.

Eine Reihe von Studien konnten zeigen, dass das Signal- und Kontraktionsverhalten kardialer Myozyten auf Einzelzellebene neben ihrer molekularen Zusammensetzung auch durch die Zellarchitektur mitbestimmt wird.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher die zeitliche Abfolge des elektro-chemischen Signals in Form des Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration und der mechanischen Zellantwort in Form der Zellkontraktion während der Erregungs-Kontraktionskopplung auf Einzelebene zu untersuchen und mit Hilfe einer neu etablierten Zellstrukturanalyse mit der Orientierung und Ordnung zytoskelettaler Komponenten in Zusammenhang zu bringen. Im Anschluss sollte überprüft werden, inwiefern sich die zeitliche Abfolge der beiden Ereignisse beeinflussen ließ. Dazu wurden Zellen auf elastischen Analysesubstraten mittels definierter Substratconditionierung in unterschiedliche Zellformen gebracht, um deren zytoskelettale Vorzugsrichtung zu kontrollieren. Zusätzlich wurde untersucht wie sich die mit der Zellform einhergehenden Orientierungen der Myofibrillen auf die Kontraktionskraft der Einzelzellen auswirkte. Schließlich sollte der dem unterschiedlichen Signalverhalten zugrundeliegende Mechanismus bestimmt werden.

Trotz der bisher geleisteten Aufklärung zellulärer Prozesse auf Einzelzellebene sind derartige Systeme hochartifizuell und geben nur bedingt die physiologischen Bedingungen im Organismus wieder. Daher sollte überprüft werden, inwiefern sich das analysierte Signalverhalten von Einzelzellen während der Erregungs-Kontraktionskopplung in mehrzelligen Systemen manifestierte und welche Rolle dabei unterschiedliche Gewebegeometrien und Zellpopulationen spielten. Dazu wurden Zellverbände definierter Größe und Form aufgebaut und zusätzlich in ihrer zellulären Zusammensetzung variiert.

Diese sogenannten Mikrogewebe wurden anschließend mit den auf Einzelzellebene etablierten Analyseverfahren untersucht. Um Mikrogewebe ausschließlich aus hochreinen Kardiomyozyten des Gesamtmyokards bzw. bestimmten Bereichen des Herzens aufbauen zu können, mussten zusätzlich Aufreinigungsverfahren entwickelt werden, die eine weitergehende Analyse erlaubten. Zur Bestimmung des Reinheitsgehaltes des so erhaltenen Zellmaterials wurde aufgrund fehlender Zelloberflächenmarker ein automatisiertes fluoreszenzmikroskopisches Analyseverfahren mit Software-gestützter Zellzählroutine als Alternative zu durchflusszytometrischen Bestimmung entwickelt.

In einem letzten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern sich humane induziert-pluripotente Stammzellen-abgeleitete Kardiomyozyten von den Primärzellen tierischen Ursprungs hinsichtlich ihres Signalverhaltens unterscheiden und ob sie sich mit Hilfe der hier verwendeten Methoden hinsichtlich ihres Kontraktionsverhaltens näher charakterisieren ließen.

Die Gesamtheit der Daten sollte so einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Erregungs-Kontraktionskopplung von Kardiomyozyten liefern und auf Basis zellkulturbasierter Systeme helfen eine funktionelle Charakterisierung therapierelevanter Zellsysteme vornehmen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellisolation primärer kardialer Myozyten aus der Ratte

Zur Isolation von Myozyten wurde eine 18-19 Tage trächtige Ratte (Wistar, Charles River, Sulzfeld) mit CO₂ betäubt und dekapitiert. Das Bauchfell wurde entfernt, der Bauchraum geöffnet und der Uterus mit den Embryonen entnommen und auf Eis gelagert. Die nun folgenden Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Embryonen wurden einzeln aus dem Embryosack isoliert und in einer Zellkulturschale, gefüllt mit kalten Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma), auf Eis gelagert. Durch Dekapitation wurden die Embryonen getötet und der Thorax geöffnet. Mit einer Pinzette wurden Herz und Lunge zusammenhängend aus dem Thorax entnommen. Die gleichzeitige Entnahme beider Organe stellte sicher, dass die Vorhöfe des Herzens nicht abrissen. Die Herzen mit anhängender Lunge wurden in eine frische Zellkulturschale mit HBSS gegeben und das Lungengewebe sowie der Herzbeutel wurden unter einem Stereomikroskop vorsichtig entfernt. Die Herzen, bestehend aus Haupt- und Vorkammern, wurden in 15 ml eiskaltem HBSS gesammelt und in 15 ml neues eiskaltes HBSS überführt und gewaschen (8-12 Herzen). Das gesammelte Gewebe wurde in eine Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser gegeben und das restliche HBSS entfernt. Die Herzen wurden mit zwei sterilen Skalpellenspitzen in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert, in 8 ml Trypsin-EDTA-TE (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA-Lösung in HBSS, Sigma) überführt und 8 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei sedimentierten die Gewebeteile und konnten vom Überstand getrennt werden. Der Überstand wurde verworfen. Die Gewebeteile wurden 2 min mit 100 µl DNase (10.000 Units/ml, Sigma) behandelt und in 6 ml frisches Trypsin-EDTA (TE) überführt. Nach 8 min Inkubation bei 37°C wurden wiederum der Überstand und die noch nicht verdauten Gewebebrocken getrennt. Nun wurde der Überstand (dieser enthält die Myozyten) mit 7 ml Blockierlösung (33% FBS-Lösung, fetal bovine serum, Biochrom) versetzt und auf Eis gelagert, um die Trypsinierung zu stoppen. Zur vollständigen Auftrennung des Gewebes wurde dieses ein zweites und drittes Mal für 2 min mit 100 µl DNase behandelt und ein zweites und drittes Mal mit 6 ml TE für 8 min bei 37°C verdaut. Der Überstand wurde abgenommen und mit 7 ml Blockierlösung versetzt. Beide Blockierlösungen mit der Zellsuspension aus dem zweiten und dritten Verdau wurden 10 min bei 4°C und 200 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die beiden

Sedimente wurden in je 500 µl kaltem Kulturmedium resuspendiert und vereinigt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines automatisierten Zellzählgeräts (MoxiZ, Orflo) bestimmt und 20.000-40.000 Zellen auf zuvor vorbereitete PDMS-Substrate in Zellkulturschalen ausgesät. Als Nährlösung wurde F10 Ham's Medium (Sigma) mit 10% FBS (Biochrom), 1:100 Verdünnung der Antibiotikallösungen (10.000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin in 0,9% NaCl, Sigma) und 1:200 Verdünnung von Insulin (1 mg/ml) - Transferrin (0,55 mg/ml) - Sodium Selenit (0,5 µg/ml) (ITS liquid media supplement, 100-fach, Sigma) verwendet. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C in einem befeuchteten Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Zellen vorsichtig gewaschen, um nicht adhärenzte Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

2.1.2. Gewebespezifische Trennung

Wie bereits eingangs beschrieben, unterscheiden sich im speziellen Fall des Herzens Zellen aus den unterschiedlichen Regionen des Organs grundlegend in ihrer Funktion. Je nach Fragestellung war es daher notwendig, Zellen eines bestimmten Gewebeabschnitts separat zu analysieren. Nach Entnahme der embryonalen Herzen wurden Vorhöfe und Hauptkammern unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops und gebogenen Feinpinzetten mechanisch voneinander getrennt. Zum Zeitpunkt der Zellisolation sind diese beiden Regionen des Herzens noch nicht vollständig miteinander verwachsen. Vielmehr liegen die Vorhöfe als lappenartige Fortsätze auf den Hauptkammern auf und ließen sich somit auf Höhe der Atrioventrikularklappen von diesen trennen. Aufgrund ihrer geringen Größe wurden die gesammelten Vorhöfe in 2 ml Reaktionsgefäßen überführt und die separierten Gewebstypen dann getrennt voneinander weiter verarbeitet (siehe 2.1.1).

2.1.3. Zellspezifische Trennung

Neben der gewebsspezifischen Trennung von Zellen wurde in dieser Arbeit von einer im Institut entwickelten Technik zur Anreicherung von Kardiomyozyten aus einer primären Mischkultur Gebrauch gemacht (Hoffmann et al., 2014). Diese Technik basiert auf einer Zelltyp-spezifischen Modifikation der Plasmamembran lebender Zellen. Hierbei fusionieren funktionalisierte Vesikel (sogenannte „fusogene Liposomen“, FLs) mit der Plasmamembran der Zielzelle. Diese FLs bestehen zu definierten Teilen aus neutralen und kationischen Lipiden. Ein geringer Teil der neutralen Phospholipide (PLs) trägt eine Biotingruppe, die nach

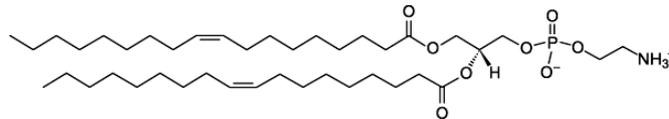
Interkalation in die Plasmamembran lebender Zellen an der Oberfläche exponiert sind und über an Eisenoxidpartikel gekoppelte Anti-Biotin Antikörper gebunden werden können. Diese Zell-Partikel-Konjugate ließen sich dann in einem Magnetfeld von unmarkierten Zellen trennen (Abb. 2-1).

Lipide

1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin

(DOPE)

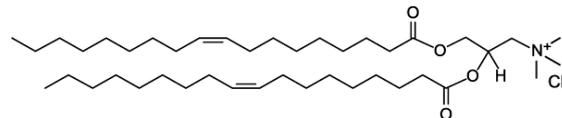
M = 744 g/mol



1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan, Chlorid Salz

(DOTAP)

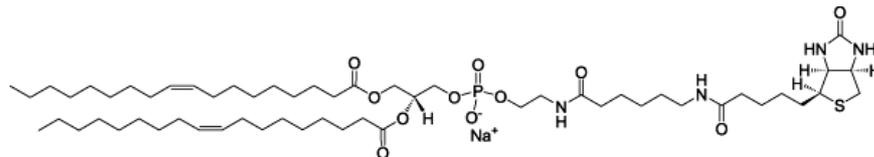
M = 698 g/mol



1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin-N-(cap biotiny), Natrium Salz

(Biotin-DOPE)

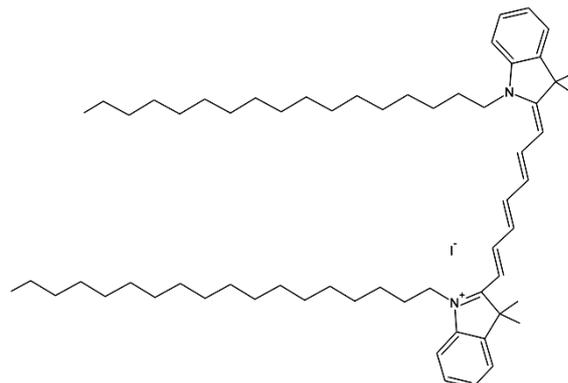
M = 1105 g/mol



1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarboyanin Iodid

(DiR')

M = 1013 g/mol



2.1.4. Herstellung fusogener Liposomen

Die Stammlösungen des neutralen Lipids DOPE (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA), des kationischen Lipids DOTAP (Gegenion: Chlorid; Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA), des fluoreszierenden lipophilen Markermoleküls DiR (Life Technologies, Eugene, OR, USA) und Biotin-DOPE wurden zunächst in einem Chloroform/Ethanol Gemisch (Mischverhältnis 10/1) gelöst und anschließend in einem molaren Verhältnis von DOPE/DOTAP/DiR/Biotin-DOPE 1/1/0,05/0,1 gemischt. Nach vorsichtiger Homogenisierung des Gemischs wurden die Anteile der organischen Lösemittel unter Vakuum für 30 Minuten verdampft. Die Lipide wurden daraufhin in 20 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) Puffer (pH 7,4; VWR, Darmstadt) verdünnt und auf eine Endkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Die Lösung wurde schließlich durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren für 2 Minuten gemischt und für 20 Minuten in einem Ultraschallbad homogenisiert. Die FL-Lösung ließ sich bei 4°C bis zu drei Monaten vor Gebrauch lagern.

2.1.5. Aufreinigung kardialer Myozyten mittels fusogener Liposomen

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Generierung multizellulärer Cluster eine möglichst reine Myozytenkultur benötigt. Dazu wurden $1-3 \times 10^6$ Zelle der Mischkultur frisch isolierter Primärzellen aus embryonalen Rattenherzen (2.1.1) für exakt eine Minute mit 10 μ l biotinylierter FLs in 1 ml 1x PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit fusionierten hauptsächlich Nicht-Myozyten. Nach erfolgter Biotinylierung wurde die Fusionsreaktion durch Zugabe von 9 ml 1x PBS gestoppt und die Zellen anschließend bei 600 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 20 μ l Anti-Biotin Magnetkugeln (Miltenyi, Bergisch Gladbach) in 1 ml MM^+ für 20 min bei 4°C unter ständiger Mischung auf einem Drehrad inkubiert. Nach Konjugation der Biotin-markierten Zellen mit Magnetkugeln wurden ungebundene Partikel aus der Lösung gewaschen. Dazu wurde 1 ml MM^+ in die Zellsuspension gegeben und die Lösung ein weiteres Mal bei 300 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Zeitgleich wurde die Trennsäule (MiniMACS, Miltenyi, Bergisch Gladbach) gemäß Abb. 2-1 aufgebaut und mit 1 ml Kulturmedium äquilibriert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml MM^+ resuspendiert und auf die eingespannte Trennsäule gegeben. Nach maximal 10 min hat die gesamte Suspension die Säule passiert und diese wurde mit einem weiteren Milliliter Kulturmedium gewaschen. Hierbei wurden alle unmarkierten Zellen aus der Säule gewaschen

und in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Im Eluat befanden sich die unmarkierten Kardiomyozyten, die markierten Zellen verblieben aufgrund der magnetischen Wechselwirkungen als Retentat in der Säule. Letzteres konnte durch Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und Zugabe von 2 ml Kulturmedium ebenfalls eluiert werden und anschließend auf verschiedene Analysesubstrate ausgebracht und je nach Versuch für mehrere Tage kultiviert werden.

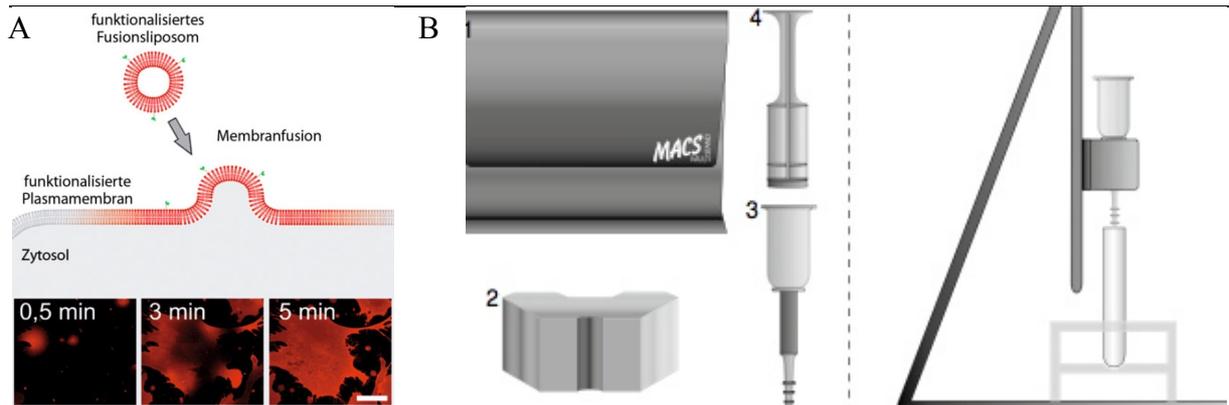


Abb. 2-1: (A) Schematische Darstellung des Fusionsprozesses zwischen einem funktionalisierten Lipidvesikel und der Plasmamembran. Nach Kontakt mit der Zellmembran fusionieren die FIs spontan und integrieren ihre funktionellen Seitengruppen in die Zellmembran. Die unteren Aufnahmen zeigen den rapiden zeitlichen Verlauf der Membranfärbung von kardialen Fibroblasten durch Einlagerung fluoreszenzmarkierter Phospholipide. Maßstab: 50 μm , (verändert nach Hoffmann et al. 2014). (B) Komponenten des MiniMACS Systems: 1) Metallgestell, 2) Magnet, 3) MS Column (Trennsäule), 4) Stempel (Miltenyi, Bergisch Gladbach).

2.1.6. Wachstumsbedingungen

Myozyten wachsen adhärent und wurden bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigt feuchter Atmosphäre im Begasungsbrutschrank kultiviert. Für kardiale Myozyten wurde spezielles Myozytenmedium (F10 Ham's Medium, Sigma) verwendet. Es wurden jeweils Zellzahlen im Bereich von 20.000-40.000 für Einzelzellanalysen und 80.000-100.000 für Mehrzellsysteme auf selbst hergestellten Substraten mit und ohne Mikrostruktur verschiedener Elastizität ausgesät. Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten und nicht adhärierte Zellen zu entfernen, wurde das Medium am ersten Tag nach der Zellisolation komplett ausgetauscht und danach alle zwei Tage gegen frisches Medium erneuert.

2.2. Herstellung der Analysesubstrate

Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein Silikonkautschuk und diente als Material zur Herstellung von elastischen Substraten. Hierbei handelt es sich um ein transparentes farbloses Polymer, welches sich durch seine Biokompatibilität hervorragend für zellbiologische Fragestellungen eignet. Alle zur Analyse verwendeten Substrate wurden im Institut hergestellt. Das benutzte Zwei-Komponenten-System von Dow Corning (Sylgard 184) bestand aus einer Vinyl-terminierten Polydimethylsiloxan Basissubstanz (Abb. 2-2A) und einem Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan Copolymer als Kreuzvernetzer (Abb. 2-2B). Je nach Mischungsverhältnis der Komponenten ließen sich unterschiedliche Substratelastizitäten generieren. Der im Basisöl enthaltene Platin-basierte Katalysator führte zur organo-metallischen Kreuzvernetzungsreaktion (Ojima, 1989) (Abb. 2-2C). Die Mischverhältnisse der beiden Komponenten wurden in Abhängigkeit der Anwendung variiert. Eine Erhöhung des Kreuzvernetzeranteils führte am Ende zu steiferen Substraten. Die während des Mischvorgangs eingetragenen Luftblasen wurden mittels eines Entgasungsschritts in einem Exsikkator unter Unterdruck (2×10^{-3} mbar) entfernt, da diese die Transparenz des Substrats und dadurch die Bildqualität der Analysedaten negativ beeinträchtigt hätten. Unmittelbar danach wurde das Gemisch zur Herstellung verschiedener Substrate eingesetzt.

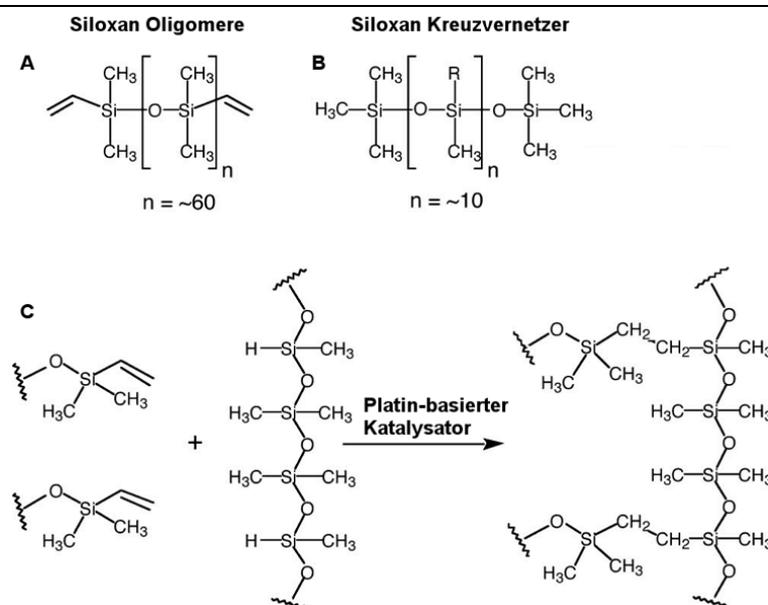


Abb. 2-2: Kreuzvernetzungsreaktion von PDMS, (Campbell et al., 1999), organischer Rest (R) entweder CH_3 oder H.

Um chargenabhängige Schwankungen zu minimieren, wurden die verwendeten Chargen hinsichtlich ihrer mechanischen Eigenschaften regelmäßig durch Nico Hampe (ICS-7, Forschungszentrum Jülich) charakterisiert (Cesa et al., 2007).

2.2.1. Herstellung von Glassubstraten

Alle bildgebenden Analysen wurden an inversen Mikroskopen durchgeführt. Die verwendeten Objektive wiesen unter anderem eine optische Korrektur für Schichtdicken von 170 μm auf. Um eine bestmögliche Bildgebung zu ermöglichen wurden die Böden der Zellkultursubstrate für das jeweilige optische System optimiert. Dazu wurden unter anderem Deckgläser mit einer Dicke von 160-190 μm (20 x 20 mm, Typ #1,5, Menzel-Gläser) in Lochbodenschalen eingeklebt. Zum Einkleben wurde eine 10 zu 1 PDMS-Mischung (Basisöl zu Kreuzvernetzer) verwendet. Die so hergestellten Schalen wurden daraufhin für 2 Stunden bei 60°C ausgeheizt, um die Kreuzvernetzungsreaktion zu beschleunigen.

2.2.2. Herstellung elastischer Substrate ohne Mikrostruktur

Für die Kultivierung von Zellen auf 15 kPa steifen unstrukturierten Substraten wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Grundsubstanz und Kreuzvernetzer hergestellt, kurz entgast und anschließend auf 55-80 μm dicken Deckgläsern (20 x 20 mm, Typ #00, Menzel-Gläser) durch Rotationsbeschichtung dünn aufgebracht. Dazu wurde das Deckglas zunächst auf dem Drehteller mittels Vakuumanasugung zentral fixiert und ein Tropfen nicht-kreuzvernetzten Silikons bei 1.800 Umdrehungen pro Minute für 30 Sekunden homogen verteilt (SpinCoater delta 10TT; SÜSS microtec). Bei Schichtdicken unter 80 μm ist zu beachten, dass die Elastizität des Silikonkautschuks durch Wechselwirkungen mit der darunter liegenden harten Oberfläche beeinflusst wird und von der tatsächlichen abweicht. Die so entstandenen Silikonsubstrate erreichten dabei reproduzierbar eine Dicke von circa 100 μm und konnten direkt in 3,5 cm Lochschalen eingeklebt werden und wurden anschließend bei 60°C kreuzvernetzt.

2.2.3. Herstellung elastischer Substrate mit geordneter Mikrostruktur und fluoreszierenden Mikrokugeln

Die bereits beschriebene Herstellung kreuzvernetzter elastischer Silikonkautschuk-Substrate mit geordneter Mikrostruktur wurde durch den Einbau fluoreszierender Kugeln modifiziert, um die durch die Zellen hervorgerufene Deformation des elastischen Untergrunds mit hoher Auflösung messen zu können (Cesa et al., 2007).

Hierzu wurden fluoreszierende Kugeln („FluoSpheres Crimson Carboxylate-Modified beads“, Molecular Probes, Eugene OR, USA) mit einem Durchmesser von 200 nm verwendet. Zur Herstellung eines mit fluoreszierenden Kugeln markiertem Elastomer-Substrats wurden 1 µl einer 2%igen Kugelsuspension für 7 min bei 4°C und 13.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 10 µl Silikonkautschuk-Gemisch für 10 min mit einem Plastikspatel vermischt. Diese noch nicht kreuzvernetzten Mischungen wurden auf eine mikrostrukturierte Silizium-Gussform aufgestrichen. Diese Form wies quadratische Erhebungen auf, die in einem regelmäßigen Quadratgitter angeordnet waren. Die Gitterkonstante betrug 3,5 µm; die Erhebungen hatten eine Kantenlänge von 2,5 µm und eine Höhe von 500 nm. Um eine bessere Verteilung der Kugeln auf der Probe zu erreichen, wurde das Gemisch mit einem staubfreien Papiertuch in die Mikrostruktur der Siliziummaske eingerieben und überschüssiges Silikon abgenommen. Nachfolgend wurde ein Tropfen der Reaktionsmischung (Verhältnis Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer 50 zu 1 entspricht 15 kPa, identisch zum Gemisch mit Kugeln) ohne fluoreszierende Kugeln auf die Gussform gegeben und ein 80 µm dickes Deckglas auf diese gelegt, wodurch eine gleichmäßige Verteilung des Silikons erreicht wurde. Durch 80 µm dicke Abstandhalter zwischen Deckglas und Gussform (Abb. 2-3) und zusätzlicher Fixierung wurde nach der Kreuzvernetzungsreaktion für 18 Stunden bei 60°C (Wärmeschrank UE400, Memmert) eine 80 µm dicke Silikonkautschuk-Schicht mit fluoreszierenden Kugeln in einer dünnen Oberflächenschicht erzeugt. Im Anschluss wurde das kreuzvernetzte PDMS mittels Isopropanol vorsichtig von der Siliziummaske getrennt und die Abstandhalter vom Deckglas entfernt. Auf dem Deckglas blieb die in Silikonkautschuk abgeformte Mikrostruktur der Siliziummaske mit eingelassenen Fluoreszenzkugeln zurück. Die Deckgläser wurden in Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm) mit eingefasstem Loch (Ø 1,8 cm) von unten mit einer 10 zu 1 Silikonkautschuk-Mischung eingeklebt.

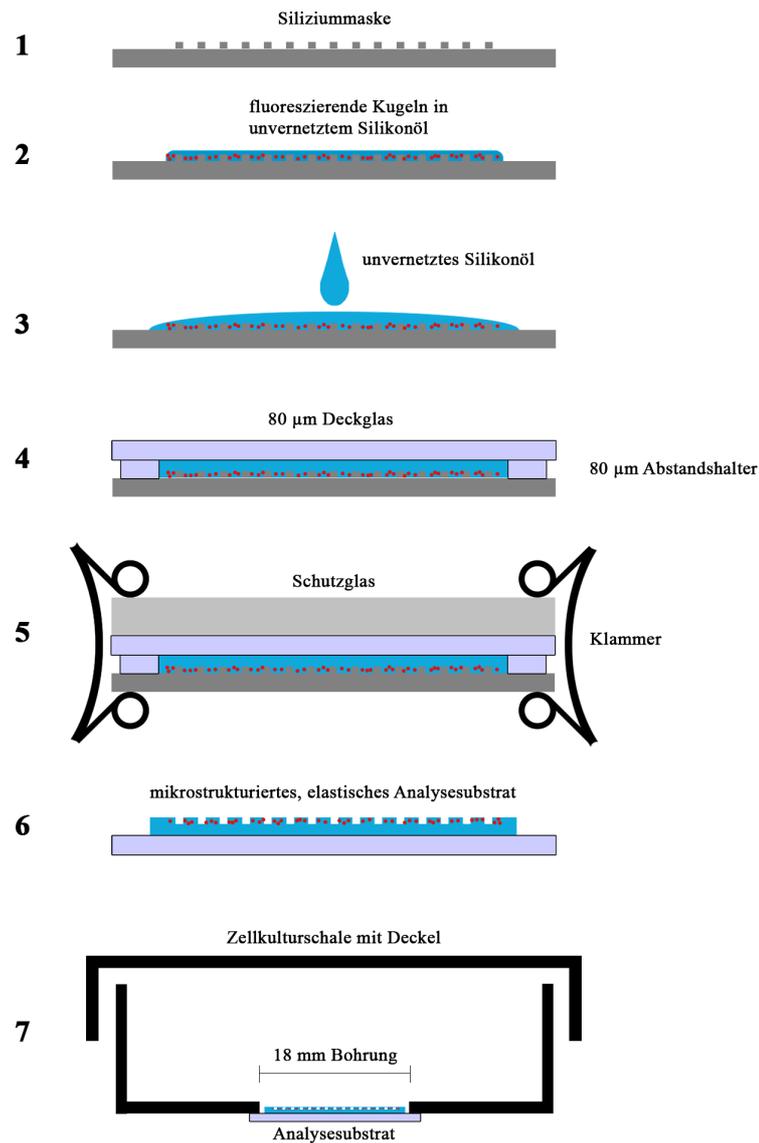


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses mikrostrukturierter, elastischer Analysesubstrate zur Untersuchung der durch die Kontraktion von Muskelzellen hervorgerufenen Substratdeformationen. (1) Ein mikrostrukturierter Silizium-Wafer diente als Vorlage für das Substrat. (2) Auf dieser Matrize wurde ein dünner Film aus unvernetztem Silikonöl (Basisöl zu Kreuzvernetzer im Verhältnis 50 zu 1) mit eingemischten fluoreszierenden Kugeln (200 nm) aufgetragen. (3) Anschließend wurde ein Tropfen des unnetzten Silikonöl-Gemischs auf der Siliziummaske verteilt. (4) Durch Auflegen von zwei Abstandshaltern und einem Deckglas wurde eine definierte Schichtdicke des Silikonöls von 80 µm erreicht. (5) Zusätzlich wurde ein dickeres Glas durch zwei seitlich angebrachte Klammern auf dem Stapel fixiert. (6) Der Kreuzvernetzungsprozess erfolgte für 18 Stunden bei 60°C und lieferte nach Auseinanderbau das fertige Analysesubstrat, welche schließlich in eine Zellkulturschale mit Bohrung eingeklebt wurde (7).

2.3. Substratkonditionierung

2.3.1. Herstellung von Stempeln und Lochfolien

Zur Erzeugung definierter Adhäsionsbereiche auf den verwendeten elastischen Analysesubstraten wurden mikrostrukturierte Lochfolien aus Epoxidharz hergestellt (Hampe et al., 2014). Dazu wurden zunächst verschiedene Masken mittels fotolithographischer Techniken in Siliziumscheiben abgebildet. Alle Reinraumarbeiten wurden von Herrn Nico Hampe (ICS-7, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Von den so erstellten Masken wurden Negativabgüsse in Form von Silikonstempeln erzeugt. Die Unterseite von 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden abgeschnitten und die so erhaltenen Hohlzylinder wurden mit ihrer flachen Seite auf die mikrostrukturierten Bereiche der Siliziummaske platziert und mit unvernetztem Silikongemisch (10 zu 1) gefüllt. Nach 30 minütiger Kreuzvernetzungsreaktion bei 60°C konnten die ausgehärteten Silikonstempel vorsichtig von den Siliziumscheiben entfernt und aus den Reaktionsgefäßen gelöst werden. Für die Herstellung von Epoxidharzfolien wurden diese Stempel auf einen mit Tesafilm beklebten Objektträger gestellt und mit einem UV-härtenden Epoxidharzkleber unterschichtet (EPO-TEK UVO-114, Epoxy Technology, Billerica, MA, USA). Dazu wurde ein Tropfen des Klebers an der Kante des Stempels platziert, welcher durch Kapillarkräfte die in den Stempel übertragenen Mikrostrukturen umfließen und vollständig einschließen konnte. Die Verwendung von handelsüblichem transparenten Klebeband (Tesa) beschleunigte nicht nur das Fließverhalten des Klebers, sondern erleichterte auch das Ablösen der Folie und stellte zudem eine einfache, ungefährliche und kostengünstige Alternative zum ursprünglichen Verfahren dar, welches im Institut entwickelt wurde (Hampe et al., 2014). Dabei wurden Stempel und Objektträger durch Bedampfen mit Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silan modifiziert, um adhäsive Wechselwirkungen zwischen Epoxidharz und PDMS Stempel bzw. Harz und Glasoberfläche zu minimieren und das Ablösen nach Aushärtung zu ermöglichen. Nach Applikation des Epoxidklebers wurden die Stempel mit ca. 30 g beschwert und nach vollständiger Unterschichtung auf einen UV-Tisch (ELX-FI5M; Vilber Lourmant, Marne Le Vallee, Frankreich) gestellt und bei einer Leistung von 200 W und einer Wellenlänge von 365 nm für 40 min bestrahlt (Abb. 2-4).

2.3.2. Fibronektinbeschichtung von Elastomersubstraten

Die kreuzvernetzten PDMS-Substrate wurden vor der Zellaussaat mit dem Glykoprotein Fibronektin beschichtet. Dazu wurden 2,5 µg Fibronektin pro cm² Silikonkautschuk-Oberfläche eingesetzt. FN (aus humaner Plazenta, BD Biosciences, Fernwald) wurde in 1x PBS in einer finalen Konzentration von 10 µg/ml gelöst. 500 µl der Lösung wurden auf einem Substrat (Glas oder kreuzvernetztes PDMS) 30 min bei 37°C inkubiert und wieder entfernt. Die Zellen wurden direkt danach auf die vorbereiteten Substrate ausgesät.

Für die Generierung definierter Zellgeometrien und geordneter Zellcluster wurden die selbst hergestellten Epoxidharzfolien auf elastische Analysesubstrate platziert. Durch deren Aussparungen wurden die Substrate mit einer 5-fach höheren FN-Konzentration beschichtet. 300 µl einer 50 µg/ml FN Lösung wurden auf die so präparierten Substrate gegeben und mikroskopische Lufteinschlüsse in den Aussparungen der Folie durch Anlegen eines Unterdrucks entfernt. Dazu wurden die Schalen in einen Exsikkator platziert und mittels einer Vakuumpumpe evakuiert bis das Aufsteigen von Luftblasen aus der FN-Lösung sichtbar wurde. Nach langsam erfolgtem Druckausgleich wurden die Schalen bei 37°C und 5% CO₂ für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die FN-Lösung von den Lochfolien entfernt und die Substrate zwei Mal vorsichtig mit 1x PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde vollständig entfernt und die Schalen zum Trocknen offen unter der Sterilwerkbank gelagert. Nach vollständiger Trocknung wurden die Lochfolien vorsichtig mit einer Pinzette entfernt, ohne die beschichtete Substratoberfläche zu beschädigen. In einem Blockierschritt wurden die Substrate mit einer 1%igen Pluronic F-127 Lösung (Sigma) für 5 min bei RT inkubiert, um die unbeschichteten Regionen der Silikonoberfläche zu passivieren. Die Blockcopolymer-Lösung wurde daraufhin entfernt und die Substrate drei weitere Male mit 1x PBS gewaschen und bis zur Zellaussaat bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

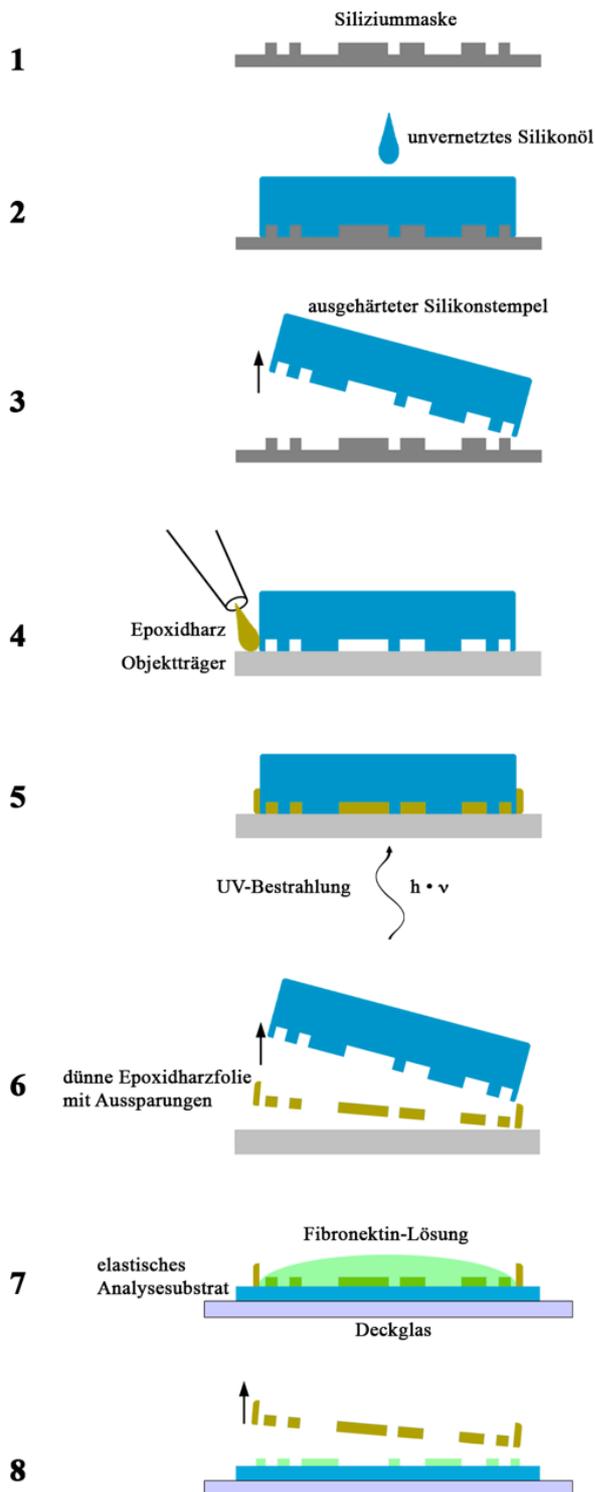


Abb. 2-4: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der Epoxidfolien zur definierten Beschichtung von elastischen Substraten. (1) Als Vorlage für die Generierung Epoxidharzschablone diente eine Siliziummaske. Diese beinhaltete 25 μm hohe Vertiefungen, welche in dem Aussparungsmuster der späteren Lochfolie übertragen werden sollten. (2) Dazu wurde zunächst ein Negativguss der Siliziummaske mit Silikonöl angefertigt. (3) Dieser konnte nach 30 minütiger Kreuzvernetzungsreaktion in Form eines Stempels von der Maske entfernt werden. (4) Der Stempel wurde auf einem passivierten Objektträger platziert und durch seitliche Applikation eines Tropfens mit Epoxidkleber unterschichtet. (5) Dieser verteilte sich durch Kapillarkräfte gleichmäßig unter dem Stempel und füllte durch Umfließen der Erhebungen die Hohlräume zwischen Stempel und Objektträger. Durch UV-Bestrahlung wurde der Kleber ausgehärtet und konnte nach Entfernung des Stempels (6) vorsichtig vom Objektträger gezogen werden. (7) Die so entstandene Folie enthielt nun Aussparungen in Form der Vertiefungen der Siliziummaske und konnte auf einem zuvor hergestellten elastischen Substrat platziert werden. Es erfolgte eine selektive Beschichtung der freiliegenden Bereiche des Substrats durch die Ablagerung des EZM-Proteins zwischen den Aussparungen der Lochfolie. (8) Nach Abnahme der Proteinlösung und Entfernung der Lochfolie blieb das Proteinmuster auf dem Substrat zurück.

2.4. Immunhistochemische Färbungen

2.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Je nach Fragestellung war es notwendig, zytoskelettale Strukturen der untersuchten Zellen durch immunhistochemische Färbungen sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Zellen zunächst für 15 min mit 3,7% (v/v) Formaldehyd (Merck) in Zytoskelett-Puffer (engl.: *cytoskeleton buffer*, CB; Zusammensetzung: 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM D-Glukose, 10 mM MES, 0,1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin) bei 37°C fixiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 mM Glycin in CB für 10 min bei RT abgestoppt. Danach wurden die Proben dreimal mit je 2 ml CB gewaschen und zur Perforation der Plasmamembran für 10 min bei RT 0,1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in CB inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit CB gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei RT mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Sigma-Aldrich) in CB (Blockierlösung) behandelt. Zur Verdünnung und Inkubation der Antikörper diente eine Lösung von 1% (w/v) Magermilchpulver in CB (Inkubationslösung). Im nächsten Schritt wurde der primäre mit einer finalen Verdünnung von 0,5% (v/v) in der Inkubationslösung auf die Probe gegeben. Die Reaktion der Primärantikörper wurde bei 37°C für 45 min durchgeführt und anschließend wurden die Proben dreimal mit je 2 ml Blockierlösung gewaschen. Danach wurde die sekundären Antikörper in einer Konzentration von 0,5% (v/v) Antikörper-Stocklösung in der Inkubationslösung auf die Probe gegeben. Zur indirekten Färbung des Aktin-Zytoskeletts wurde zusätzlich fluoreszenzmarkiertes Phalloidin (Alexa Fluor 546-Phalloidin; Life Technologies) zur Lösung hinzugefügt. Die Verdünnungskonzentration der Stocklösung betrug ebenfalls 0,5% (v/v). Die Proben wurden für weitere 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend mehrmals gründlich mit CB gewaschen. Bis zur weiteren Untersuchung konnten die Proben in CB lichtgeschützt bei 4°C gelagert werden.

2.5. Mikroskopie

2.5.1. Automatisierte Epifluoreszenzmikroskopie

Die Aufreinigungseffizienz der zellspezifischen Trennung wurde mittels lichtmikroskopischer Verfahren bestimmt. Dazu wurden jeweils 50.000 Zellen der unbehandelten Mischkultur, des Eluats und des Retentats für 1 und 6 Tage getrennt voneinander auf FN-beschichteten Glassubstraten kultiviert und anschließend über immunhistochemische Verfahren gefärbt. Zur Identifikation von Kardiomyozyten wurden die Zellen gegen sarkomerisches α -Actinin gefärbt. Als Primärantikörper diente ein monoklonaler Maus-Anti- α -Actinin IgG (Klon EA-53, Sigma) und als Sekundärantikörper ein Alexa 488-konjugierter Ziege-Anti-Maus IgG (Life Technologies). Zur indirekten Färbung des Aktin-Zytoskeletts und der Erfassung aller Zellen wurde die Proben zusätzlich mit Phalloidin Alexa 546 behandelt. Kurz vor der Untersuchung wurden die Zellkerne mit 0,6 nM DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindol*, Life Technologies) in 2 ml CB durch 5-minütige Inkubation bei RT angefärbt (Abb. 2-5).

Nach erfolgter Färbung wurden die Proben nacheinander mit einem automatisierten Inversmikroskop (Axiovert Observer Z.1, Carl Zeiss) analysiert. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte über das Software-Paket AxioVision 4.8.3 (Carl Zeiss), zur Erstellung der Übersichtsaufnahmen wurde zusätzlich das darin enthaltene *MosaiX* Modul verwendet. Diese Funktion ermöglicht die automatisierte Aufnahme von großen zusammenhängenden Bildausschnitten. Um am Ende der Analyse ein nahtloses Mosaik zu erhalten, musste das verwendete Objektiv unter Analysebedingungen im Vorfeld kalibriert werden. Dazu wurde ein Objektmikrometer in die Probenhalterung des elektronisch steuerbaren Tisches (MS-2000, Applied Scientific Instrumentation, USA) eingespannt und eine Längenbestimmung mithilfe des programmeigenen Software-Tools durchgeführt. Zunächst wurde ein Bildfeld von 15 x 15 Kacheln und dem Mittelpunkt der Probe ausgewählt, um eine Voreingenommenheit des Experimentators auszuschließen. Die Bilderfassung erfolgte über ein 40-fach vergrößerndes EC Plan-Neofluar (Ph3, NA 1,3) Ölimmersionsobjektiv (Carl Zeiss) und eine EM-CCD Kamera (C9100-02, Hamamatsu). Diese lichtempfindliche Kamera besaß einen Chip von 1000 x 1000 Pixeln mit einer Pixelgröße von 8 μm x 8 μm . Aufgrund des verwendeten Objektivs würde ein Pixel im Bild in einem perfekten optischen System eine Größe von 0,2 μm x 0,2 μm besitzen ($\hat{=}$ physische Kantenlänge/Vergrößerung). Nach erfolgter Kalibration ergab sich für die Kantenlänge eines Pixels eine geringfügige Abweichung (0,1942 μm) vom theoretischen Wert, sodass das effektive Bildfeld pro Kachel 37.714 μm^2 betrug.

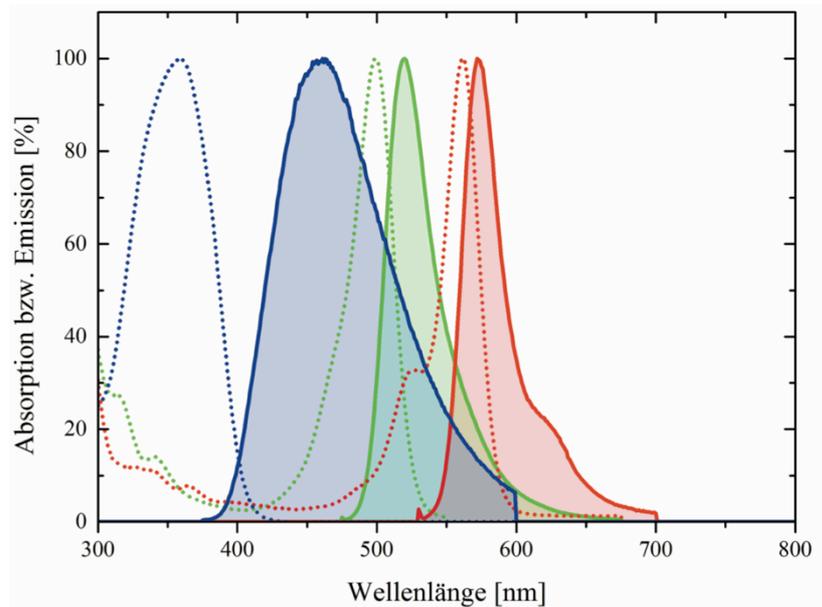


Abb. 2-5: Spektren der zur immunhistochemischen Färbung verwendeten Farbstoffe. Die gepunkteten Linien zeigen die Absorption, die durchgezogenen Linien die Emission in Abhängigkeit der Wellenlänge. Blau: DAPI (Zellkern); grün: Alexa Fluor 488 (α -Actinin); rot: Alexa Fluor 546 (Aktin-Zytoskelett), entnommen von www.lifetechnologies.com.

Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe diente als Lichtquelle eine Xenon-Hochdrucklampe (300 W, Wellenlängenspektrum 300-700 nm; Lambda DG-4, Sutter Instruments, USA). Pro Kachel wurden die drei Fluoreszenzsignale in drei verschiedenen Kanälen aufgenommen. Die Trennung der einzelnen Fluoreszenzsignale wurde durch die Kombination spezieller Filtersysteme ermöglicht. Zur Anregung des DAPI-Kernfarbstoffs diente ein 352-388 nm Bandpassfilter (BP), zur Detektion wurden die ersten beiden Durchlassbereiche (401-450 nm und 499-554 nm) eines Tripleband-Filters verwendet (425/527/685 HC Tripleband Filter, Semrock, USA). Der zur Sichtbarmachung der Sarkomere verwendete Farbstoff Alexa 488 wurde durch einen BP zwischen 450-490 nm angeregt und dessen Emission mittels eines weiteren BP im Bereich 500-550 nm detektiert (Filterset 38 HE, Carl Zeiss). Das durch Phalloidin Alexa 546 markierte Aktin-Zytoskelett wurde über einen BP im Bereich 538-563 nm zur Emission angeregt und das reflektierte Licht bei 570-640 nm mittels BP detektiert (Filterset 43 HE, Carl Zeiss). Die Belichtungszeiten wurden für die einzelnen Kanäle in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Farbstoffe angepasst und beliefen sich je nach Qualität der Färbung auf 100 bis 200 ms. Die Probe wurde im Verlauf der Analyse bei der Kachel in der oberen linken Ecke des Bildausschnitts beginnend meanderförmig abgefahren und die drei Kanäle mit einer Farbtiefe von 16-bit registriert. Aufgrund einer für nahtlose Bildübergänge nachträglich softwareseitig einberechneten

Überlappung der Bildränder von 5% (engl.: *Stitching*) belief sich die Größe des Gesamtbildes mit 7,71 mm² auf weniger als die Summe der Fläche aller 225 Einzelbilder.

2.5.2. Epifluoreszenzmikroskopie für simultane Zweikanalmessungen

Während der Ausbildung eines AP in einer (Herz-) Muskelzelle kommt es unter anderem zum Einstrom von Calcium, das durch Aufhebung inhibitorischer Wechselwirkungen von bestimmten Proteinen des kontraktiven Apparats die Zellkontraktion in Gang setzt. Dieser Prozess ist durch die koordinierte Abfolge von aus dem Extrazellularraum eintretenden, als auch aus intrazellulären Speichern freigesetzten Calcium einer Verzögerung unterworfen. Zwar steht das SR in räumlicher Nähe zu den Sarkomeren, nichtsdestotrotz muss das ins Zytosol einströmende Calcium zu den Myofilamenten diffundieren. Dieser Prozess ist im Vergleich zur elektrischen Erregungsweiterleitung sehr langsam.

Zur Bestimmung des zeitlichen Versatzes (Δt) zwischen der Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und der daraus resultierenden Zellkontraktion in differenzierten Kardiomyozyten wurde ein im Rahmen einer vorangegangenen Doktorarbeit (Küpper, 2012) etabliertes Messsystem verwendet. Hierbei handelte es sich um modifiziertes Inversmikroskop (Axiovert Observer Z.1, Carl Zeiss) mit beheizbarem Inkubationssystem und CO₂-Kontrollmodul (Inkubationseinheit und CO₂ Modul, Zeiss) zur Lebendzellmikroskopie. Dieses schaffte während der gesamten Untersuchung konstante Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂). Neben dem Mikroskop-eigenen Filtersätzen war das System mit einem zusätzlichen Bildteiler ausgerüstet, der es ermöglichte, das von der Probe reflektierte Fluoreszenzlicht in zwei Wellenlängenbereiche aufzuspalten und die beiden Signale über ein Umlenkspiegel- und Linsensystem nebeneinander auf einen Kamerasensor zu projizieren. Dieser Bildteiler wird weiter unten näher beschrieben.

Eine Stunde vor Messbeginn wurde das Kulturmedium der zu untersuchenden Probe gegen 37°C warmen Analysepuffer (HBSS-Myo) ausgetauscht. Dieser bestand aus einer physiologischen Salzlösung (*Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS; Sigma) und 10% (v/v) fötalem Kälberserum (Biochrom). Der Mediumwechsel trug zur Verbesserung der Signalqualität bei, da der im Kulturmedium enthaltene pH-Indikator Phenolrot zu Störsignalen im roten Kanal geführt und somit das Signal-Rausch-Verhältnis zwischen fluoreszierenden Kugeln und Hintergrund verschlechtert hätte. Die Kulturschale wurde zu Beginn der Analyse in den Heizeinsatz des elektronisch steuerbaren Tisches (MS-2000, Applied Scientific Instrumentation, USA) eingespannt und über dem Objektiv zentriert.

Ausgehend von dieser Position wurden die Eckkanten der quadratisch abgebildeten Mikrostruktur aufgesucht und deren Koordinaten im *Mark & Find* Modul der AxioVision Bediensoftware (Carl Zeiss) relativ zum Bildmittelpunkt gespeichert. Diese dienten als Referenzpunkte und ermöglichten nach Entfernung der Kulturschale das Wiedereinspannen einer Probe in ihrer ursprünglichen Orientierung. Unter Verwendung eines Plan-Apochromat Luft-Objektivs mit 20-facher Vergrößerung (Ph2, NA 0,8; Carl Zeiss) wurde die Substratoberfläche zunächst nach regelmäßig und spontan kontrahierenden Zellen meanderförmig abgesucht und deren Koordinaten ebenfalls im *Mark & Find* Modul eingespeichert. Dies erlaubte gemeinsam mit den zuvor festgelegten Referenzpunkten ein nachträgliches Wiederfinden der Positionen analysierter Zellen. Nach erfolgter Lokalisierung der zu untersuchenden Zellen wurden diese mit dem grün fluoreszierenden Calcium-Indikator Fluo4-AM (Life Technologies) beladen. Dieser wurde in seiner inaktiven Form zunächst in DMSO gelöst und in einer finalen Konzentration von 0,5 nM in 2 ml vorgewärmtem Ladepuffer (HBSS ohne Serum) für 10 min auf die Zellen gegeben (Abb. 2-6). Danach wurde die Probe ein Mal mit 2 ml warmen Analysepuffer gewaschen und für den weiteren Versuchsverlauf in 2 ml desselben inkubiert.

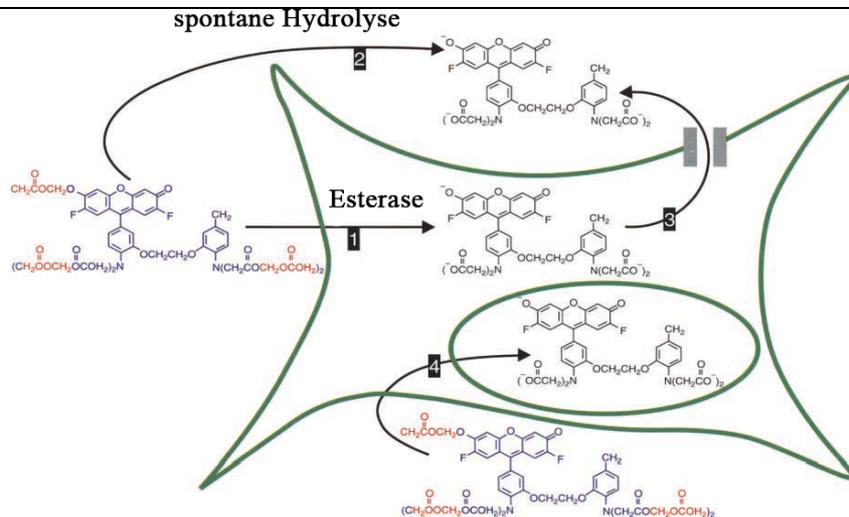


Abb. 2-6: Mechanismus zur Aktivierung des Calcium-Indikators Fluo4-AM in einer Zelle. Der Farbstoff wird in seiner inaktiven Acetoxymethylester-Form zu den Zellen gegeben und permeiert spontan durch die Plasmamembran (Tsien, 1981). Intrazelluläre Esterasen aktivieren die Verbindung durch hydrolytische Spaltung der Acetoxymethylgruppen (1, rote Gruppen). Die negativ geladenen Sauerstoffatome sind nun nicht mehr maskiert und das geladene Molekül reichert sich durch verminderte Permeation in der Zelle an. Die zytosolische Verfügbarkeit des Calcium-Chelators kann durch aktive Ausschleusung mittels organischer Anionentransporter (3) oder die Kompartimentierung in membranumschlossene Zellorganellen (4) gesenkt werden (verändert nach Pawley, 2006).

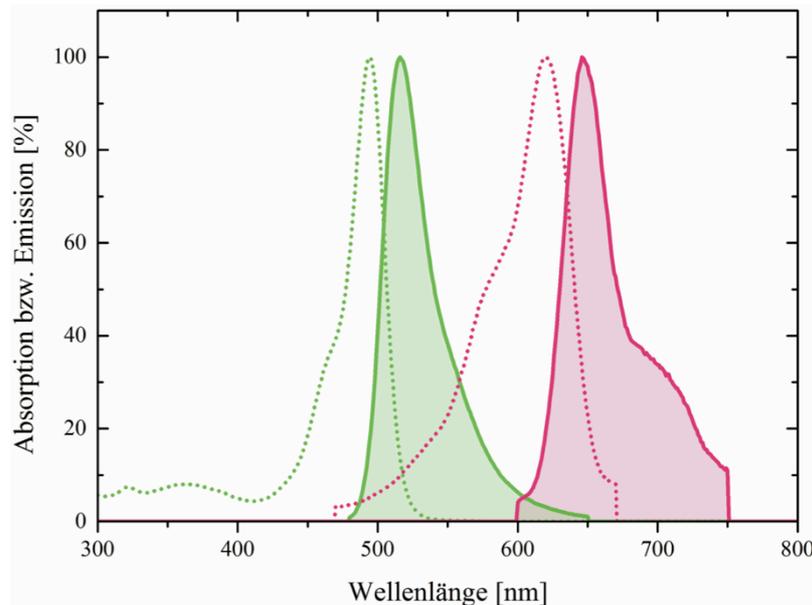


Abb. 2-7: Spektren der zur verwendeten Farbstoffe. Die gepunkteten Linien zeigen die Absorption, die durchgezogenen Linien die Emission in Abhängigkeit der Wellenlänge. Grün: Fluo4-AM (Calcium-Indikator); pink: Fluorospheres Crimson (Substratdeformation), entnommen von www.lifetechnologies.com.

Für die Bilderfassung wurde ein EC Plan-Neofluar Ölimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung verwendet (Ph3, NA 1,3; Carl Zeiss). Zur Beleuchtung der Probe diente eine Xenon-Hochdrucklampe (300 W, Wellenlängenspektrum 300-700 nm; Lambda DG-4, Sutter Instruments) als Lichtquelle. Die Anregung des Calcium-Indikators und der fluoreszierenden Kugeln (Abb. 2-7) erfolgte über einen Dualbandfilter (Transmissionsbanden 476-497 nm und 552-576 nm; ET Dualband Anregungsfilter FITC/CY3, Chroma Technology GmbH).

Die Strahlengänge des Anregungs- und Emissionslichts wurden durch einen Dualband-Strahlteiler (Transmissionsbanden 505-543 nm und 592-697 nm; ET Dualband bs FITC/CY3, Chroma Technology GmbH) geteilt (Abb. 2-8). Das grüne und tiefrote Emissionsspektrum wurde mittels eines Dualband-Sperrfilters (Transmissionsbanden 505-541 nm und 593-683 nm; FITC/CY3 ET Dualband Sperrfilter, Chroma Technology GmbH) vom restlichen Anregungs- und Streulicht getrennt und über einen Umlenkspiegel durch einen seitlichen Kameraanschluss in einen zusätzlichen Bildteiler (Optosplit II, Cairn Research, England) gelenkt. Dort wurden die beiden Spektralbereiche über einen weiteren Strahlteiler voneinander getrennt (Strahlteiler HC BS 580 imaging, Semrock, USA). Durch diesen wurden Fluoreszenzsignale des grünen Spektralbereichs nahezu vollständig reflektiert (Reflexion von $> 95\%$ zwischen 350-570 nm), langwellige Signale des roten bis tiefroten Bereichs konnten größtenteils passieren (Transmission von $> 93\%$ zwischen 581-950 nm). Der geringe Streulichtanteil der rot fluoreszierenden Kugeln stellte aufgrund der niedrigen

Emissionsintensität des Calcium-Indikators dennoch ein Problem für dessen Detektion dar, sodass im Grünkanal ein weiterer Sperrfilter zum Einsatz kam (520/28 nm BrightLine single-band bandpass filter, Semrock, USA). Über Umlenkspiegel wurden die beiden Strahlen wieder parallelisiert und durch eine Linse unmittelbar nebeneinander auf den Kamerasensor fokussiert. Die verwendete Kamera war eine vakuumgekühlte Hochgeschwindigkeitskamera (Neo 5.5 sCMOS, Andor Technology, Irland) mit einem 2.560 x 2.160 Pixel großen Metall-Oxid-Halbleiter Chip (engl.: *scientific complementary metal-oxide-semiconductor*, sCMOS) und einer physikalischen Bildpunktgröße von $6,5 \mu\text{m}^2$, die Aufnahmezeiten von bis zu 50 Bildern pro Sekunde ermöglichte. Die Bedienung der Kamera sowie die Speicherung der Bilddaten erfolgte über einen separaten Computer mit der Solis Software (Version 4.20.30003.0, 64-bit; Andor Technology, Irland). Die eingespeicherten Positionen der zu untersuchenden Zellen wurden sukzessive angefahren und an jeder Stelle simultan die Calciumoszillationen und Substratdeformationen aufgenommen. Zur Reduktion der Rechen- und Speicherlast wurden ein Quadrat von 2.048 x 2.048 Bildpunkten in der Mitte des Kamerasensors ausgelesen und softwareseitig 2 x 2 Bildpunkte zusammengefasst (engl.: *Binning*). Hieraus ergab sich für jeden Kanal eine Auflösung von 512 x 1.024 Bildpunkten und einem effektiven Sichtbereich von $166,4 \mu\text{m} \times 332,8 \mu\text{m}$. Die Belichtungszeit zur Erfassung der Bildsequenzen betrug für jedes Bild 20 Millisekunden und ergab für eine Sequenz von 500 Bildern eine Aufnahmedauer von 10 Sekunden. Letztere war durch den internen Kameraspeicher und die Datentransferrate zum Computer limitiert. Unmittelbar nach erfolgter Analyse aller Zellen einer Probe wurden diese direkt vor Ort fixiert (siehe 2.4.1).

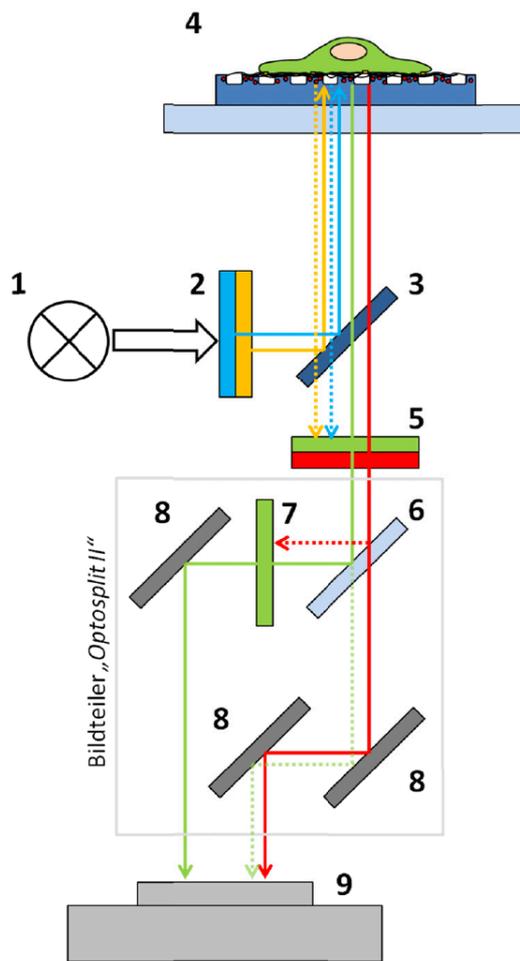


Abb. 2-8: Schematische Darstellung des mikroskopischen Aufbaus zur simultanen Zweikanalmessung. (1) Als Lichtquelle diente eine Xenon-Lampe mit konstanter Intensität im sichtbaren Bereich (weißer Pfeil). (2) Ein Dualband-Anregungsfilter (476-497 nm; 552-576 nm) ließ nur die für die verwendeten Fluorophore benötigten Anregungsspektren passieren (blauer und oranger Pfeil). (3) Das Licht wurde über einen Dualband-Strahlteiler (505-543 nm; 592-697 nm) auf die Probe reflektiert und führte dort zur Anregung des Calcium-Indikators und der fluoreszierenden Kugeln (4). Die von der Probe reflektierten Spektralbereiche (grüner und roter Pfeil) durchquerten den Dualband-Strahlteiler. (5) Ein Dualband-Bandpassfilter (505-541 nm; 593-683 nm) blockierte restliches Anregungslicht (blaue und orange Punktlinie). (6) Der Grünanteil des emittierten Lichts wurde über einen weiteren Strahlteiler (Reflexion von > 95% zwischen 350-570 nm, Transmission von > 93% zwischen 581-950 nm) um 90° abgelenkt, der rote Anteil durchgelassen. (7) Der verbleibende Rotanteil (rote Punktlinie) wurde über einen zusätzlichen Bandpassfilter (500-550 nm) aus dem grünen Signal entfernt. Die Strahlen der beiden voneinander getrennten Lichtspektren wurden über ein justierbares Spiegelsystem (8) nebeneinander auf einen sCMOS-Sensor projiziert (Küpper, 2012).

2.5.3. Fluoreszenzmikroskopische Korrelationsanalyse

Für die Untersuchung zytoskelettaler Strukturen der unter 2.5.2 analysierten Zellen wurden diese unmittelbar nach Beendigung des Experiments fixiert und anschließend neben Aktin gegen α -Actinin und/oder β -Catenin (polyklonaler Anti- β -Catenin Antikörper hergestellt in Hase, Sigma) gefärbt. Die Probenschale der markierten Zelle wurde mit Hilfe der gespeicherten Referenzpunkte in ihrer zuvor festgelegten Orientierung in den Probenhalter des automatisierten Tisches eingespannt. Somit konnte die Position jeder Zelle wiedergefunden und diese im Bezug auf ihre zytoskelettale Architektur untersucht werden. Die Spektren der verwendeten Sekundärantikörper sind aus Abb. 2-5 zu entnehmen. Zur Bilderfassung dienten ein α Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv mit 100-facher Vergrößerung (DIC, NA 1,46; Carl Zeiss) und das gesamte Bildfeld einer hochauflösenden sCMOS-Kamera.

2.6. Digitale Bildverarbeitung

2.6.1. Quantifizierung der Aufreinigungseffizienz kardialer Myozyten

Aufgrund unzureichend etablierter Oberflächenmarker für durchflusszytometrische Analysen primärer Kardiomyozyten wurde die Charakterisierung der separierten Zellfraktionen mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken an adhärent fixierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden sowohl die aus der Primärisolation erhaltene heterogene Mischpopulation, als auch die aufgereinigten Populationen aus Eluat und Retentat auf separaten Glassubstraten ausgesät und für 1 und 6 Tage kultiviert (siehe 2.1.3). Die unterschiedlichen Proben wurden gegen sarkomerisches α -Actinin, Aktin und Chromatin gefärbt und anschließend wie unter 2.5.1 beschrieben analysiert.

Die so erhaltenen Übersichtsaufnahmen (vgl. Abb. 2-9) wurden zunächst in 225 Kacheln zerlegt, die wiederum die Bildinformationen der drei Farbkanäle enthielten (vgl. Abb. 2-10). Diese 675 Einzelbilder wurden mithilfe eines eigenständig programmierten ImageJ basierten Makros prozessiert (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Zunächst wurde auf Basis der Grauwertverteilung für jeden Kanal ein Schwellwert interaktiv bestimmt (Abb. 2-11). Dieser Wert diente dem Makro im späteren Verlauf zur Segmentierung der Grauwert-Bilder in Bereiche mit und ohne Strukturinformationen der Zellen. Dadurch wurde aus Bildern mit einer Farbtiefe von 16-bit ($2^{16} = 65.536$ Graustufen) eine Binärmaske erstellt. Bildpunkte mit geringerer Intensität als der Schwellwert wurden als Hintergrundsignal (0 = schwarz), solche mit gleicher oder höherer Intensität als Zellstruktur (1 = weiß) erkannt (Abb. 2-7). Der Vorteil der interaktiven gegenüber der automatischen Schwellwertbestimmung durch den standardmäßig vom Programm verwendeten Mittelwertfilter bestand in der Möglichkeit, die schwankende Qualität der Färbungen zu berücksichtigen. In manchen Fällen bildeten sich Zusammenlagerungen, die gegebenenfalls durch unzureichendes Waschen der Probe oder unspezifische Wechselwirkungen der Sekundärantikörper während des immunhistologischen Färbeprotokolls hervorgerufen wurden. Diese extrem hellen Bereiche wären somit für die automatische Schwellwertermittlung zu stark ins Gewicht gefallen. Umgekehrt wäre der Schwellwert bei sehr dunklen, zellleeren Kacheln zu niedrig ausgefallen, was zu falsch-positiven Signalen geführt hätte. Die interaktive Festlegung eines Wertes stellte sicher, dass alle Kacheln eines Signaltyps in gleicher Weise prozessiert wurden.

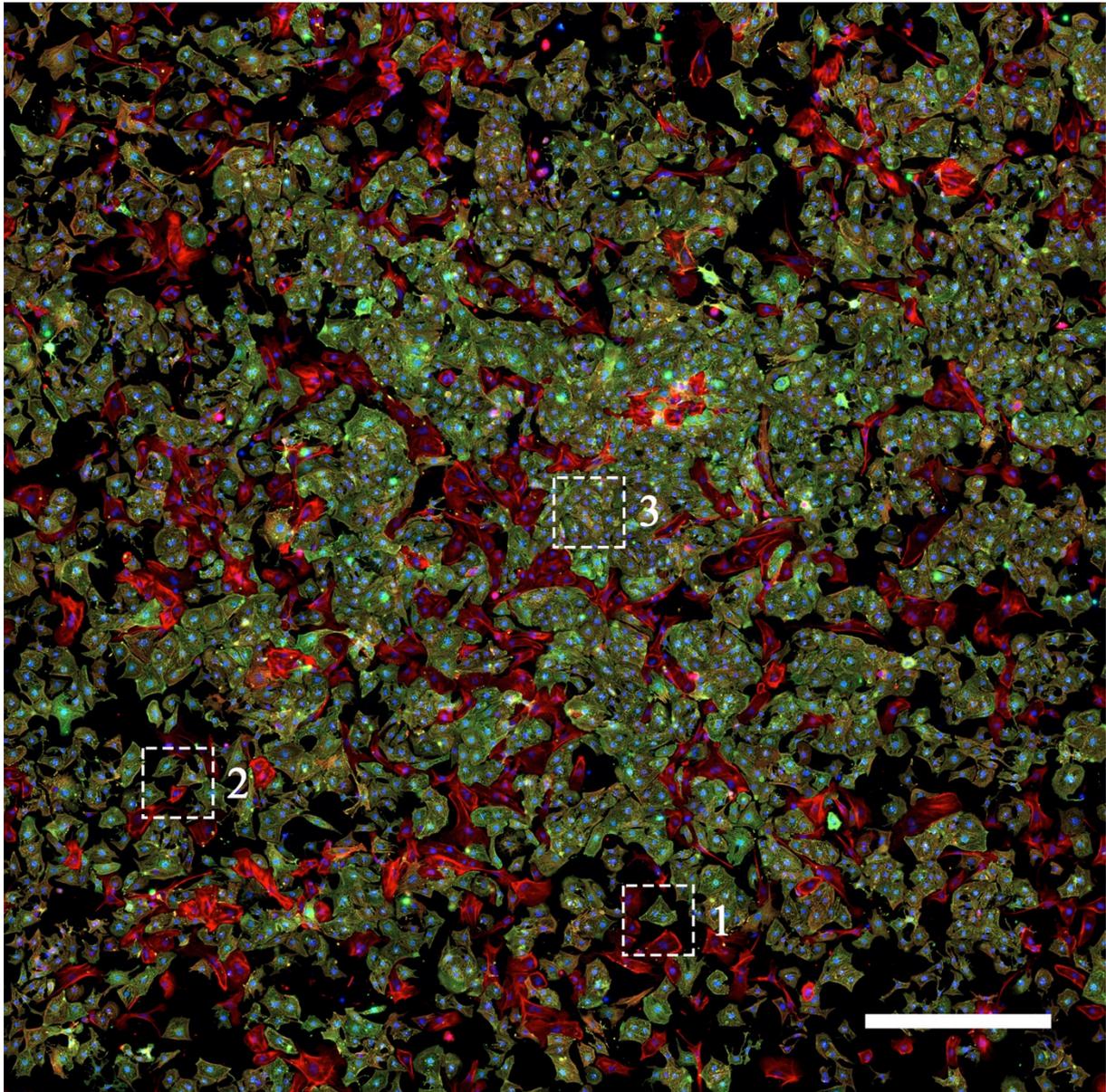


Abb. 2-9: zusammengesetzte Übersichtsaufnahme einer Eluatfraktion am sechsten Tag nach Aufreinigungsprozedur mittels fusogener Liposomen. 50.000 Zellen wurden nach magnetischer Zellsortierung gesammelt und auf FN-beschichtete Glassubstrate ausgesät und nach Kultivierung immunhistologisch gefärbt. Die gesamte Zellpopulation wurde durch die Färbung des Aktinzytoskeletts visualisiert (rot), Kardiomyozyten über das für Muskelzellen spezifische Protein α -Actinin markiert (grün) und zur Zellzahlbestimmung zusätzlich die Zellkerne gefärbt (blau). Die Übersichtsaufnahmen dienten als Grundlage für den automatisierten Zählalgorithmus zur Bestimmung des Kardiomyozytengehalts in den verschiedenen Zellfraktionen. Dazu wurden die Aufnahmen in ihre Einzelbilder zerlegt und jedes separat analysiert. Das Substrat ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig dicht bewachsen. Die Bildausschnitte (1-3) zeigen Bereiche unterschiedlicher Konfluenz mit unterschiedlich hohen Kardiomyozytenanteilen. Maßstab = 500 μ m.

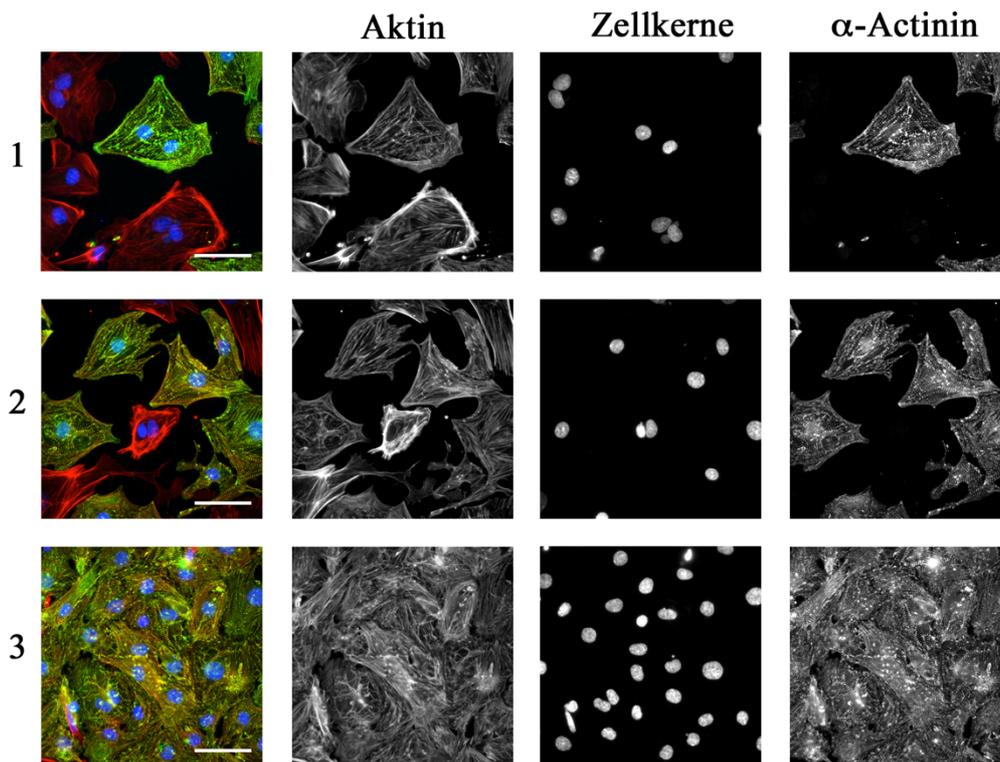


Abb. 2-10: Auftrennung der Fluoreszenzkanäle von drei exemplarischen Bildausschnitten mit unterschiedlichen Wachstumsdichten aus Abb. 2-9. Alle Zellen wiesen eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts (rot) auf. Der hochspezifische Nachweis von α -Actinin (grün) ermöglichte die Identifikation von Kardiomyozyten innerhalb der Gesamtpopulation, Nicht-Muskelzellen blieben unmarkiert. Über die Färbung der Zellkerne ließ sich eine Zählung der Zellen vornehmen (blau). Auf Basis der einzelnen Graustufenbilder wurde im weiteren Verlauf Binärmasken erstellt. Maßstab = 50 μ m.

Für jedes Signal musste ein separater Schwellenwert ermittelt werden, der dann auf alle 225 Bilder des gleichen Kanals angewendet wurde. Auf diese Weise wurden für alle 675 Einzelbilder Binärmasken erstellt. Außerdem wurden die Masken von Artefakten befreit, die sich als körnige Aggregate in den Aufnahmen abzeichnete. Dazu wurde die Zirkularität und die Mindestgröße von Objekten vorgegeben, die es zu erkennen galt. Die Zirkularität eines Objektes liegt zwischen 0 für eine Linie und 1 für einen Kreis und ist definiert als:

$$\text{Zirkularität} = 4\pi \frac{\text{Fläche}}{(\text{Umfang})^2}$$

Für die Detektion der rundlichen Zellkerne wurde ein Zirkularitäts-Intervall von 0,6-1,0 vorgegeben. Zur Festlegung des Größenintervalls wurden die Zellkerne manuell vermessen.

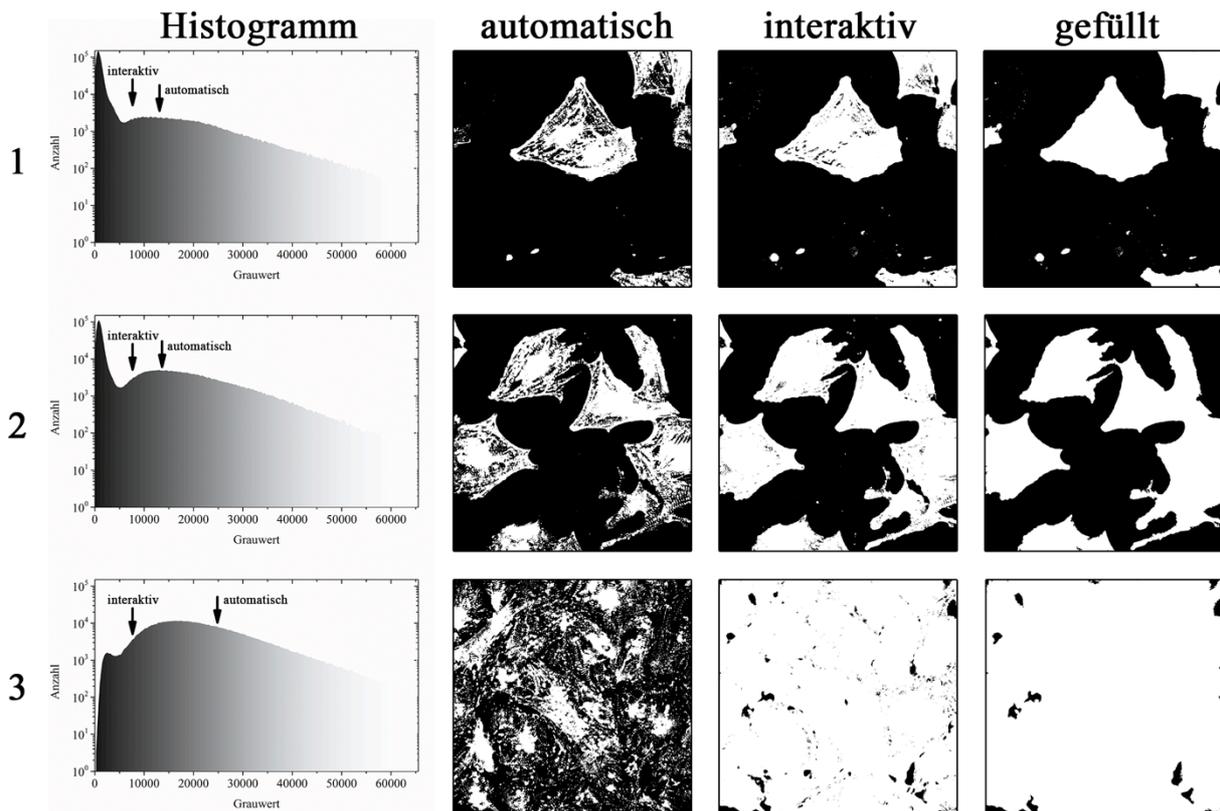


Abb. 2-11: Interaktive Bestimmung eines Graustufen-Schwelwerts. Die Histogramme zeigen die Grauwertverteilung des α -Actinin-Signals der drei exemplarisch ausgewählten Kacheln aus Abb. 2-9. Der softwareseitig gewählte Schwellwert (Pfeil in Histogrammen: „automatisch“) lieferte eine unzureichende Trennung zwischen Zellfläche und Hintergrund und wurde daher durch einen interaktiv bestimmten Schwellwert (Pfeil „interaktiv“) ersetzt. Insbesondere für durchgängig bedeckte Areale ließ sich dadurch eine verbesserte Segmentierung erreichen (vgl. Kachel 3 automatisch vs. interaktiv). Schwarze, von weißen Bildpunkten umschlossene Bereiche wurden nachträglich mit weißen Bildpunkten aufgefüllt.

Auf Basis von 400 vermessenen Zellkernen ergab sich eine durchschnittliche Strukturgröße von 3.400 ± 900 Bildpunkten ($\cong 129 \pm 35 \mu\text{m}^2$) und einem Intervall von 2.000 bis 10.000 Bildpunkten. Im Zellkern-Kanal wurden Strukturen unterhalb der Parametergrenzen nicht als Zellkern registriert, sondern als Zelldebris aus der Zellzahlbestimmung ausgeschlossen. Strukturen oberhalb des vorgegebenen Größenintervalls wurden als Zellaggregate gewertet und ebenfalls für die Zellzählung nicht berücksichtigt. In den anderen Kanälen wurden Bereiche ab einer Größe von 3.000 Bildpunkten als zelluläre Strukturen erkannt.

Zur automatisierten Zellzahlbestimmung wurden für jede der 225 Kacheln die Binärmasken der durch α -Actinin bzw. Aktin markierten Zellkörper mit den Masken der Zellkerne zur Überlagerung (Abb. 2-12). Die Gesamtzellzahl einer Kachel wurde aus der Überlagerung der Maske der Zelltyp-unspezifischen Aktinfärbung und der Zellkernmaske ermittelt. Die Anzahl von Kardiomyozyten wurde unter Verwendung der α -Actinin Maske auf die gleiche Weise

bestimmt. Solche Kerne, die nicht innerhalb einer grünen oder roten Maske lagen wurden für diesen Kanal nicht als Zelle gezählt.

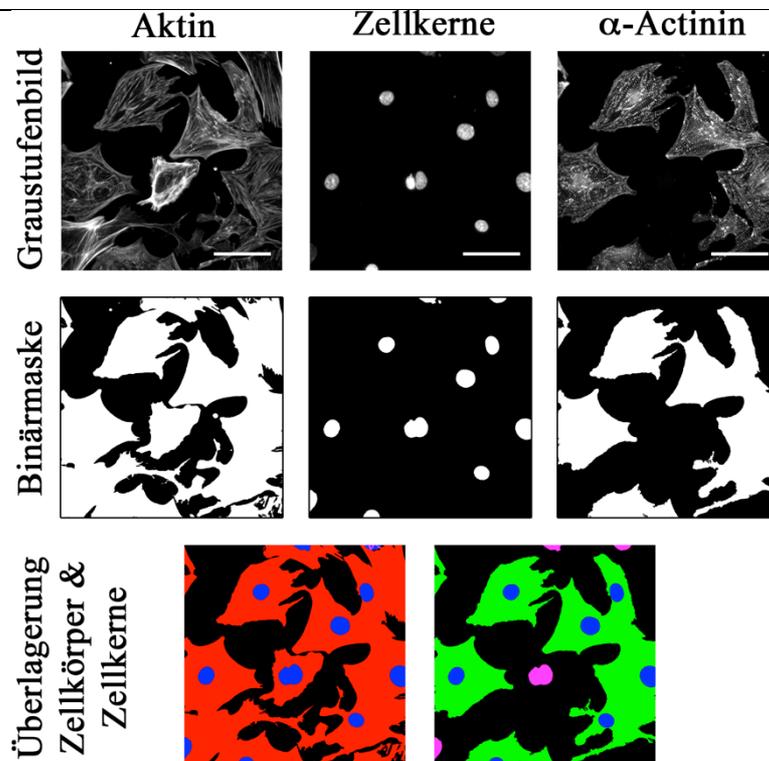


Abb. 2-12: Bestimmung des Anteils kardialer Myozyten für eine Kachel. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Vorgehensweise zur Bestimmung der Gesamt- und Kardiomyozyten-Zellzahl am Beispiel der Kachel #2 aus Abb. 2-9. Die Fluoreszenzsignale wurden in drei Kanäle aufgetrennt und aus ihren Graustufenbildern Binärmasken erstellt. Durch Überlagerung der Aktin- und Zellkern-Maske wurde zunächst die Gesamtzellzahl ermittelt. Es wurden nur solche Zellkerne gezählt, die innerhalb einer Zellfläche lokalisiert waren (blau auf rotem Hintergrund). Zellkerne, die den Bildrand berührten wurden nicht berücksichtigt. Im hier gezeigten Beispiel liegen alle Kerne innerhalb einer roten Zellfläche und die ermittelte Gesamtzellzahl beträgt $n = 7$. Die Zellzahl der Kardiomyozyten wurde auf die gleiche Weise unter Verwendung der α -Actinin-Maske ermittelt (blau auf grünem Hintergrund). Zellkerne ohne grünen Zellhintergrund stammten aus α -Actinin-negativen, d.h. aus Nicht-Muskelzellen und trugen somit nicht zur Zählung bei (magenta). Die ermittelte Kardiomyozytenzahl beträgt für das gezeigte Beispiel $n = 6$. Diese Bildprozessierung erfolgt für alle Kacheln automatisch, die Resultate wurden für statistische Analysen in einem Textdokument gespeichert. Maßstäbe = 50 μm .

2.6.2. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion

Während eines APs in einer Herzmuskelzelle veranlasst der primäre Einstrom von Calcium die Ausschüttung weiteren Calcium aus zelleigenen Speicherorganellen (CICR) und führt somit zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$. Daraus resultiert die Aktivierung der Kontraktionsmaschinerie in den Sarkomeren und die Zelle generiert eine Zugkraft, die sie durch spezielle Kontaktpunkte mit ihrer Umgebung auf diese überträgt.

Zur Ermittlung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Einstrom und Zellkontraktion wurden die unter 2.5.2 erhobenen Daten analysiert. Die zyklisch auftretenden Calcium-Signale wurden durch Zugabe des Indikators Fluo4-AM sichtbar gemacht, als Maß für die Zellkontraktion diente hierbei die durch die Zellen verursachte Deformation des unterliegenden, elastischen Substrats. Die Substratdeformation wurde über die Verschiebung eingebetteter fluoreszierender Kugeln visualisiert. Die im folgenden Abschnitt beschriebene Bildanalyse wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Kevin Küpper (Küpper, 2012) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Ronald Springer und Herrn Georg Dreissen (beide ICS-7, Forschungszentrum Jülich) entwickelt. Der in MatLab (The MathWorks, MA, USA) programmierte Algorithmus basiert maßgeblich auf der subpixelgenauen Kreuzkorrelation von Bildausschnitten (sogenannten Schablonen). Diese wurde im Institut bereits zuvor für die Analyse von Zellkräften etabliert (siehe 2.6.3).

Mittels Kreuzkorrelation wird aus zwei Bildern gleicher Größe ein Korrelationskoeffizient bestimmt, der Auskunft über die Ähnlichkeit der beiden Bilder zueinander gibt.

$$nCorr(t) = \frac{\sum_1^m \sum_1^n (I_{mn}(t) - \langle I(t) \rangle) (I_{mn}(t_0) - \langle I(t_0) \rangle)}{\sqrt{(\sum_1^m \sum_1^n (I_{mn}(t) - \langle I(t) \rangle)^2) (\sum_1^m \sum_1^n (I_{mn}(t_0) - \langle I(t_0) \rangle)^2)}}$$

Je ähnlicher die Bilder zueinander sind, desto höher der Wert, vollkommen identische Bilder liefern einen Koeffizienten von „1“. Für die Detektion der Substratdeformation wurden im ersten Bild der Zeitserie mehrere Schablonen mit einer Kantenlänge von jeweils 40 Bildpunkten (Bildpunktkantenlänge: 0,325 μm) entlang eines quadratischen Gitters, mit einer Gitterweite von 20 Bildpunkten erstellt. Die Schablonen aus benachbarten Gitterpositionen überlagerten sich somit zur Hälfte. Anschließend wurden die Positionen der Schablonen in jedem Zeitschritt des Bildstapels ermittelt. Dazu wurde für jede Schablone ein in ihrer Größe

identisches Suchfenster erstellt und ausgehend vom Schablonenmittelpunkt um fünf Bildpunkte in beide Richtungen entlang der x- und y-Achse bewegt. Innerhalb der 121 möglichen Positionen des Suchfensters wurde dann nach dem höchsten Korrelationskoeffizienten gesucht. Die Position des Suchfensters mit dem höchsten Korrelationskoeffizienten entsprach der Verschiebung der Strukturen innerhalb einer Schablone zwischen zwei Zeitschritten.

Aus der Kreuzkorrelation erhielt man zu jedem Zeitpunkt der Aufnahme eine Matrix mit den neu ermittelten x- und y-Positionen der in den Schablonen enthaltenen Strukturen. Aus der Differenz zwischen der Position einer Struktur zu einem Referenzzeitpunkt und ihrer Position zum späteren Zeitpunkt ließ sich ein Vektor berechnen, dessen Länge der Verschiebungsamplitude gleichkam (Abb. 2-13). Diese wiederum entsprachen näherungsweise der von der Zelle ausgeübten Substratdeformation.

Parallel zur Substratdeformation wurde zusätzlich die Intensitätsänderung im Fluoreszenzsignal des Calcium-Indikators detektiert. Durch Normierung der beiden Signale ließen sich diese in einem Graphen auftragen und deren gemeinsamer Verlauf und zeitliche Abfolge analysieren. Zur quantitativen Bestimmung des zeitlichen Versatzes der beiden Signalereignisse wurde als eindeutig zu bestimmender Zeitpunkt die ansteigende Flanke des jeweiligen Ereignisses gewählt. Als verlässlich erwies sich hierbei der Zeitpunkt t_F , an dem die Intensität eines Signalereignisses seinen halbmaximalen Wert ($I_{0,5}$) erreichte. Dieser ergab sich aus der Hälfte der Differenz zwischen Signalmaximum und Signalminimum:

$$I_{0,5} = 0,5 \cdot (I_{\max} - I_{\min})$$

Mittels Kreuzkorrelation wurden in den jeweiligen Signalverläufen der Aufnahme im Idealfall alle Zeitpunkte t_F gefunden. In manchen Fällen konnten aufgrund von Inhomogenität der Signalform nicht alle Zeitpunkte der ansteigenden Flanken automatisch bestimmt werden. Diese gingen nicht in die weitere Auswertung mit ein. Durch Mittelung der Werte wurde für jedes Signal die durchschnittliche Dauer bis zum Erreichen des Halbmaximalwertes bestimmt. Die Differenz der beiden Zeitpunkte ergab schließlich den zeitlichen Versatz zwischen Calcium-Signal und der resultierenden Zellkontraktion (Abb. 3-14):

$$\Delta t = |t_{F, \text{Deformation}} - t_{F, \text{Calcium}}|$$

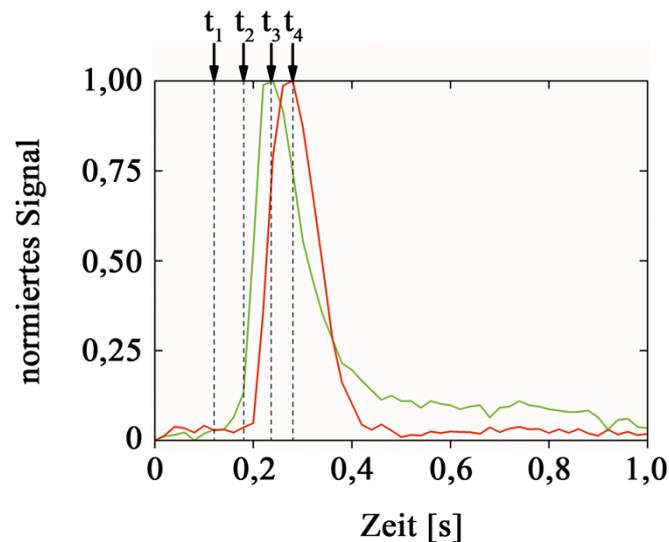
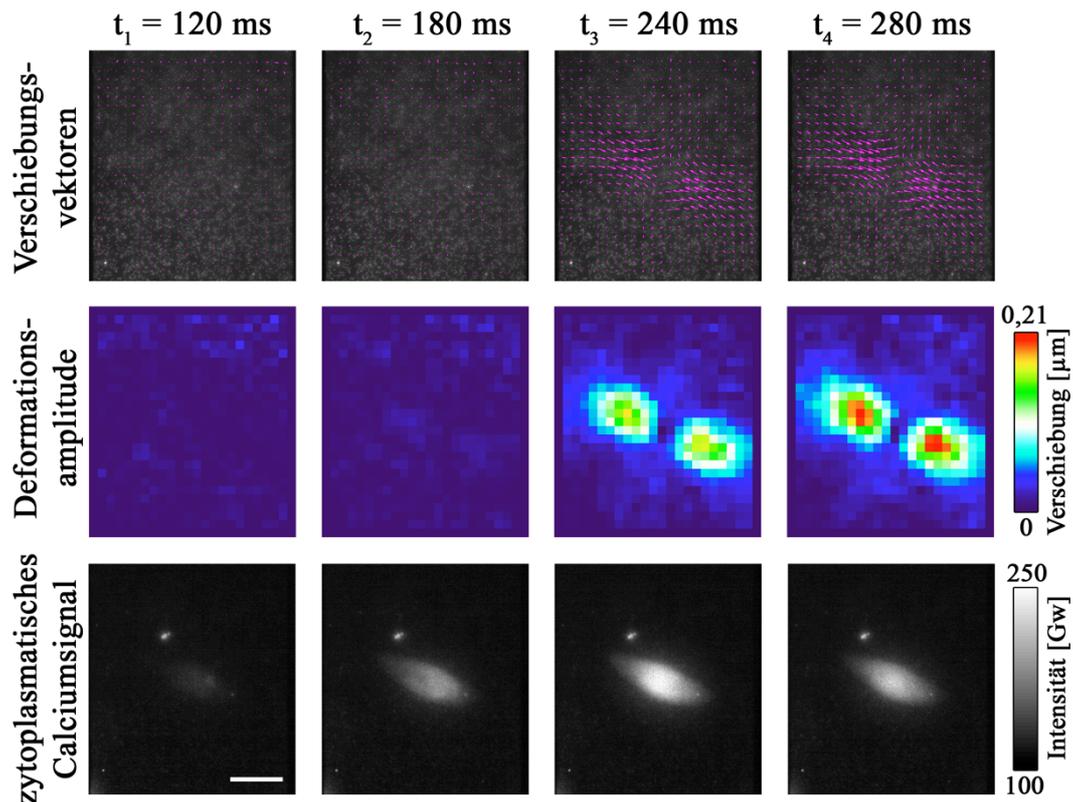


Abb. 2-12: Bildanalyse der fluoreszenzmikroskopischen simultanen Zweikanalmessung. Calcium-Signal und Substratdeformation wurden simultan mit hoher zeitlicher Auflösung analysiert. Die analysierte Zelle befand sich zum Beginn der Aufnahme im relaxierten Zustand (t_1). Nach 180 ms stieg die Fluoreszenzintensität des Calciumsignals an (t_2) und erreichte 60 ms später ihr Maximum (t_3). Die Zellkontraktion wurde über die Verschiebung der fluoreszierenden Kugeln detektiert. Aus der Länge der Verschiebungsvektoren (magentafarbene Pfeile, 30-fach vergrößert) wurden die lokalen Deformationsamplituden errechnet (Falschfarbenbild). Die Zellkontraktion setzte zeitlich verspätet ein und erreichte nach 280 ms ihr Maximum (t_4). Maßstab = 50 μm , grüne Linie = normierte Intensität des Calciumsignales, rote Linie = normierter Betrag der Substratdeformation

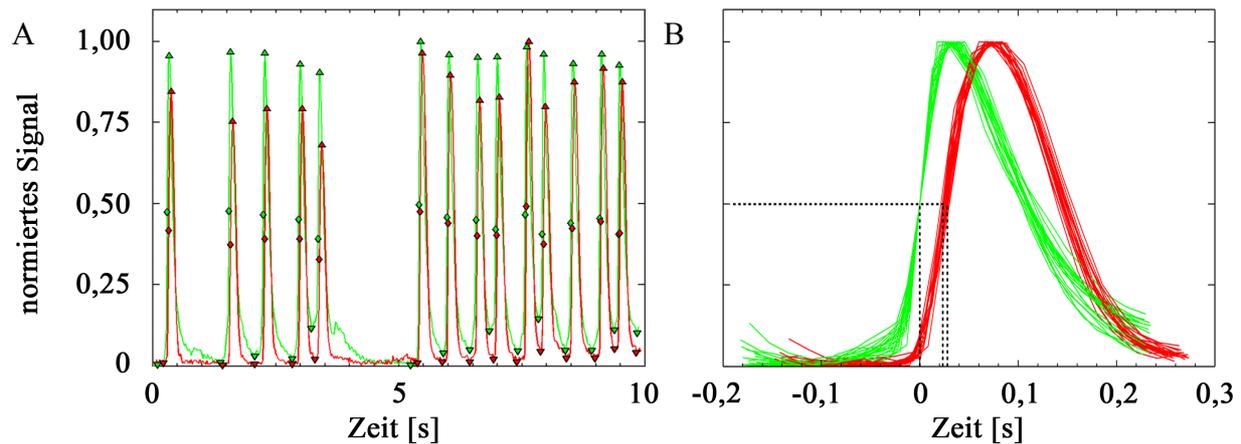


Abb. 2-13: Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calciumsignal (grün) und resultierender Substratdeformation (rot) als Maß für die Zellkontraktion. (A) Die Halbmaxima ($I_{0,5}$) der einzelnen Signale (Rauten) wurden aus der Differenz zwischen lokalem Minimum zum Zeitpunkt vor Beginn der Kontraktion (Dreieck, Spitze nach unten) und dem darauf folgenden lokalen Maximum (Dreieck, Spitze nach oben) ermittelt. (B) Der mittlere zeitliche Versatz einer Zelle entspricht dem Betrag aus der Differenz zwischen $t_{F, Calcium}$ und $t_{F, Deformation}$. Der gemittelte Versatz für das hier gezeigte Beispiel betrug 26 ± 3 ms und wurde aus 19 Signalköpfen bestimmt.

2.6.3. Abschätzung der Kontraktionskräfte kardialer Myozyten

Zur quantitativen Auswertung der Bildsequenzen von schlagenden Myozyten zur Bestimmung der kontraktile Kräfte wurde ein weiterer digitaler Bildverarbeitungsalgorithmus angewendet. Im Einzelnen wurden fluoreszierende Mikrokugeln im kreuzvernetzten PDMS lokalisiert und deren Verschiebungen über die Zeit ermittelt. Das in diesem Abschnitt beschriebene Programm „Zellkraftanalyse“ wurde auf Basis von Matlab (The MathWorks, MA, USA) geschrieben und bereits zuvor im Institut etabliert (Merkel et al., 2007; Houben, Kirchgeßner & Merkel, 2010; Hersch et al., 2013). Alle hier aufgeführten Prozessschritte waren in dem Programm implementiert und wurden durch Herrn Dr. Norbert Kirchgeßner und Herrn Sebastian Houben (beide ehem. ICS-7, Forschungszentrum Jülich) erstellt und durch Herrn Dr. Ronald Springer und Herrn Georg Dreissen (beide ICS-7, Forschungszentrum) weiter auf die hier bearbeiteten Fragestellungen angepasst. Es konnten alle Datensätze analysiert werden, in deren Verlauf die Substratdeformation mittels Verschiebung fluoreszierender Kugeln detektiert wurde.

In dem Programm wurde zunächst die Position einer fluoreszierenden Kugel in der oberen Schicht des Elastomersubstrats bestimmt. Dazu wurde im Fluoreszenzbild eine Kugel umrandet und diese mit den restlichen Bildbereichen gekreuzkorreliert. Lokale Maxima des Kreuzkorrelationskoeffizienten wurden als Positionen weiterer Kugeln identifiziert, sofern der

Wert des Koeffizienten an dieser Stelle mindestens 0,7 betrug. War dies der Fall wurde an der entsprechenden Stelle eine Kugel angenommen (Abb. 2-15A, B).

Bei manchen Aufnahmen stellte die Drift der Probe ein Problem für die weitere Auswertung dar. Da die resultierende Kraft aus der Verschiebung der fluoreszierenden Kugeln errechnet wurde, war es unerlässlich die Drift zu korrigieren. Dies erfolgte innerhalb eines separaten Schritts. Es wurden Verschiebungen an zwei bis vier verschiedenen Positionen einer Aufnahme ermittelt, die weder durch das Deformationsfeld der Zelle noch durch die Deformation benachbarter Zellen beeinflusst wurden (Abb. 2-15C). Hierzu wurden rechteckige Bildbereiche manuell markiert und anhand der normierten Kreuzkorrelation ausgewertet. Der Mittelwert der Verschiebungen in den festgelegten Bildbereichen pro Zeitabschnitt wurde als Drift der Probe zu diesem Zeitpunkt angenommen.

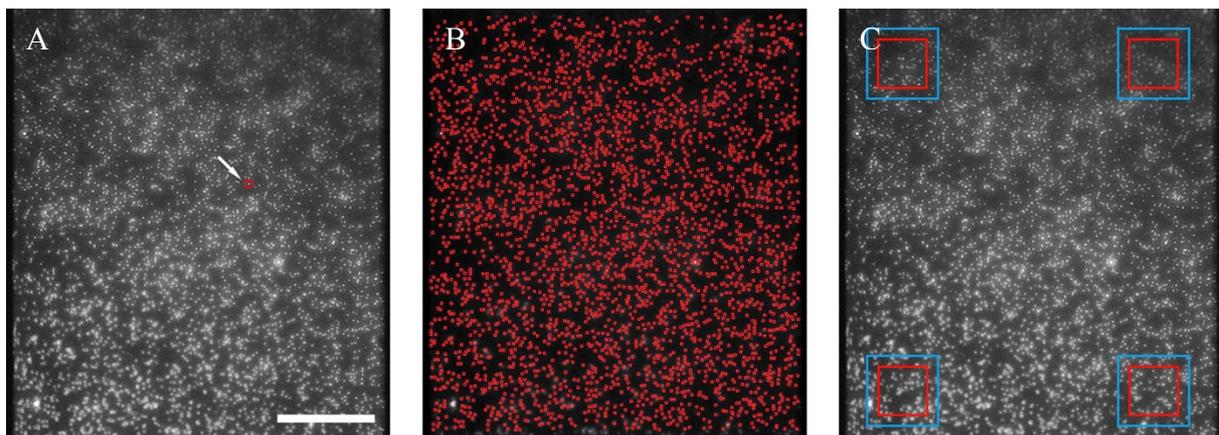


Abb. 2-14: Mikroskopische Aufnahme fluoreszierender Kugeln in 15 kPa Silikonkautschuksubstrat; (A) das rote Quadrat zeigt die manuell gewählte Schablone einer fluoreszierenden Kugel auf deren Basis alle Kugeln automatisch erkannt werden; (B) die Positionen aller 2.976 detektierten Kugeln wurden mit einem rotem Quadrat markiert; (C) im Bildausschnitt wurden Bereiche markiert, in denen innerhalb der Sequenz keine durch Zellen hervorgerufene Verschiebung auftrat. Innerhalb eines vorgegebenen Suchbereichs (blaue Quadrate) wurde die Verschiebung der Referenzschablonen (rote Quadrate) bestimmt und daraus die laterale Drift bestimmt des Analysesubstrats bestimmt. Maßstab = 50 μm

Die Verschiebungen der zuvor lokalisierten Kugeln wurden innerhalb des Programms für die komplette Sequenz analysiert. Durch Kreuzkorrelation wurde die Bildposition der Kugeln über die Zeit der Kontraktionsphase bestimmt. Als Referenzbild diente immer die erste Aufnahme einer Sequenz im relaxierten Zustand der Zelle. Als Startpunkt zur Berechnung der Zellkräfte wurden Sequenzen von 10-20 Sekunden verwendet, zu deren Beginn die zu analysierende Zelle im relaxierten Zustand vorlag und während der sie im Idealfall 5-15 Mal

kontrahierte. Die Zellfläche und die von der Zelle erzeugte Verschiebung dienten beide zur Berechnung der wirkenden Kontraktionskräfte (Abb. 2-16). Mit Hilfe der linearen Elastizitätstheorie für Punktkräfte wurden aus den gewonnenen Daten die kontraktiven Kräfte bestimmt. Der Algorithmus generierte während der Kraftschätzung für jeden Zeitpunkt ein künstliches Kraftfeld, berechnete die daraus resultierende kumulative Verschiebung und optimierte iterativ die Kräfteverteilung solange, bis die resultierende und die tatsächlich gemessene Substratdeformation die höchste Übereinstimmung zeigten (Dembo & Wang, 1999; Schwarz et al., 2002; Merkel et al., 2007; Houben et al., 2010). Die kontrahierende Gesamtkraft der Zelle ergab sich aus der Summe aller wirkenden Kraftkomponenten innerhalb der Zellumrandung. Die mittlere Kontraktionskraft einer Zelle wurde aus dem Durchschnitt aller Kontraktionen während der Bildsequenz berechnet. Zusätzlich wurde die Kontraktionsfrequenz aus den Kontraktionsprofilen manuell ermittelt. Zunächst wurde die Anzahl aller vollendeten Kontraktionen bestimmt. Anschließend wurde der erste Zeitpunkt des relaxierten Zustandes vor der ersten Kontraktion und der Zeitpunkt des relaxierten Zustandes der Zelle nach der letzten detektierten Kontraktion bestimmt. Schließlich wurde die Anzahl der Kontraktionen durch den Betrag dieses Intervalls geteilt.

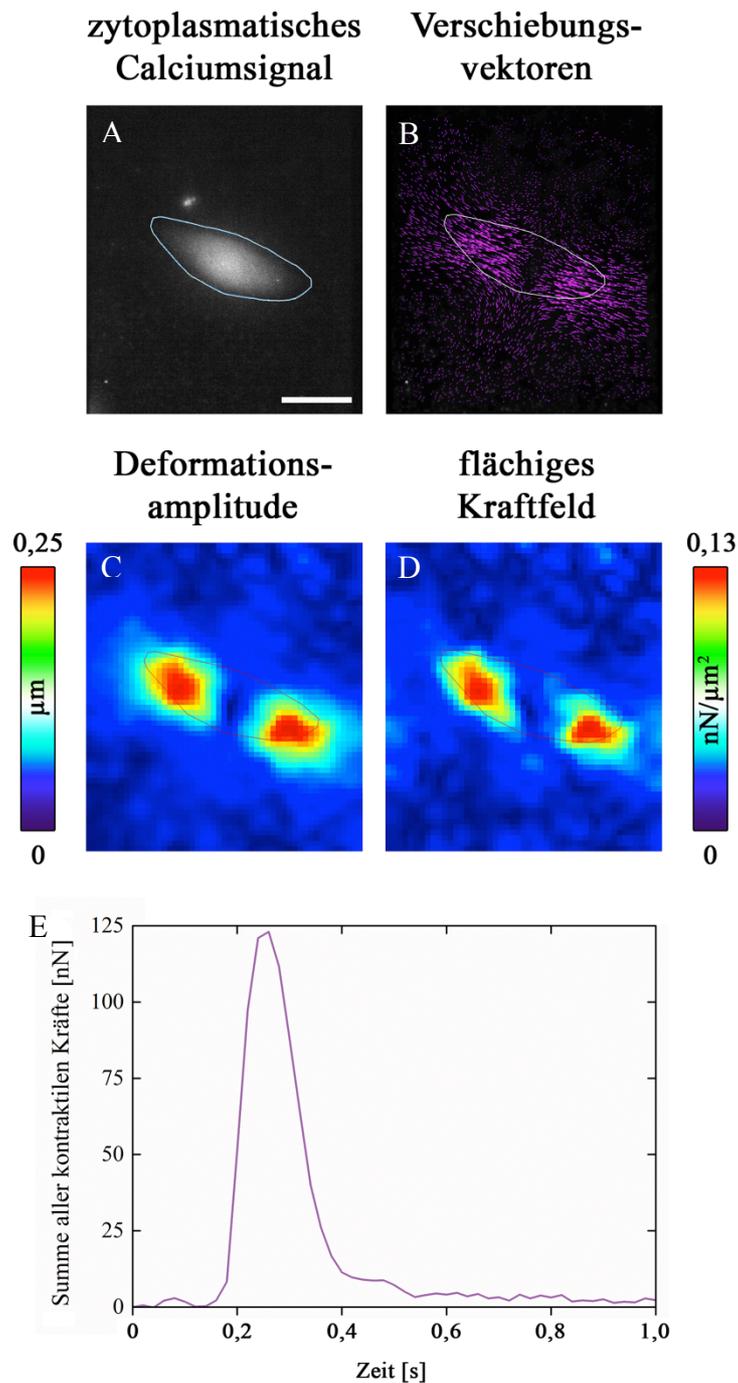


Abb. 2-15: Schätzung der zellulären Kontraktionskräfte. (A) Zur Ermittlung der auf das Substrat ausgeübten Kraft musste die Zellumrandung bestimmt werden. Dies konnte entweder anhand des Hellfeldbildes der Zelle oder des Calciumsignals vorgenommen werden (weißes Polygon). Letzteres gestaltete sich in den meisten Fällen einfacher, da sich das Zytoplasma aufgrund höherer Fluoreszenzintensitäten deutlich von der Umgebung abhob; Maßstab = 50 μm . (B) Das Verschiebungsvektorfeld (magentafarbene Pfeile, 30-fach vergrößert) wurde im Zellkraftalgorithmus auf Basis jeder detektierten fluoreszierenden Kugel bestimmt und erlaubte somit eine höhere lokale Auflösung der Substratdeformationen. (C) Die Länge der Vektoren wurde in Deformationsamplituden auf einem regelmäßigen Gitter umgerechnet. (D) Schließlich wurde ein flächiges Kraftfeld errechnet, welches notwendig wäre, um die detektierten Deformationen hervorzurufen. (E) Die Summe aller kontraktilen Kräfte innerhalb der markierten Zellumrandung lieferten die von der Zelle ausgeübte Kraft zum jeweiligen Zeitpunkt.

2.6.4. Quantitative Analyse zytoskelettaler Strukturen

Nach erfolgter Deformations- und/oder Calciumanalyse wurden die untersuchten Zellen fixiert und unter anderem gegen das Aktin-bindende, sarkomerspezifische α -Actinin gefärbt (2.4.1). Diese Färbung diente zur Untersuchung der Architektur des Zytoskeletts bzw. genauer, der Orientierung der Myofibrillen. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Rudolf Merkel, Herrn Dr. Ronald Springer und Herrn Kevin Küpper wurde ein ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) basiertes Makro zur Analyse zytoskelettaler Strukturen entwickelt. Dieses ermöglichte eine quantitative Erfassung verschiedener Strukturparameter und soll im nächsten Abschnitt näher beschrieben werden.

Als Grundlage für die Bildanalyse dienten Graustufenbilder der immunhistochemischen Färbungen des Strukturproteins α -Actinin und wurden wie in Abb. 2-17 dargestellt prozessiert. Zum einen wurde das Ausgangsbild mit einem radial symmetrischen Bandpassfilter im Fourierraum gefaltet. Dieser wurde so gewählt, dass Strukturen mit einer Größe von weniger als 50 und mehr als 200 Bildpunkten (Bildpunktkantenlänge: 0,065 μm) stark abgeschwächt wurden. Das resultierende Bild wurde in den Ortsraum transformiert und durch Verwendung eines Schwellwertverfahrens segmentiert. Die so erhaltene Binärmaske ermöglichte die Berechnung der Zellfläche durch die Ermittlung des Bedeckungsgrades weißer Bildpunkte. Darüberhinaus ließ sich mit Hilfe eines implementierten Programmpunktes eine Fitellipse an den Zellkörper anlegen. Über diese ließ sich die Länge der Haupt- und Nebenachse, das Aspektverhältnis und den Orientierungswinkel des Zellkörpers extrahieren.

In einer zweiten Variante wurde das Originalbild mit einem radial symmetrischen Bandpassfilter gefaltet, der Strukturen, die eine Größe von kleiner oder größer als 7 Bildpunkten aufwiesen abgeschwächte. Dieser Wert lieferte für die Segmentierung der Sarkomere die verlässlichsten Ergebnisse. Zusätzlich wurde das resultierende Bild um den zuvor ermittelten Winkel der Zellform in eine horizontale Ausrichtung gedreht. Eine optimale Unterscheidung zwischen Strukturinformation und Hintergrund wurde durch ein gewichtetes Schwellwertverfahren nach Otsu erreicht (Otsu et al., 1979) und schließlich eine Binärmaske der segmentierten Sarkomere erstellt.

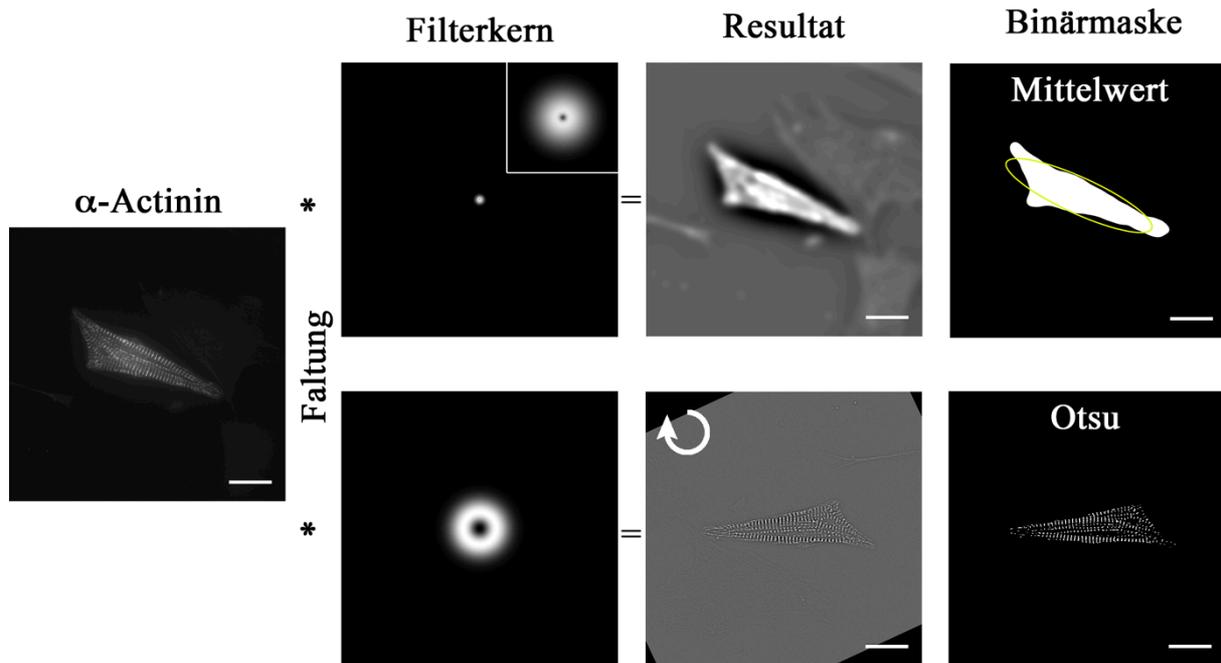


Abb. 2-16: Faltung des α -Actinin Bildes im Fourierraum mit verschiedenen Filterkernen zur Reduktion von Ortfrequenzen. In der oberen Zeile wurde das Ausgangsbild mit einem Bandpassfilter gefaltet. Der Filter war so gewählt, dass kleine Strukturen abgeschwächt und große verstärkt dargestellt wurden. Durch zusätzlich Verwendung eines Graustufen-Schwellwertes (hier: Mittelwert) konnte der Hintergrund entfernt und die Zellfläche detektiert werden. Mittels Anfitzen einer Ellipse (gelbe Linie) um den Zellkörper ließen sich Länge der Haupt- und Nebenachse, Aspektverhältnis und die Ausrichtung des Zellkörpers ermitteln. Im unteren Fall wurde ein radial symmetrischer Bandpassfilter mit einem Radius von 7 Bildpunkten verwendet. Das Bild wurde zusätzlich um den zuvor ermittelten Winkel der Zellausrichtung gedreht (Pfeil) und durch Verwendung des Otsu-Segmentierungsverfahren konnte eine Sarkomer-Segmentierung als Binärmaske herausgestellt werden. Maßstäbe = 20 μm

Für die Untersuchung der Orientierung und Ordnung der Myofibrillen wurden die Binärmasken des α -Actinin Signals mit sich selber gekreuzkorreliert. Die Kreuzkorrelation eines Signals mit sich selbst wird Autokorrelation (R_{xx}) genannt und dient der Wiederfindung, sich wiederholender Muster an verschiedenen Positionen des selben Signalverlaufs (hier in einem Bild). Abb. 2-18 veranschaulicht schematisch den Ablauf einer Autokorrelation. Die Autokorrelation ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit. Während dieser wird ein Bild an verschiedenen Stellen mit sich selbst zur Deckung gebracht und der Grad der Deckungsgleichheit wird als Korrelationskoeffizient ausgedrückt. Diese lassen sich in einem Autokorrelogramm visualisieren.

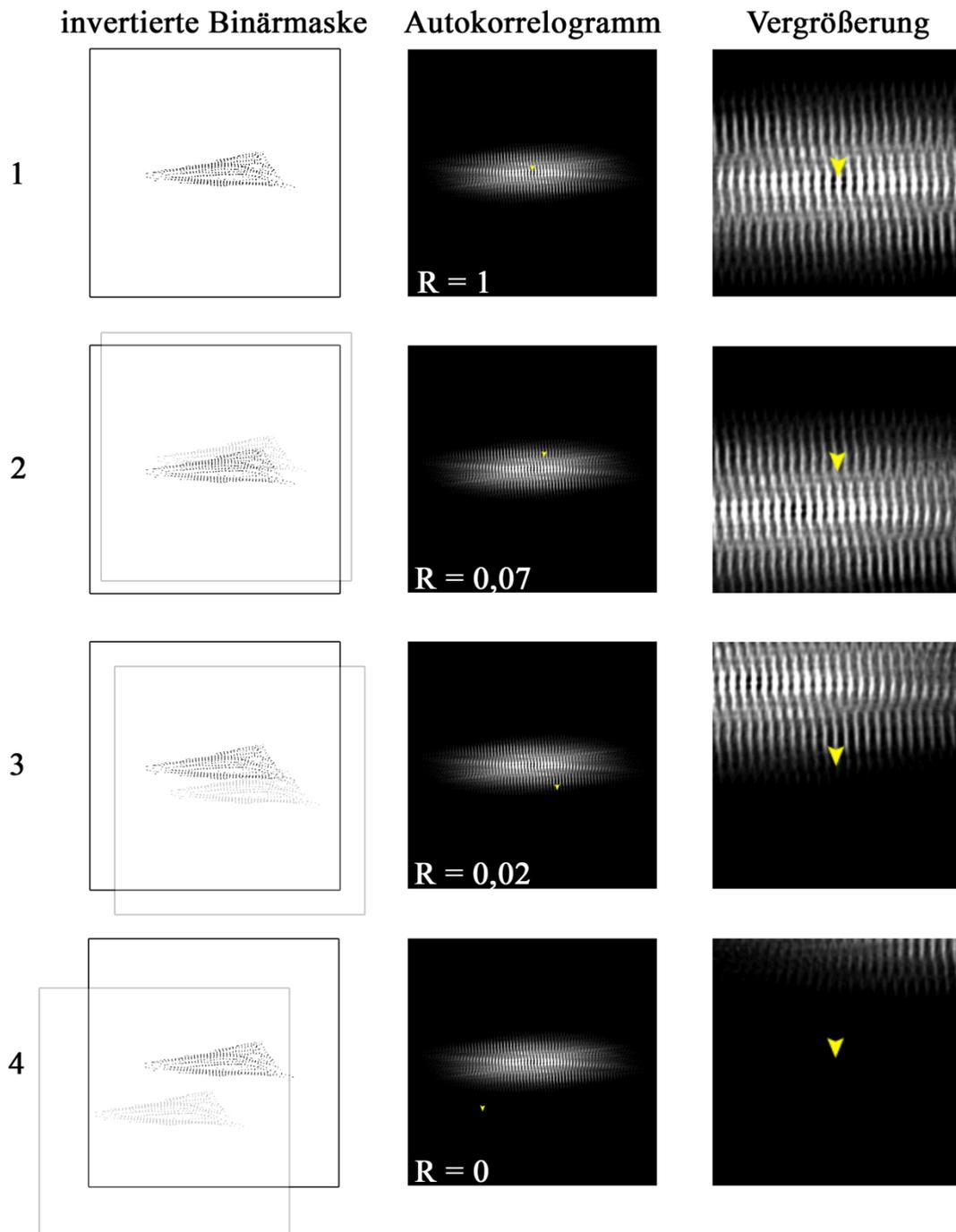


Abb. 2-17: Schematische Darstellung der Autokorrelation einer α -Actinin Binärmaske. Bild und Abbild wurden zur Veranschaulichung invertiert. Anhand der Position und der Intensität der Bildpunkte im Autokorrelogramm lässt sich der Grad der Übereinstimmung von Bild und Abbild im relativen Abstand zueinander ablesen (gelbe Pfeile). Der höchste Korrelationskoeffizient (R) wird bei absoluter Deckungsgleichheit der beiden Bilder erreicht. In diesem Fall ist $R = 1$ und wird im Autokorrelogramm als weißer Punkt im Bildmittelpunkt dargestellt (Beispiel 1). Durch die relative Änderung der Bildpositionen zueinander ändert sich deren Deckungsgrad und R sinkt (Beispiele 2 & 3) bis er schließlich auf $R = 0$ fällt (Beispiel 4).

Dort entspricht ein heller Bildpunkt einer hohen Übereinstimmung zwischen Bild und Abbild und der höchste Wert bzw. hellste Bildpunkt wird für die absolute Deckungsgleichheit der beiden Bilder erreicht (Beispiel 1). Wird das Abbild in eine beliebige Richtung verschoben ändert sich der Deckungsgrad der im Bild enthaltenen Strukturen und der Koeffizient sinkt (Grauwert des Bildpunktes nimmt ab, Beispiel 2). Je weniger Übereinstimmung zwischen den beiden Bildern herrscht, desto kleiner wird der Koeffizient (Beispiel 3) bis es schließlich zur vollständigen Deckungsungleichheit kommt, welche sich im Autokorrelogramm anhand des schwarzen Bereichs erkennen lässt ($R = 0$, Beispiel 4). Zur Verringerung des Rechenaufwandes wurde die Autokorrelation mittels Fouriertransformation im Frequenzraum unter Verwendung der Implementierung „FFT-math“ in ImageJ durchgeführt.

Anschließend wurde das resultierende Bild polartransformiert, indem die Grauwertprofile des Autokorrelogramms entlang einer vom Bildmittelpunkt ausgehenden und um 180° rotierenden Linie (Abb. 2-19B) erfasst und zeilenweise untereinander dargestellt wurden (Abb. 2-19C). In dem so erhaltenen Bild entsprachen Bildpunkte entlang der Ordinate einer Winkelgröße von 1° , die Position der Bildpunkte entlang der Abszisse gaben den Radius und somit die Entfernung vom Bildmittelpunkt im Autokorrelogramm an. Es genügte eine Halbumdrehung der rotierenden Linie, da das Autokorrelogramm seinem Mittelpunkt punktsymmetrisch ist. Innerhalb des polartransformierten Autokorrelogramms wurde über eine vertikale Linie in einem 1,5 bis 2,5 μm weiten Abstand von der Ordinate entsprechend der typischen Sarkomerbreite (Silbernagl & Despopoulos, 2012) ein Linienprofil erstellt (Abb. 2-19C, D). Anhand des Linienprofils ließ sich die Abhängigkeit des R vom Rotationswinkel φ auf der Längenskala eines Sarkomers bestimmen. Der Winkel mit der höchsten Korrelation (φ_{max}) entsprach gleichzeitig der Vorzugsrichtung der Myofibrillen relativ zur Hauptachse der Zelle. Anhand der Verteilung ließ sich ein Richtungsparameter bestimmen, der Aufschluss über das Maß der Anisotropie der Myofibrillen gab. Dazu wurden alle Korrelationskoeffizienten über einen Bereich von $\pm 15^\circ$ um φ_{max} (Abb. 2-19D) gemittelt und durch den Mittelwert der verbleibenden Werte geteilt. Der Quotient der beiden Werte wurde als „Direktionalität“ (D) definiert:

$$D = \frac{\frac{1}{31} \sum_{n = \varphi_0 - 15}^{n = \varphi_0 + 15} R_n}{\frac{1}{149} \left(\sum_{n = 0}^{n = 180} R_n - \sum_{n = \varphi_0 - 15}^{n = \varphi_0 + 15} R_n \right)}$$

Als Maß für die Regelmäßigkeit der Sarkomerausprägung und somit für die innere Organisation des Zytoskelett wurde entlang der Winkels mit der höchsten Korrelation ein weiteres Linienprofil erstellt (Abb. 2-19C, E). Von diesem ließ sich ein „Periodizitätsparameter“ (P) ableiten, indem die Amplitude der ersten vollständigen Oszillation bestimmt wurde. Dafür wurde der Mittelwert der ersten beiden lokalen Minima vom lokalen Maximum der ersten Schwingung subtrahiert (Abb. 2-19E) und die Position des ersten Scheitelwertes entsprach der Sarkomerlänge. Die Anzahl der vollständigen Oszillationen wurde gezählt und als „Reichweite“ (RW) definiert. Dieser Wert gab Aufschluss über die Persistenz der Sarkomerstrukturen entlang der Hauptausrichtungsachse der Myofibrillen.

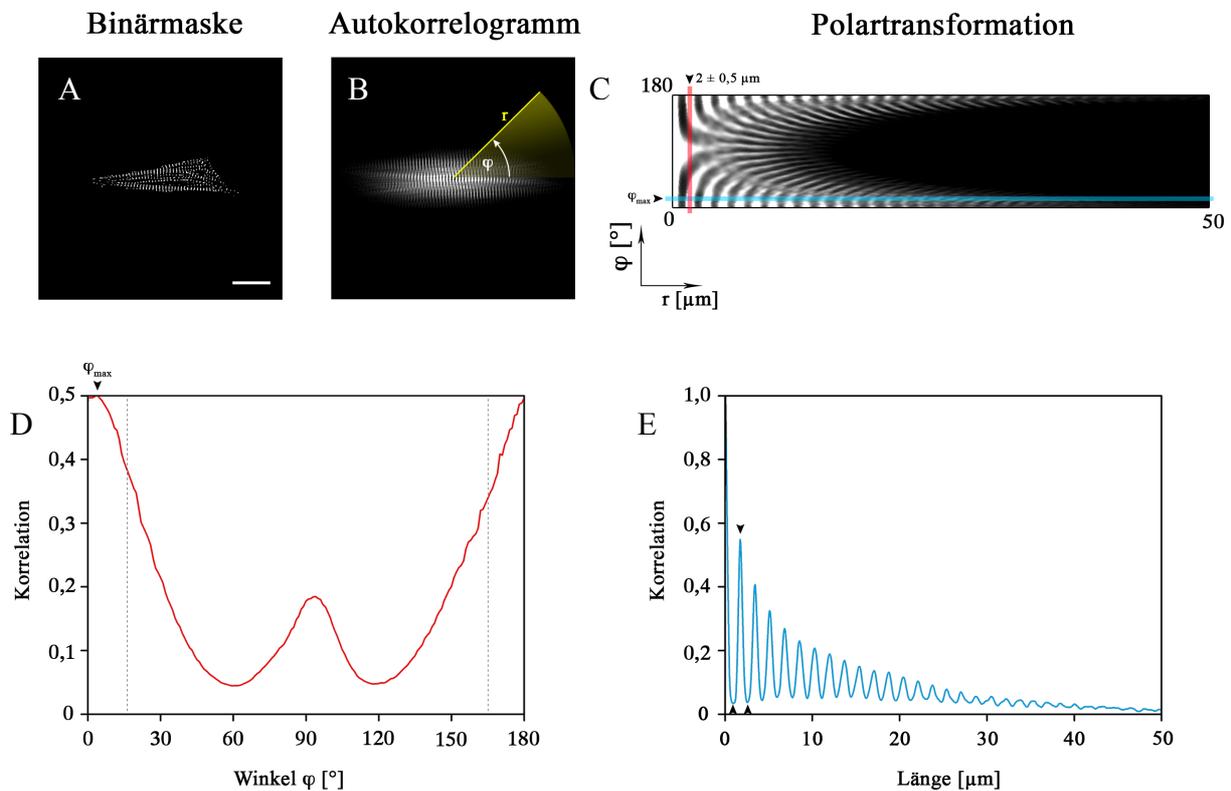


Abb. 2-18: Bildanalyse segmentierter Sarkomermasken zur Bestimmung von Strukturparametern. Die Binärmasken des α -Actinin Signals (A) wurden autokorreliert (B) und anschließend polartransformiert (C). Der Winkel des höchsten Korrelationskoeffizienten wurde durch ein Linienprofil mit dem Abstand einer Sarkomerbreite zum Ursprung bestimmt (rote Linie, C&D). Auf Höhe des φ_{max} wurde im transformierten Autokorrelogramm ein weiteres Linienprofil erstellt, um die Periodizität und Persistenz der Sarkomerstrukturen entlang der Hauptausrichtungsachse zu bestimmen (blaue Linie, C&E).

3. Ergebnisse

3.1. Zellspezifische Trennung mittels fusogener Liposomen

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem das koordinierte Verhalten von Kardiomyozyten in mehrzelligen, geordneten Systemen untersucht werden. Dazu war zunächst die Gewinnung einer möglichst reinen Monokultur notwendig. Die Anreicherung erfolgte hierbei über ein auf Fusionsliposomen basierendem System, welches am Institut für komplexes Systeme 7 entwickelt wurde (Csiszár et al., 2014; Kleusch et al., 2012; Naumovska et al., 2014). Mit diesem wurden zunächst die Plasmamembranen aller Nicht-Kardiomyozyten durch Einbau einer Biotin-Gruppe modifiziert und anschließend mittels magnetassoziierter Zellsortierung von der Kardiomyozytenfraktion getrennt. Die zellspezifische Modifizierung wurde zunächst anhand adhärent wachsender Zellen verifiziert. Dazu wurden Zellen einer Mischkultur der Primärisolation auf Glassubstraten ausgesät und einen Tag lang kultiviert. Innerhalb dieser Zeit konnten die Zellen fest an ihrem Substrat adhären. Die Zellen wurden für 10 min mit 0,5 nM des Calcium-Indikator Fluo4-AM beladen, um spontan kontrahierende Kardiomyozyten sichtbar zu machen. Während dieser Kontraktionen ließ sich durch Calcium-Einstrom ein Intensitätsanstieg des Fluoreszenzsignals detektieren, wodurch sich die Herzmuskelzellen deutlich von den ruhenden Nicht-Muskelzellen abhoben. Abschließend wurde den Zellen unter dem Mikroskop die in 2.1.4. beschriebene Lipidlösung hinzugegeben und der zeitliche Verlauf des Fusionsereignisses analysiert. Der Nachweis von Fusionsereignissen erfolgte über das fluoreszierende lipophile Markermolekül DiR. Nach Zugabe der Fusionsliposomen sedimentierten diese langsam auf die adhären Zellen. Bereits nach weniger als 1,5 min ließen sich anhand einer punktuellen Rotfärbung der Plasmamembranen in verschiedenen Arealen die ersten Fusionsereignisse erkennen (Abb. 3-1). Diese nahm im weiteren Verlauf weiterhin zu (t_3), bis schließlich die gesamten Plasmamembranen aller Nicht-Muskelzellen vollends rot markiert waren (t_4). Der gesamte Prozess dauerte bei den hier verwendeten adhären Zellen ca. 4 min. Das unterschiedliche Fusionsverhalten wurde genutzt, um Zellen der Mischkultur in Suspension mit biotinylierten Liposomen zu fusionieren. Es konnte jedoch bereits für andere Zelltypen gezeigt werden, dass die Fusion in Suspension weitaus schneller abläuft und Inkubationszeiten dieser Größenordnung sogar schädlich für die Zellen sein können. Daher wurde das Protokoll für die Markierung der isolierten Primärzellen gekürzt.

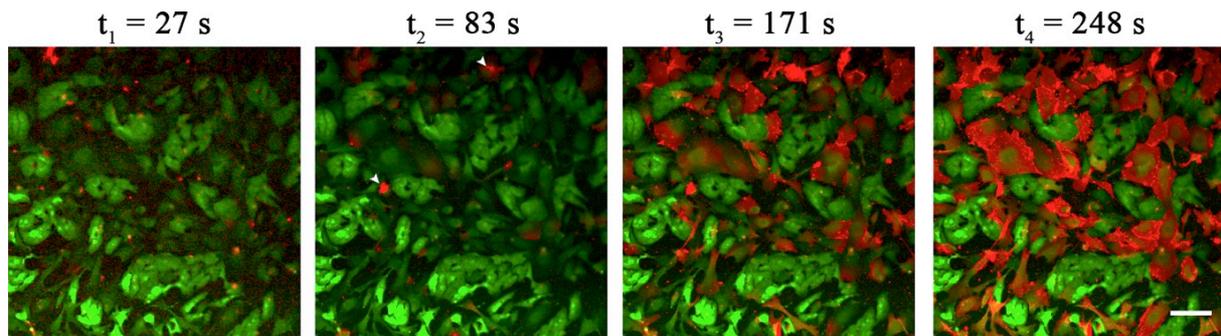


Abb. 3-1: Lebendzellmikroskopische Analyse der zellspezifischen Markierung adhärenter Nicht-Muskelzellen mittels fusogener Liposomen. Schlagende Kardiomyozyten wurden durch Beladung mit dem Calcium-Indikator Fluo4-AM (grün) gefärbt. Der Nachweis von Fusionsereignissen erfolgte über das fluoreszierende lipophile Markermolekül DiR (rot). Die Zeitreihe zeigt deutlich, dass die Fusion der rot markierten Liposomen ausschließlich mit Zellen ohne grünes Hintergrundsignal erfolgte. Erste Fusionsereignisse waren bereits 83 Sekunden nach Zugabe der Fusionslösung erkennbar (weiße Pfeilspitzen). Im weiteren Verlauf fusionierten schließlich alle Nicht-Muskelzellen und wiesen zu Ende der Analyse eine homogene Rot-Färbung ihrer Plasmamembran auf. Für die Darstellung wurde zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses das Fluoreszenzsignal des Calciumfarbstoffs über zehn Kontraktionen gemittelt. Maßstab = 100 μm

Die fusionierten nicht-myozytären Zellen wurden mit Anti-Biotin-Antikörper-konjugierten Mikrokugeln markiert und in einem Magnetfeld von den nicht-fusionierten Kardiomyozyten getrennt. Die separierten Zellfraktionen wurden getrennt voneinander auf Glassubstraten für 1 und 6 Tage kultiviert. Zur Analyse der so aufgereinigten Zellen dienten immunhistochemische und fluoreszenzmikroskopische Verfahren, die Datenauswertung erfolgte über eine eigens programmierte Bildverarbeitungsroutine. In allen untersuchten Zellen wurden neben den Zellkernen auch die beiden zytoskelettalen Proteine Aktin und α -Actinin fluoreszierend markiert. Aktin ist ein ubiquitär exprimiertes Protein und diente zur Erfassung aller Zellkörper, die Markierung des sarkomerspezifischen α -Actinins ermöglichte die Identifizierung der Herzmuskelzellen im analysierten Bildausschnitt.

Abb. 3-2 zeigt den Kardiomyozytenanteil der verschiedenen Zellfraktionen. Die Mischkultur wurde unmittelbar nach erfolgter Zellisolation ohne Zugabe von Fusionsliposomen auf Glassubstrate ausgesät und für 1 und 6 Tage bei regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Nach eintägiger Kultivierung konnte für die Mischkultur ein Myozytenanteil von $40 \pm 15\%$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) ermittelt werden und war mit den von anderen Gruppen bereits ermittelten Wert vereinbar (30 bis 56%; Banerjee, Fuseler, Price, Borg, & Baudino, 2007; Zak, 1974). Im differenzierten Zustand verlieren Kardiomyozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation. Im Gegensatz dazu sind die restlichen aus der Primärisolation stammenden Zelltypen weiterhin zur Teilung in der Lage und überwuchsen nach längerer Kultivierung die

Herzmuskelzellen. Somit sank deren prozentualer Anteil in der Mischkultur nach 6 Tagen auf $11 \pm 4\%$. An dieser Stelle wird deutlich, dass die Verwendung einer aufgereinigten Myozytenkultur für die Arbeit mit multizellulären Systemen über mehrere Tage unumgänglich war. Da auch einige Myozyten während der Aufreinigung in der Säule zurückgehalten wurden, konnte auch in der Retentatfraktion noch ein geringer Anteil an Kardiomyozyten nach erfolgter Zellseparation nachgewiesen werden. Einen Tag nach Aussaat belief sich der Myozytenanteil auf $24 \pm 7\%$, welcher jedoch ähnlich zur Mischkultur nach sechs Tagen stark abnahm ($9 \pm 8\%$). Im Gegensatz dazu ließ sich in der Eluatfraktion eine deutliche Anreicherung von Kardiomyozyten verzeichnen. Einen Tag nach Aussaat betrug deren Anteil im Mittel $74 \pm 7\%$. Für eine Probe ließ sich sogar ein Myozytengehalt von 88% nachweisen und auch nach sechs Tagen belief sich dieser Wert im Mittel noch auf $68 \pm 14\%$. Daraus geht hervor, dass die in der Primärisolation enthaltenen Myozyten erfolgreich angereichert werden konnten und es selbst am sechsten Tag nicht zu einem starken Überwachsen durch andere Zelltypen kam.

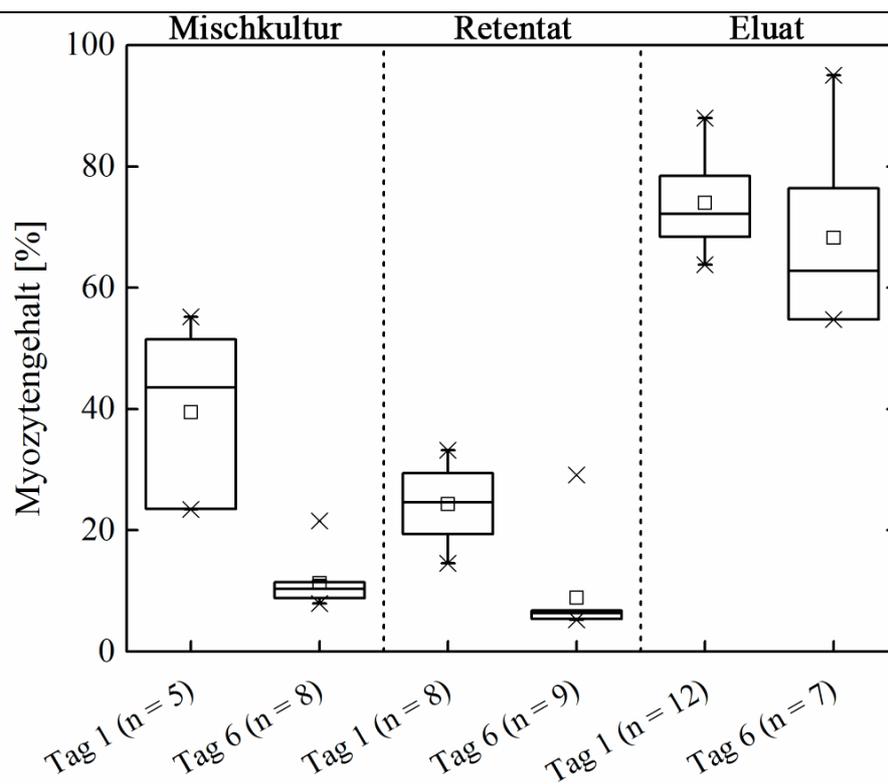


Abb. 3-2: Myozytengehalt der verschiedenen Zellfraktionen nach 1 und 6 Tage Kultivierung; n = Anzahl unabhängiger Versuche, Quadrat = Mittelwert, horizontale Linie = Median, Box = 25%-bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer

3.2. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten

Die Kopplung chemischer Signale in Form von Calcium-Einstrom und mechanischer Kontraktion stellt eine der entscheidenden Mechanismen einer geordneten Kontraktion in Muskelzellen dar. Dennoch wurde auf Einzelzellebene die genaue, zeitlich aufgelöste Korrelation beider Ereignisse bisher nur unzureichend analysiert. Basierend auf ersten Vorexperimenten durch Herrn Kevin Küpper und eines von ihm entwickelten Mess- und Analyseverfahrens konnte auf Einzelzellebene eine Korrelation zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz zwischen der ansteigenden intrazellulären Calciumkonzentration und der resultierenden Zellkontraktion (Δt) aufgezeigt werden. Die Visualisierung des Calciumsignals erfolgte hierbei durch Beladung der Zellen mit dem Calcium-Indikator Fluo4-AM und die Zellkontraktion wurde indirekt über die von ihnen ausgeübte Substratdeformation detektiert. Aus diesen beiden Signalen ließ sich wie unter 2.6.2. beschrieben der zeitliche Versatz bestimmen. Darüber hinaus wurde auf Basis qualitativer Auswertungen von Immunfluoreszenzen ein Zusammenhang zwischen Δt und der Zellmorphologie bzw. der Organisation der Myofibrillen angenommen. Diese Hypothese galt es quantitativ zu erfassen und den Zusammenhang auf unterschiedliche Weise genau zu untersuchen.

3.2.1. Zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion auf Einzelzellebene

Basierend auf insgesamt 136 Einzelmessungen (114 als Teil dieser Arbeit) wurde in einem ersten Schritt die Kontraktionsfrequenz der Kardiomyozyten mit Δt verglichen. Hierbei zeigte sich, dass Zellen mit einer hohen Kontraktionsfrequenz in der Regel einen niedrigen Δt aufwiesen. Umgekehrt ließ sich für Zellen mit einer niedrigen Schlagrate tendenziell ein höherer Versatz verzeichnen, welcher jedoch von Zelle zu Zelle großer Streuung unterworfen war. Abb. 3-3 zeigt den charakteristischen Verlauf der Korrelationskurve. Die gestrichelten Linien stellen den Median des jeweiligen Analyseparameters dar und unterteilen die einzelnen Messwerte in vier Quadranten. Der Median für die Kontraktionsfrequenz aller 136 Zellen betrug 1,53 Hz ($\mu = 1,57$ Hz, $\sigma = 0,9$ Hz) und der des zeitlichen Versatzes 31 ms ($\mu = 52$ ms, $\sigma = 44$ ms). Zusätzlich wurde durch die unter 2.6.4. beschriebene Strukturanalyse das Aspektverhältnis für jede Zelle bestimmt und als indizierte Farbe im Graphen dargestellt.

Die Medianwerte unterteilen die Messwerte in vier Subpopulationen. Im unteren rechten Quadranten befanden sich Zellen mit hohen Kontraktionsfrequenzen ($> 1,53$ Hz) und niedrigem Δt unterhalb des Medianwertes. Umgekehrt zeigten Zellen mit hohem Δt (zwischen 31 und 216 ms) fast ausschließlich niedrige Kontraktionsfrequenzen ($< 1,53$ Hz, oberer linker Quadrant). Des Weiteren zeigte eine Population ein intermediäres Verhalten mit niedrigen Frequenzen (0,35 bis 1,53 Hz) und niedrigen Δt (16 bis 31 ms, unterer linker Quadrant). Nur wenige Zellen ($n = 8$), die die mediane Kontraktionsfrequenz überstiegen zeigten auch Δt -Werte oberhalb dessen Medians (oberer rechter Quadrant). Um einen ersten Anhaltspunkt über die Abhängigkeit der Korrelation von der Zellform zu erhalten, wurde das Aspektverhältnis jeder Zelle im Graphen farbcodiert. Generell schienen hauptsächlich Zellen mit einem Aspektverhältnis von $> 3,5$ einen niedrigen Δt aufzuweisen. Umgekehrt streute der ermittelte Wert für Δt hauptsächlich zwischen Zellen mit einem niedrigen Aspektverhältnis.

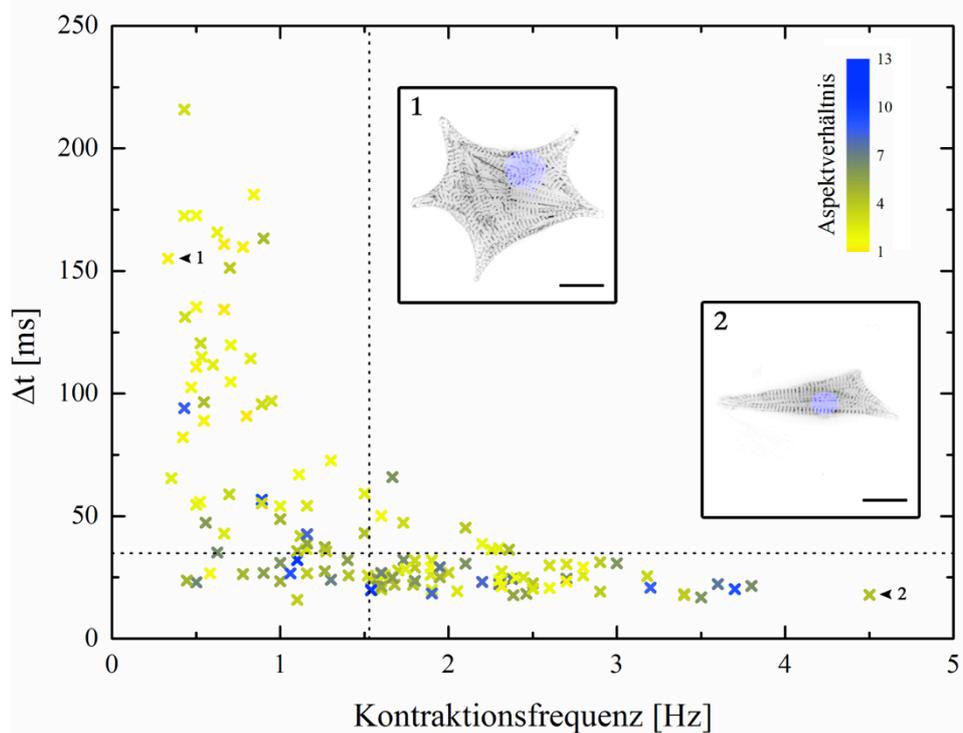


Abb. 3-3: Zusammenhang zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation. Jedes „x“ entspricht einer gemessenen Zelle, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über das Aspektverhältnis der Zelle. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar. Die eingefügten Bilder zeigen invertierte Graustufenbilder der gegen α -Actinin gefärbten Sarkomerstrukturen der beiden Beispielzellen, in blau sind die Zellkerne dargestellt. Maßstäbe = 20 μm

Neben dem Aspektverhältnis konnte aus der Strukturanalyse die Fläche des Zellkörpers extrahiert werden. Hierbei betrug die durchschnittliche Zellgröße $1.517 \mu\text{m}^2$ ($\sigma = 746 \mu\text{m}^2$). Besonders große Flächen wurden nur von Zellen mit einem Aspektverhältnis ≈ 1 bedeckt. Die Zellfläche schien jedoch nicht ausschlaggebend für den zeitlichen Versatz zu sein, obschon Zellen mit einer Größe $> 3.000 \mu\text{m}^2$ ein $\Delta t > 50 \text{ ms}$ aufwiesen.

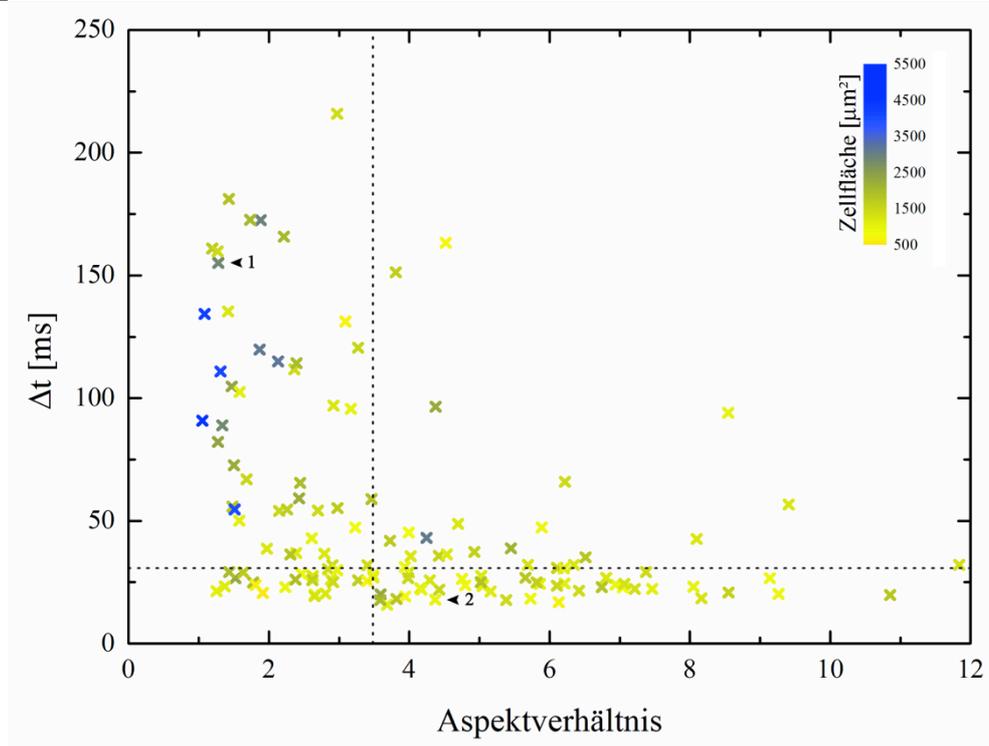


Abb. 3-4: Zusammenhang zwischen dem Aspektverhältnis und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation. Jedes „x“ entspricht einer gemessenen Zelle, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Fläche der Zelle. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar.

3.2.2. Zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion in Abhängigkeit der Zellarchitektur

Sowohl die in Abb. 3-3 und Abb. 3-4 gezeigten Ergebnisse als auch die qualitative Analyse der Zellmorphologie und Sarkomerordnung auf Basis der Immunfärbungen legte einen Zusammenhang zwischen der Zellarchitektur und Δt nahe. Zur Veranschaulichung dienen die in Abb. 3-3 eingefügten Bilder der beiden Beispielzellen. Diese zeigen die Sarkomerstrukturen der Zellen, welche mittels Färbung gegen das in den Z-Banden lokalisierte α -Actinin visualisiert wurden. Der Zellkörper von Zelle 1 zeigt keine Vorzugsrichtung und ihr Aspektverhältnis beträgt 1,28. Auch die Myofibrillen verlaufen teils diagonal, teils entlang der Zellgrenzen. Insgesamt ließe sich ihre innere Organisation somit als

„isotrop“ bezeichnen. In der Analyse wies sie mit 0,33 Hz die niedrigste Kontraktionsfrequenz auf und ihr zeitlicher Versatz betrug 155 ± 14 ms. Im Gegensatz dazu zeigt Zelle 2 eine deutliche Ausrichtung des Zellkörpers mit einem Aspektverhältnis von 4,37 und parallel zur Hauptachse verlaufenden, organisierten Myofibrillen. Diese anisotrope Zelle besaß mit 4,5 Hz die höchste Kontraktionsfrequenz und mit 18 ± 5 ms einen unterdurchschnittlichen Δt .

Die quantitative Bestimmung der Strukturparameter erfolgte über die in 2.6.4. beschriebene Bildverarbeitungsroutine und ermöglichte somit eine objektive Vergleichbarkeit aller analysierten Zellen. Die Regelmäßigkeit der Sarkomerstrukturen wurde mittels Autokorrelation der segmentierten Binärmasken bestimmt (Abb. 2-19). Dazu wurde zunächst die Richtung der größten Selbstähnlichkeit ermittelt (φ_{\max}). Aus der Winkelverteilung wurde zusätzlich die Direktionalität (D) als Richtungsparameter bestimmt und gab Aufschluss über den Grad der Parallelisierung der Myofibrillen. Aus den periodischen Grauwertintensitäten entlang der Hauptkorrelationsachse φ_{\max} wurde der Periodizitätsparameter (P) ermittelt.

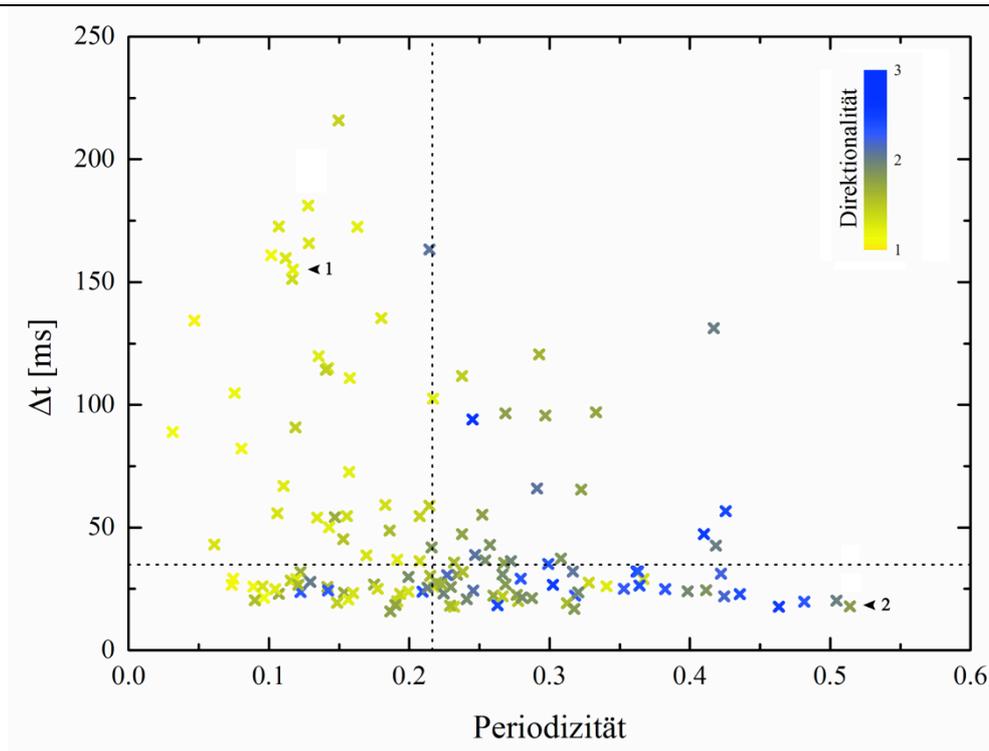


Abb. 3-5: Zusammenhang zwischen der Periodizität und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation. Jedes „x“ entspricht einer gemessenen Zelle, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Direktionalität der Zelle. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar. Die beiden schwarzen Pfeile zeigen die Position der beiden Beispielszellen in der Verteilung.

Dieser ergab sich aus der Amplitude der ersten harmonischen Schwingung entlang des Linienprofils, das unter dem Winkel φ_{\max} vom Mittelpunkt des Autokorrelogramms ausgehend bestimmt wurde. Ein hoher Wert entsprach hierbei einem regelmäßigen und äquidistanten Auftreten benachbarter Sarkomere.

Für alle 136 ausgewerteten Zellen ergab sich ein medianer P von 0,21 ($\mu = 0,23$, $\sigma = 0,11$). Zellen mit einem Δt nahe oder unterhalb des Medianwertes zeichneten sich vorrangig, wenn auch nicht ausschließlich durch hohe D- und P-Werte aus (Abb. 3-5). Niedrige Ordnungsparameter ließen für die unterschiedlichen Zellen eine breitere Verteilung des Δt -Wertes zu. Die Reichweite (RW) der Z-Bandenausprägung wurde als Persistenz entlang der Hauptkorrelationsachse der Zelle gemessen. Dabei wurden alle vollen Oszillationen gezählt, die einen Schwellwert von 0,2 für den Korrelationskoeffizienten überschritten. Zellen mit einem RW-Wert oberhalb des Median von 2 wiesen tendenziell einen niedrigeren Δt auf und die Streuung nahm mit zunehmender RW ab (Abb. 3-6). Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis Test mit Dunns Post-hoc Test).

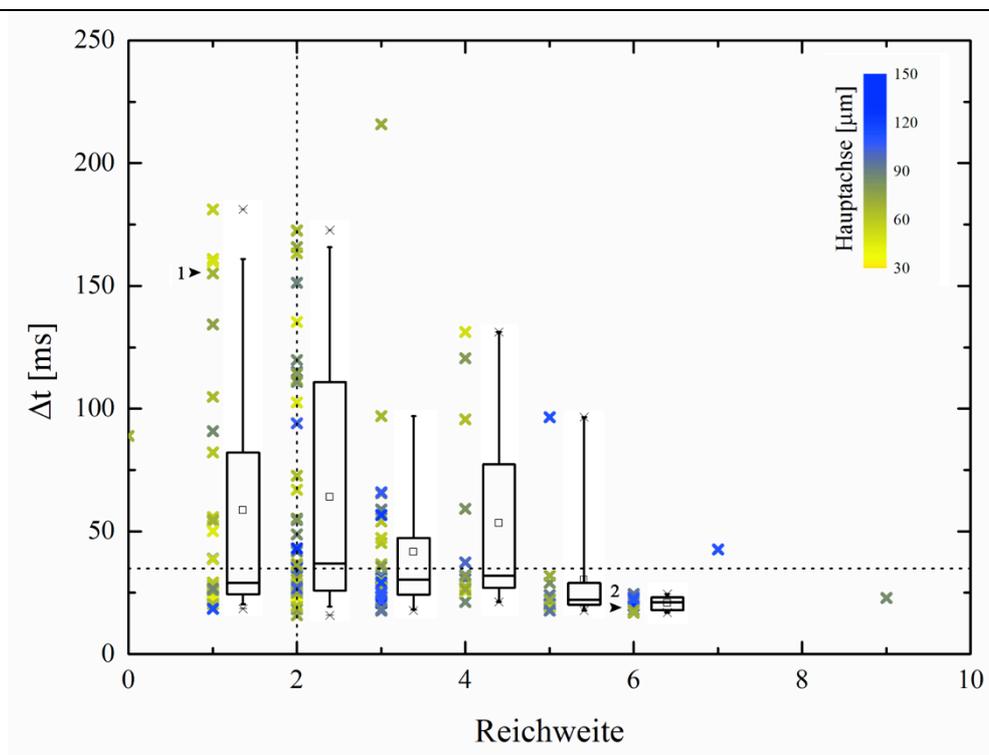


Abb. 3-6: Zusammenhang zwischen der Reichweite und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation. Jedes „x“ entspricht einer gemessenen Zelle, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Länge der Hauptachse der Zelle. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar. Die beiden schwarzen Pfeile zeigen die Position der beiden Beispielzellen in der Verteilung.

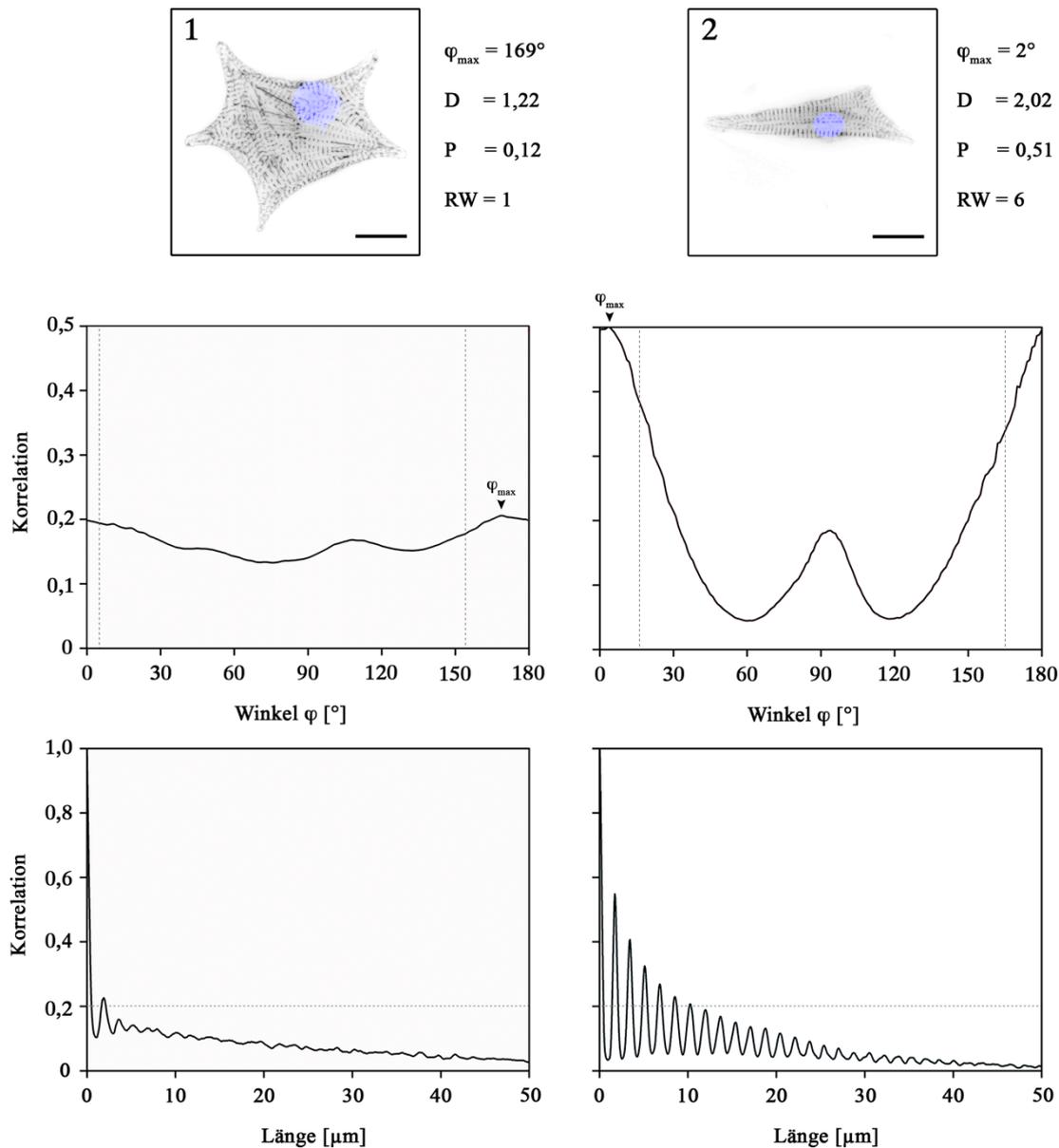


Abb. 3-7: Exemplarische Auswertung der beiden Beispielzellen auf Basis der unter 2.6.4. beschriebenen Strukturanalyse.

Aus den erhobenen Daten ließ sich eine Tendenz für die Abhängigkeit des zeitlichen Versatzes von der Zellarchitektur ableiten und der subjektive Eindruck eines Zusammenhangs zwischen Zellmorphologie und Myofibrillenausrichtung auf Basis einer quantitativen Bildanalyse bestätigen, wenn auch nicht statistisch vollends belegen. Dies legte die Vermutung nahe, dass sich durch die kontrollierte Beeinflussung der Zellform und der daraus resultierenden Ausrichtung der Myofibrillen eine entsprechende Zellantwort hervorrufen lassen müsste.

3.2.3. Zusammenhang zwischen Kontraktionsfrequenz und Calciumsignaldauer

Neben den Zellstrukturparametern wurde zusätzlich die mittlere Signaldauer der Calciumsignale aus den Intensitätsprofilen für alle Zellen berechnet und mit der Kontraktionsfrequenz korreliert (Abb. 3-8). Dazu wurde manuell die Differenz zwischen den Zeitpunkten der Minima vor Beginn und nach Ende der einzelnen Calciumoszillationen bestimmt und über alle Kontraktionen gemittelt. Die Signaldauer war als die Zeit definiert, die ein einzelnes Calciumsignal benötigte, um von seinem lokalen Minimum auf sein Maximum anzusteigen und wieder auf das folgende lokale Minimum zu fallen. Zellen mit einem lang anhaltenden Calciumsignal wiesen relativ niedrige Kontraktionsfrequenzen auf und umgekehrt. Dieser Zusammenhang stand im Einklang mit dem reziproken Verhältnis zwischen Frequenz und Periodendauer regelmäßig auftretender Signale. Nichtsdestotrotz schöpften manche Zellen dieses Potenzial zu einer schnelleren Kontraktion nicht vollends aus (Messwerte unterhalb der grauen Linie). Durch die Medianwerte der Analyseparameter und die zusätzliche farbliche Kodierung des Δt der einzelnen Messpunkte manifestierten sich zwei Populationen innerhalb der Verteilung: zum einen Zellen mit langer Signaldauer ($> 0,61$ s), niedriger Frequenz ($< 1,53$ Hz) und hohem Δt und zum anderen solche Zellen mit kurzer Signaldauer, hoher Frequenz und niedrigem Δt .

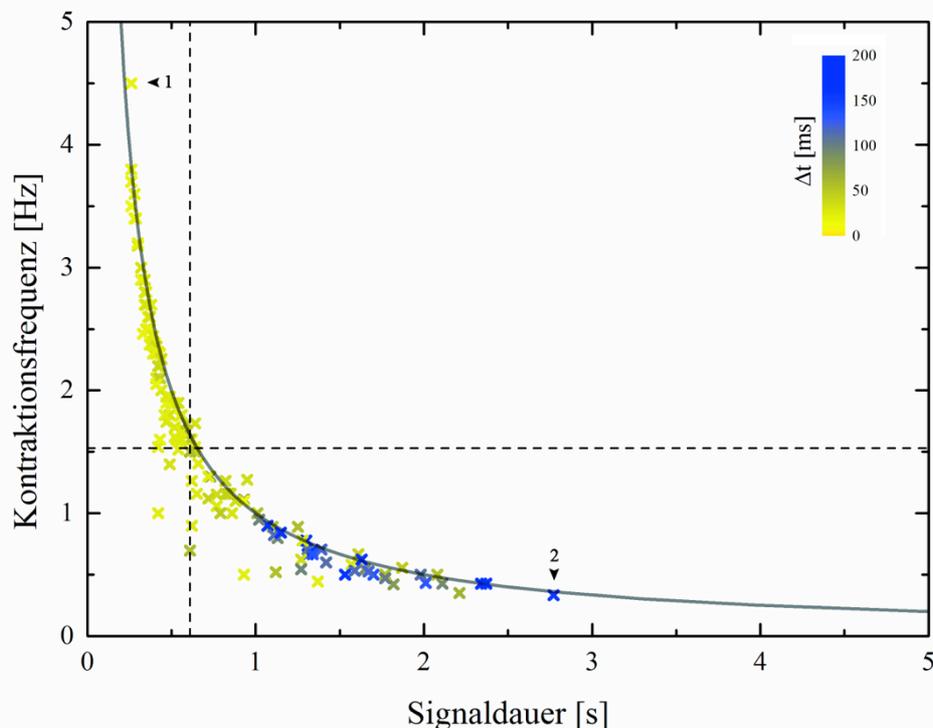


Abb. 3-8: Zusammenhang zwischen dem Signaldauer und der Kontraktionsfrequenz. Jedes „x“ entspricht einer gemessenen Zelle, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über den Δt der Zelle. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar. Die graue Linie entspricht der Funktion $f(x) = 1/x$.

3.3. Generierung definierter und geordneter, funktioneller Zellformen

Da in den zuvor behandelten Analysen eine Korrelation zwischen Δt und der Zellorganisation aufgezeigt werden konnte, wurde eine direkte Abhängigkeit der beiden Parameter vermutet. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde eine im Institut entwickelte Technik zur Konditionierung weicher Analysesubstrate durch gezielte Physisorption von Extrazellulärmatrix-Proteinen verwendet (siehe 2.3.2.). Dazu wurden Schablonen aus Epoxid-Lochfolien hergestellt, durch deren Aussparungen das EZM-Protein Fibronectin in definierten Bereichen auf den weichen Analysesubstraten gebunden werden konnte. Nach Entfernung der überschüssigen Proteinlösung wurde die Schablone rückstandsfrei entfernt und unbeschichtete Bereiche des Silikonkautschuks mit einem Blockcopolymer passiviert, wodurch die Adhäsion von Zellen außerhalb der generierten Proteininseln verhindert wurde. Für die Untersuchung des Einflusses der Zellform auf den zeitlichen Versatz und das Kontraktionsverhalten wurden frisch isolierte, differenzierte Kardiomyozyten in sechs Formen gebracht. Dazu zählten unter anderem ein Kreis mit einem Durchmesser von $44 \mu\text{m}$ (Fläche $1.521 \mu\text{m}^2$), ein gleichseitiges Dreieck mit einer lateralen Länge von $60 \mu\text{m}$ (Fläche $1.559 \mu\text{m}^2$) und ein Quadrat mit einer Kantenlänge von $39 \mu\text{m}$ (Fläche $1.521 \mu\text{m}^2$). Neben diesen Formen, die alle ein Aspektverhältnis von 1 aufwiesen, wurden drei Rechtecke mit unterschiedlichen Kantenlängen und zunehmenden Aspektverhältnissen konzipiert. Ihre Abmessungen betragen $20 \mu\text{m} \times 75 \mu\text{m}$ ($1.500 \mu\text{m}^2$), $17 \mu\text{m} \times 86 \mu\text{m}$ ($1.462 \mu\text{m}^2$) und $15 \mu\text{m} \times 104 \mu\text{m}$ ($1.560 \mu\text{m}^2$). Alle Formen wurden so gewählt, dass den Zellen eine nahezu gleich große Adhäsionsfläche zur Verfügung stand.

3.3.1. Kontrollierbare und reproduzierbare Zellausrichtung

Abb. 3-9 zeigt exemplarisch die sechs unterschiedlichen Zellformen, die nach Adhäsion und vollendetem Spreiten der Zellen von diesen angenommen wurden. Die Sarkomerstrukturen wurden mittels Färbung gegen α -Actinin visualisiert und der Verlauf der Myofibrillen ließ sich anhand der durch die Z-Banden hervorgerufenen Querstreifung erkennen. Durch Überlagerung der Binärmasken aller Zellflächen einer Gruppe ließ sich die gute Reproduzierbarkeit der Zellformausprägung erkennen. Die durchschnittlichen Zellflächen gaben zusätzlich Aufschluss darüber, wie formtreu die Zellen ihre Adhäsionsstrukturen auswuchsen. Auffällig war an dieser Stelle, dass für keine der generierten Zellformen die von der Schablone vorgegebene Fläche erreicht und stattdessen mit Werten zwischen 1.072 und $1.256 \mu\text{m}^2$ um 11-20% unterschritten wurde. Dieser Punkt wird in Kapitel 4 diskutiert.

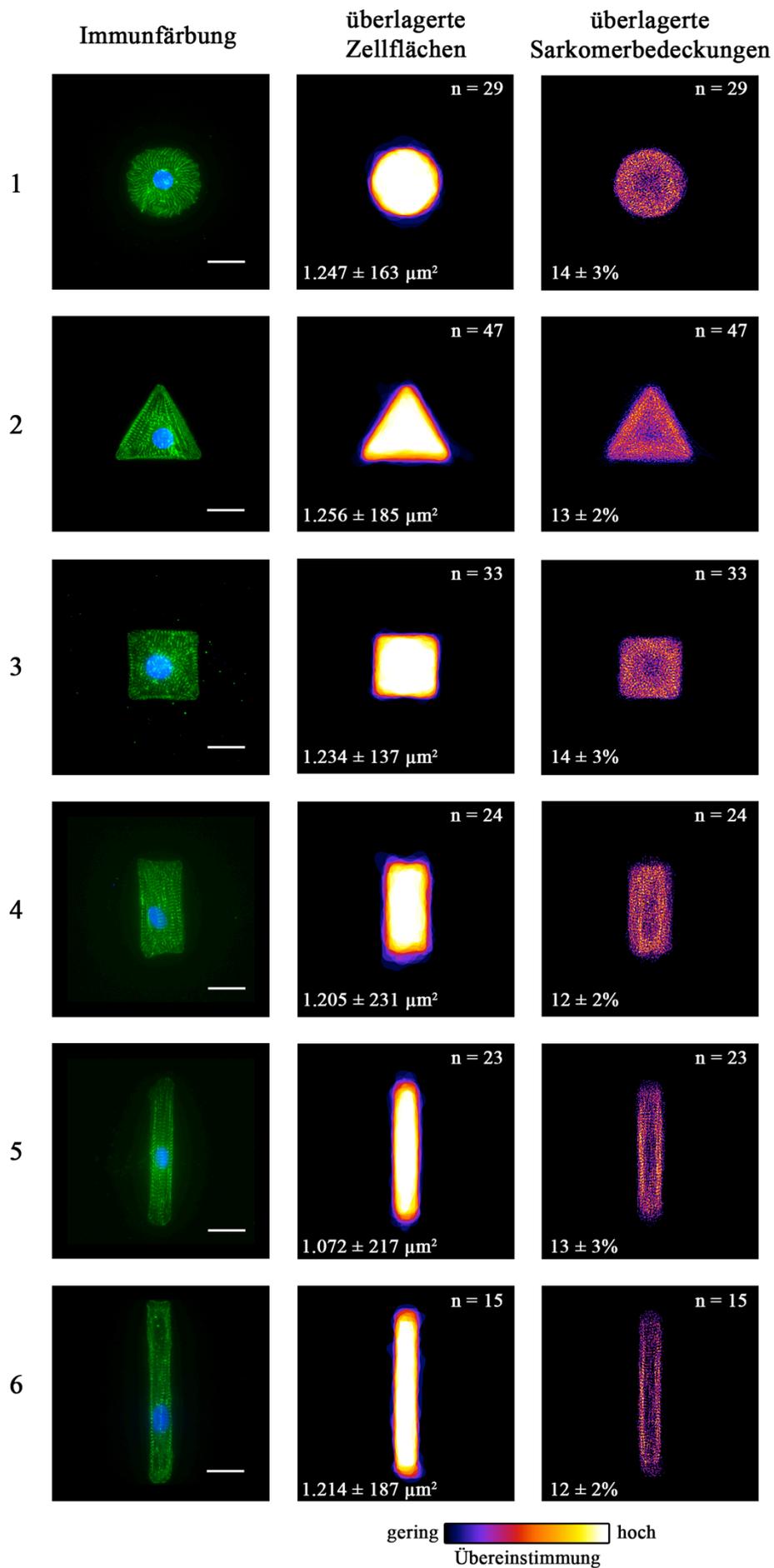


Abb. 3-9: Differenzierte Kardiomyozyten in sechs unterschiedlichen, künstlich erzeugten Zellformen. Die Zellen wurden unmittelbar nach ihrer Isolation auf die konditionierten Substrate ausgesät und füllten nach Sedimentation die ihnen gebotenen Adhäsionsflächen im Verlauf des Spreitvorgangs aus. Durch chemische Passivierung des restlichen Substrats blieben die Zellen innerhalb ihrer vorgegebenen Grenzen und überwucherten diese selbst nach mehreren Tagen in Kultur nicht. Die Färbung der quergestreiften Myofibrillen durch Markierung der Sarkomerstrukturen (α -Actinin, grün) veranschaulicht die Ausrichtung des Zytoskeletts in Abhängigkeit der Zellform. Durch die Überlagerung aller Binärmasken der Zellflächen (Mitte) ließ sich die Reproduzierbarkeit der Zellformausprägung ermitteln. Gleiches wurde für die Binärmasken der segmentierten Sarkomerstrukturen durchgeführt (rechts). Dieses gab Aufschluss über die dominierende Lokalisation der Myofibrillen. Der Grad der Übereinstimmung lässt sich in beiden Fällen anhand der Farbskala ablesen. Die hell eingefärbten Bildpunkte stellen Bereiche hoher Übereinstimmung zwischen allen Masken dar. Die eingefügten Zahlen entsprechen den mittleren Zellflächen bzw. mittleren Bedeckungsgraden der Sarkomere \pm deren Standardabweichungen; n = Anzahl der in der Mittelung enthaltenen Masken. Maßstäbe = 20 μ m

Die Beispiele 1 bis 6 in Abb. 3-9 zeigen repräsentative Zellen der einzelnen Gruppen. In allen Fällen ließ sich der Verlauf der Myofibrillen entlang der Zellgrenzen erkennen, wobei diese im Quadrat zwar teilweise den Zellkörper diagonal durchspannten, mit zunehmendem Aspektverhältnis der rechteckigen Zellen jedoch in eine Parallelisierung entlang der Hauptachse übergingen (Abb. 3-9, Bsp. 3 bis 6). In der runden Zelle verliefen sie hauptsächlich ringförmig um den Zellmittelpunkt (Abb. 3-9, Bsp. 1), in wenigen Zellen jedoch auch ohne Vorzugsrichtung durch den Zellkörper. In der dreieckigen Zelle (Abb. 3-9, Bsp. 2) orientiert sich das Zytoskelett ebenfalls an den Zellgrenzen und die Myofibrillen bündelten sich in den spitzen Winkeln der Zelle. Diese Verteilung bestätigte sich auch anhand der Überlagerung aller Binärmasken der segmentierten Sarkomerstrukturen und erwies sich somit für jede Zellform als charakteristisch. Hier zeigte sich für die Gruppen 1 bis 3 die höchste Übereinstimmung der Sarkomermasken an den Zellgrenzen. Bei zunehmendem Aspektverhältnis richteten sich die Myofibrillen entlang der Hauptachse der rechteckigen Zelle aus (Gruppen 4 bis 6). Darüber hinaus ließ sich deutlich erkennen, dass die Zentren der Zellen aller Gruppen weitestgehend frei von Sarkomeren waren. Diese Bereiche waren den Zellkernen vorbehalten. Aus den binären Sarkomermasken wurde für jede Gruppe zusätzlich der Bedeckungsgrad der Z-Banden ermittelt. Trotz unterschiedlicher Größe und Form blieb dieser Wert im Bereich zwischen $12 \pm 2\%$ und $14 \pm 3\%$ für jede Gruppe nahezu konstant. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich mithilfe der hier verwendeten Methode zur Substratkonditionierung Zellen reproduzierbar in definierte Strukturen bringen ließen und diese somit für die Kontrolle der Zellgeometrie und der damit einhergehenden Ausrichtungen der Myofibrillen geeignet war.

3.3.2. Funktionalität definierter und geordneter Zellformen

Neben ihrer Formtreue wurden die sechs Zellformen hinsichtlich ihrer Funktionalität näher charakterisiert. Diese wurde anhand des Calciumsignals und der Substratdeformation bestimmt. Dazu wurden die in ihrer Geometrie kontrollierten Zellen mit dem Calcium-Indikator Fluo4-AM beladen, um somit die Oszillationen der $[Ca^{2+}]_i$ zu visualisieren. Parallel wurde die Substratdeformation anhand fluoreszierender Markerkugeln im elastischen Analysesubstrat verfolgt. Beide Signale wurden simultan erfasst (2.5.2.).

Für jede Form ließen sich funktional intakte Zellen generieren. Die erste und zweite Spalte in Abb. 3-10 zeigen das Signalverhalten der Beispielzellen aus Abb. 3-9. In der ersten Spalte sind die Zellen während eines Intensitätsmaximums (I_{max}) des Calciumsignals dargestellt. Die Zellkörper sind zu diesem Zeitpunkt aufgrund der durch die Bindung des Kations bedingten Emission des Farbstoffs deutlich sichtbar. Nachfolgend dargestellte Kymogramme zeigen von links nach rechts den zeitlichen Verlauf des Calciumsignals entlang einer vertikalen Linie (gelber Pfeil) über die Aufnahmedauer von 10 Sekunden. Dabei ließen sich vielfältige Signalformen erkennen. Beispiel 3 und 5 zeigen ein homogen auftretendes, zu den Enden leicht abfallendes Signal entlang des Linienprofils. In den anderen Beispielen existieren zum Zeitpunkt des I_{max} lokale Intensitätsunterschiede, die sich ebenfalls in den zeitlichen Intensitätsverläufen widerspiegeln. Anhand der Kymogramme wurde darüber hinaus die Variabilität der Kontraktionsfrequenz ersichtlich. Neben zyklisch und regelmäßig auftretenden Calciumsignalen (äquidistante Banden in Kymogramm 4), ließen sich ebenfalls Arrhythmien in Form ausbleibender Banden (Kymogramme 1 und 2) oder Flimmern anhand einer nahezu konstanten Intensität über den gesamten Zeitverlauf (Kymogramm 6) erkennen. Diese Frequenzmuster waren jedoch nicht zellformspezifisch, sondern variierten zwischen den Zellen innerhalb einer Gruppe. Parallel zum Calcium-Imaging erfolgte die Analyse der durch die Zellkontraktion hervorgerufenen Substratdeformation. Dazu wurde für jede Zelle die Verschiebung der eingebetteten fluoreszierenden Kugeln verfolgt und deren Position über die Zeit einer Kontraktionsphase bestimmt. Spalte 3 in Abb. 3-10 zeigen die Mittelung aller Verschiebungsvektorfelder und Spalte 4 die daraus ermittelten Deformationsamplituden für die unterschiedlichen Formen im maximal kontrahierten Zustand der Zellen.

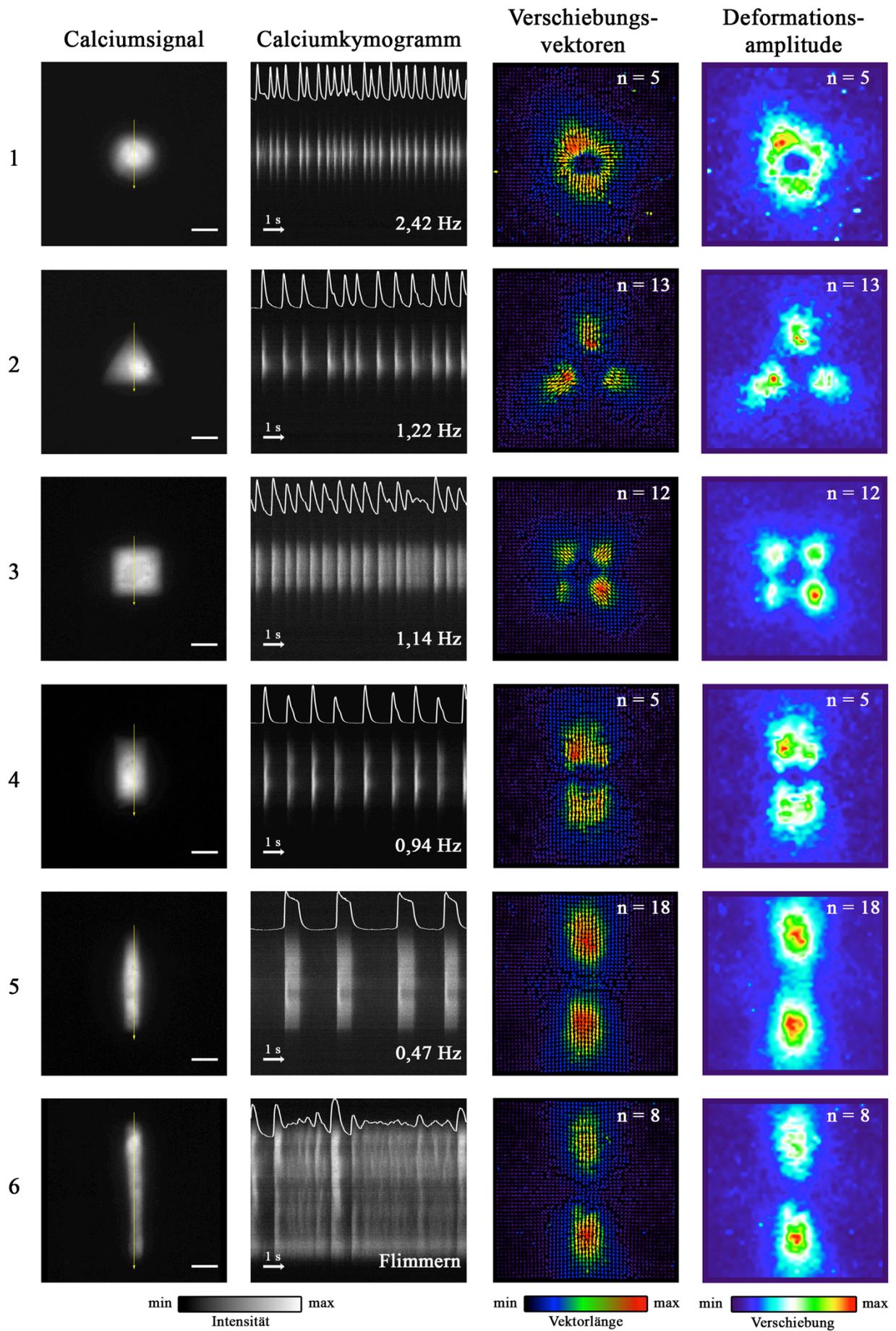


Abb. 3-10: Charakterisierung der Funktionalität kardialer Myozyten in kontrollierten Zellformen auf Basis ihres Calciumsignals und der durch ihre Kontraktion hervorgerufenen Substratdeformation. Die Bilder der ersten Spalte zeigen die Zellen aus Abb. 3-9 zum Zeitpunkt der maximalen Signalintensität. Für jede Zelle wurde die Grauwertintensität entlang eines Linienprofils (gelber Pfeil) mit einer zeitlichen Auflösung von 20 ms über eine Bildsequenz von 10 s ermittelt und alle Zeitpunkte nebeneinander in einem Kymogramm dargestellt. Dunkle Spalten entsprechen einer niedrigen Fluoreszenzintensität während der Diastole einer Zelle. Die Intensität stieg mit zunehmendem Calciumstrom bis zum Intensitätsmaximum während der Systole. Der normierte Intensitätsverlauf ist am weißen Signalprofil abzulesen. Die Frequenz einer Zelle wurde berechnet, indem die Anzahl der Kontraktionen gezählt und durch den Betrag der Differenz zwischen den Zeitpunkten vor der ersten und nach der letzten Kontraktion geteilt wurde. Aus den Positionsunterschieden der fluoreszierenden Kugeln im relaxierten und maximal kontrahierten Zustand wurde für jede Zelle ein Verschiebungsvektorfeld (VVF) berechnet. Dieses wurde entsprechend der Zellflächen zur Deckung gebracht und gemittelt. Die relative Länge der Verschiebungsvektoren wurde zur Veranschaulichung über eine Skala farbindiziert. Aus den VVFs wurde anschließend die Deformationsamplitude bestimmt. n = Anzahl der in der Mittelung enthaltenen Zellen; Maßstäbe = 20 μm

Im Gegensatz zu den Calciumsignalen ließ sich für die einzelnen Zellformen über die Substratdeformation ein charakteristisches Kontraktionsmuster ermitteln. Für kreisförmige Zellen verlief die Deformation ringförmig ins Innere der Zelle gerichtet und war maximal entlang der Geometriegrenzen, die geringste Deformation wurde im Zentrum der Form detektiert (Abb. 3-10, Bsp. 1). Sowohl für das gleichseitige Dreieck als auch für das Quadrat waren die höchsten Verschiebungen an den Eckpunkten lokalisiert und zeigten zum Zentrum der Struktur. Auch hier ließ sich keine Deformation an dieser Stelle verzeichnen (Abb. 3-10, Bsp. 2 und 3). In den Rechtecken befanden sich die Verschiebungsmaxima, anders als bei den vorherigen Zellformen nicht ausschließlich an den Ecken, sondern vielmehr entlang der gesamten Breite der kurzen Seiten und bildeten durch ihre gegenläufige Richtung einen Dipol. Diese beiden Fokusse wurden mit zunehmendem Aspektverhältnis der Rechtecke schmaler. Wie bei den anderen Formen wurde das Substrat im Bereich des Zellmittelpunktes in der Ebene nicht deformiert.

Anhand dieser Ergebnisse ließ sich die Funktionalität der Zellen bestätigen. Die Methode zur Generierung artifizierlicher Zellformen hatte keinen negativen Einfluss auf die Erregbarkeit der Zellen. Diese behielten weiterhin die Fähigkeit zur elektro-mechanischen Kopplung und der daraus resultierenden spontanen Kontraktion und ließen sich somit für weiterführende Untersuchungen verwenden.

3.4. Quantitative Analyse des Signal- und Kontraktionsverhaltens kardialer Myozyten in Abhängigkeit der Zellform

Zur Überprüfung der Arbeitshypothese eines Zusammenhanges zwischen dem zeitlichen Versatz und der Zellarchitektur wurden pränatale, kardiale Myozyten durch die unter 2.3.2 beschriebene Technik zur Konditionierung weicher Analysesubstrate in definierte Formen gebracht und mittels simultaner Zweikanalmessung analysiert (2.5.2). Zusätzlich wurden aus den erhobenen Daten die von den verschiedenen Zellformen generierten kontraktile Zellkräfte ermittelt.

3.4.1. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in definiert adhärenzhaften Kardiomyozyten

Wie in 3.3.1 und 3.3.2 bereits beschrieben waren die insgesamt 64 untersuchten Zellen nach Ausfüllen der für sie vorgesehenen Adhäsionsflächen spontan erregbar und zeigten eine intakte Erregungs-Kontraktionskopplung. Die mediane Kontraktionsfrequenz lag mit 0,74 Hz unterhalb des Wertes für in ihrer Form nicht eingegrenzte Zellen (1,53 Hz, vgl. 3.2.1). Dagegen lag der mediane Δt -Wert mit 38 ms innerhalb der gleichen Größenordnung wie der Median der frei-adhärenzhaften Zellen. Nach Korrelationsanalyse von Kontraktionsfrequenz Δt zeigte sich jedoch, dass die Verteilung geometrisch beeinflusster Zellen der unbeeinflusster Zellen stark ähnelte (Abb. 3-3 vs. Abb. 3-11). Auch hier zeigten Zellen hohe Streuungen des Δt innerhalb der langsam schlagenden Population ($< 0,74$ Hz). Zellen mit einer höheren Frequenz wiesen typischerweise einen geringen Δt auf. Für jede Geometrie ließen sich Zellen der einen oder der anderen Population zuweisen. Betrachtete man ausschließlich Δt in Abhängigkeit der Zellform, so schien es jedoch durchaus einen Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern zu geben (Abb. 3-12). Hierbei schien der Median des Wertes mit zunehmender Anisotropie der Zellen zu steigen ($\Delta t_{\text{Kreis}} < \Delta t_{\text{Dreieck}} < \Delta t_{\text{Quadrat}} < \Delta t_{\text{Rechteck}}$). Eine Ausnahme bildeten dabei die Rechtecke mit dem höchsten Aspektverhältnis. Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu der eingangs formulierten Hypothese. Somit ließ sich vorerst festhalten, dass die Zellform und die damit einhergehende Organisation des Zytoskeletts nicht hauptverantwortlich für das Signal- und Kontraktionsverhalten war, sondern es sich dabei vielmehr um eine den Zellen inhärente Eigenschaft handelte.

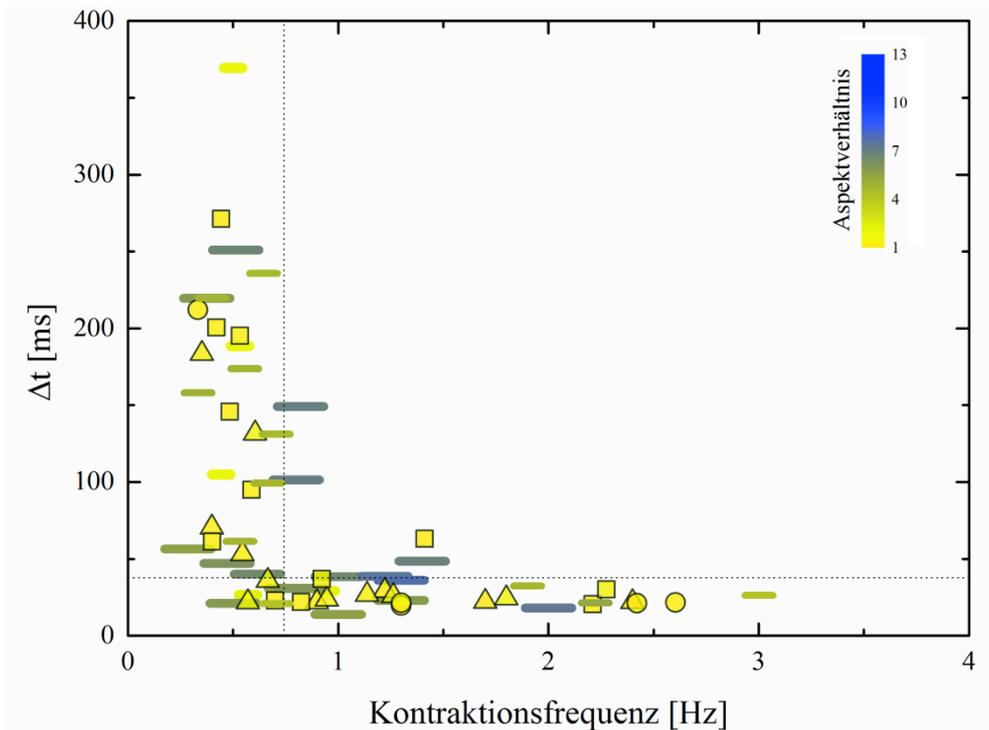


Abb. 3-11: Zusammenhang zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation in Abhängigkeit der Zellform. Jedes Symbol entspricht der Zellform der gemessenen Zelle, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über deren Aspektverhältnis. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des jeweiligen Analyseparameters dar.

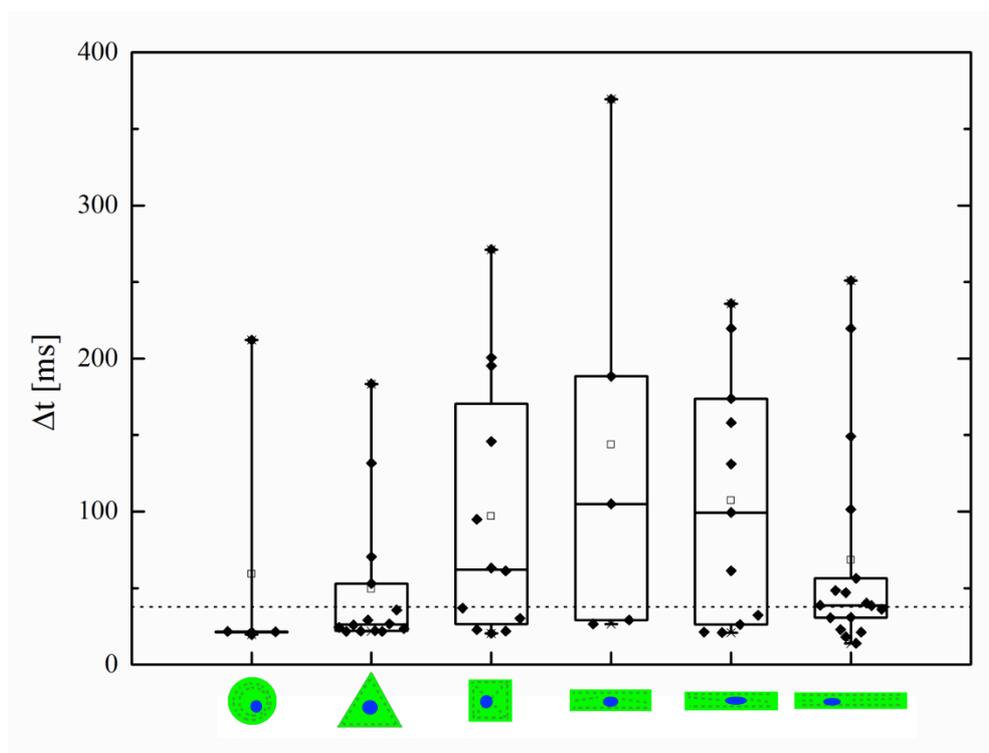


Abb. 3-12: Zeitlicher Versatz (Δt) in Abhängigkeit der Zellform; gestrichelte Linie = Median der Gesamtverteilung, schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%-bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer, Raute = Einzelmessung

3.4.2. Abschätzung der kontraktilen Kräfte kardialer Myozyten mit definierter Zellform

Neben der Korrelationsanalyse zwischen Zellform und Δt wurden die kontraktilen Kräfte der Zellen bestimmt. Dazu wurde aus den erfassten Bildsequenzen wie unter 2.6.3 beschrieben die Substratdeformation während der Kontraktion analysiert und diese unter Berücksichtigung der Materialeigenschaften des Silikonkautschuks (Schichtdicke 80 μm , Poissonzahl 0,5 und einem Young Modul von 15 kPa) in die kontraktilen Kräfte der Zellen umgerechnet. Aufgrund der Komplexität dieses mathematischen Problems handelte es sich dabei allerdings nur um eine Annäherung an die tatsächlichen Zellkräfte. Durch den verwendeten Algorithmus wurde zunächst die Verschiebung der fluoreszierenden Kugeln für jedes Einzelbild der Sequenz mittels Kreuzkorrelation bestimmt. Aufgrund der geringen lateralen Zellgröße ließ sich die Abschätzung der Kräfte auf die analytischen Verfahren von Boussinesq (Boussinesq, 1885) zurückführen. Diese beschreiben hervorgerufene Verschiebungen durch auf die Oberfläche eines Elastomers wirkende Punktkräfte.

Abb. 3-13 zeigt den zeitlichen Verlauf der kontraktilen Kräfte kardialer Myozyten, die in ihrer Zellform definiert wurden. Die durchschnittliche Kontraktionsstärke entsprach dem Mittelwert aller Einzelkontraktionen innerhalb der gesamten Bildsequenz. Die dargestellten Signalverläufe verdeutlichen die Heterogenität des Kontraktionsverhaltens der unterschiedlichen Zellen. Dabei variierten die Kontraktionsfrequenzen und -Kräfte unabhängig von der Geometrie. Die gezeigten Kontraktionsprofile waren damit nicht charakteristisch für die Zellform. Es existierten sowohl Zellen mit hoher Frequenz und hoher Kontraktionskraft als auch schnell schlagende Zellen mit geringen Kräften und umgekehrt. Mit abnehmender Kontraktionsfrequenz vergrößerte sich wie im Fall der Periodendauer des Calciumsignals die Kontraktionsdauer. Manche Zellen zeigten zunächst einen rapiden Anstieg, gefolgt von einem kurzen, steilen Abfall ihrer Kontraktionskraft und erreichten vorübergehend eine tonische Phase in der sie die Zellspannung aufrecht erhielten, bevor sie schließlich relaxierten. Dies äußerte sich im Kontraktionsprofil als Plateauphase vor Vollendung des Signalabfalls.

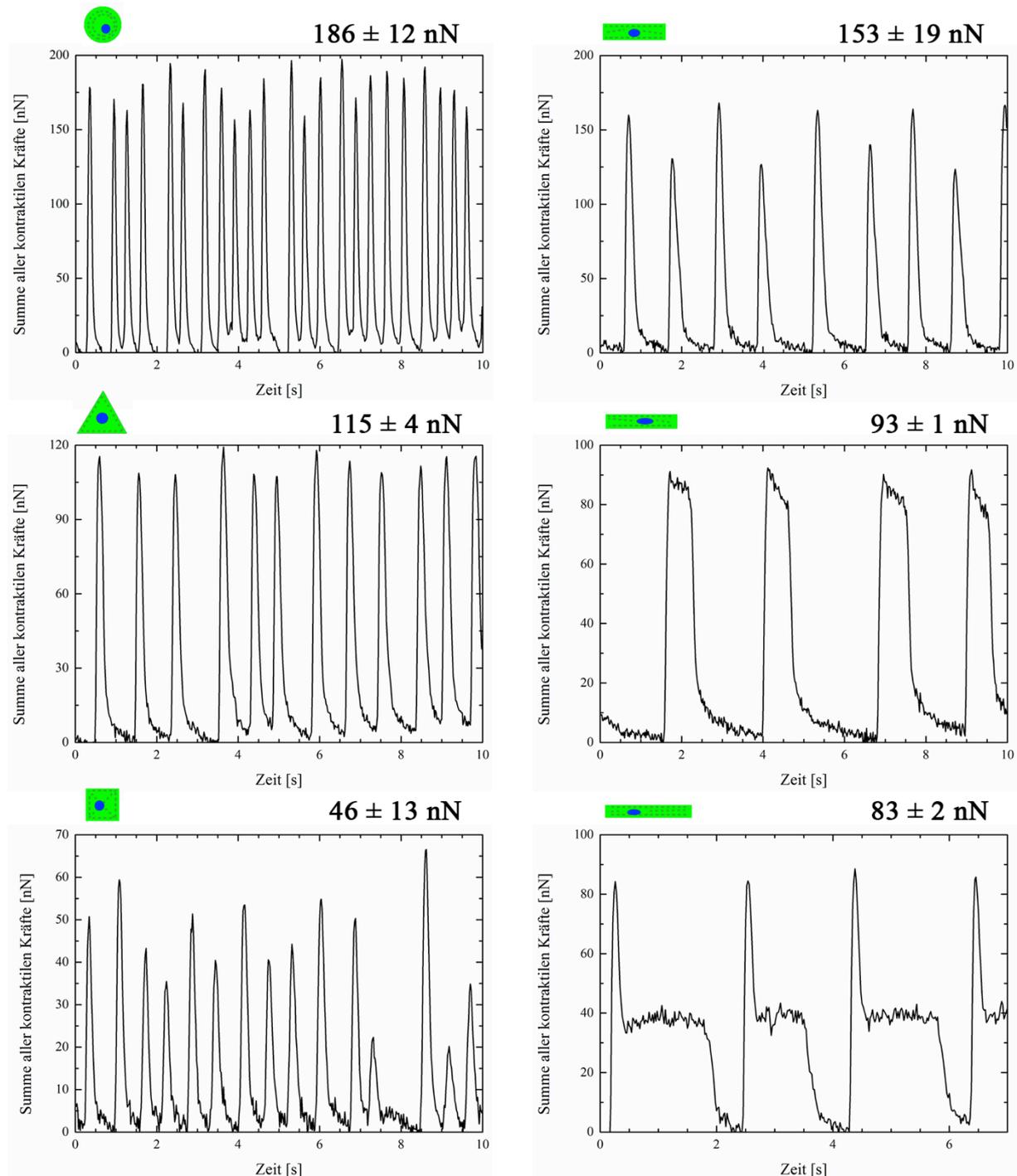


Abb. 3-13: Zeitlicher Verlauf der kontraktiven Kräfte definierter Zellformen veranschaulicht anhand von sechs Kontraktionsprofilen. Der Signalverlauf der Profile verdeutlicht die Heterogenität des Kontraktionsverhaltens der kardialen Myozyten in den unterschiedlichen Zellformen. Zur Berechnung der durchschnittlichen Kontraktionskraft wurde über alle lokalen Signalmaxima gemittelt.

Auf Basis eines Mittelwertvergleichs ließen sich für die Verteilungen der sechs Zellformen keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen. Dies war insbesondere im Fall der Kreise und der kurzen Rechtecke auf die geringe Zahl gemessener Zellen zurückzuführen. Aufgrund der großen Streuung innerhalb einzelner Gruppen wurde der Median als Vergleichswert betrachtet. Der Median der Kontraktionskraft der Gesamtverteilung aller Zellformen betrug 78 nN ($\mu = 86$ nN, $\sigma = 46$ nN, $n = 64$ Zellen), der Vergleich der Mediane der einzelnen Gruppen ließ jedoch ebenfalls keine Abhängigkeit der Kontraktionskraft von den unterschiedlichen Zellformen erkennen (Abb. 3-14). Allerdings unterschied sich die Breite der Verteilungen zwischen den einzelnen Gruppen. Für jede Zellform existierten sowohl Zellen mit einer mittleren Kontraktionskraft nahe des Medians der Gesamtverteilung, als auch starke Ausreißer mit Kräften > 150 nN. Die Kraft-Mediane der Dreiecke (93 nN) und der kurzen Rechtecke (61 nN) lagen am weitesten von dem der Gesamtverteilung entfernt. Zwar war die Anzahl der Ausreißer relativ gering (12,5%), diese wichen jedoch mit der zwei- bis dreifachen Kontraktionskraft stark vom Median der Gesamtverteilung ab.

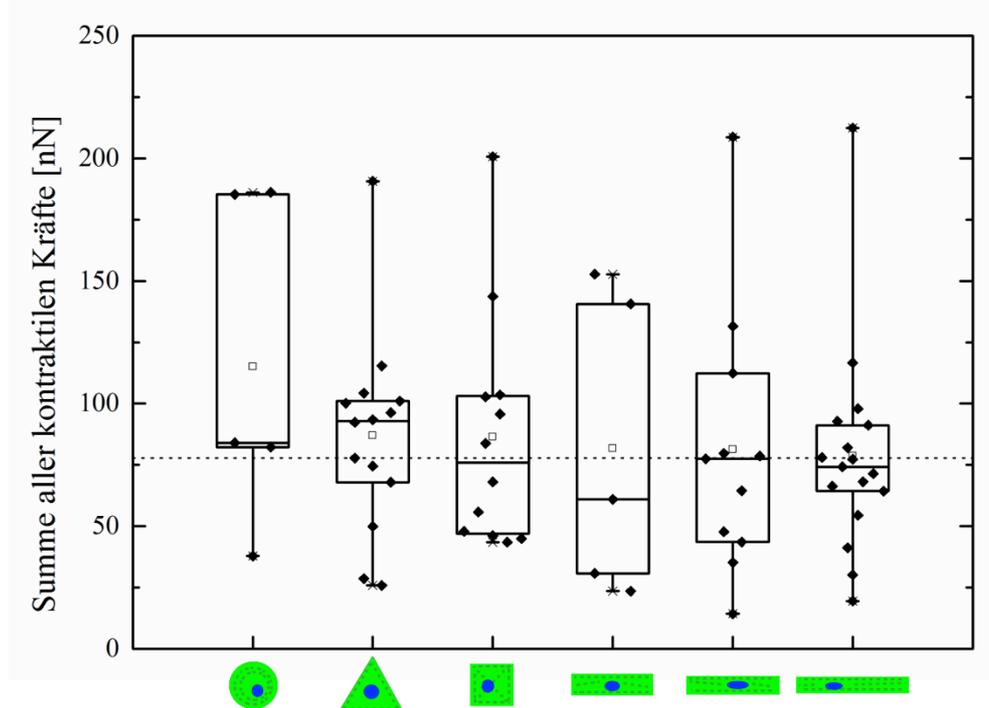


Abb. 3-14: Summe aller kontraktilen Kräfte in Abhängigkeit der Zellform; gestrichelte Linie = Median der Gesamtverteilung, schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%-bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer, Raute = Einzelmessung.

3.5. Quantitative Analyse des Signal- und Kontraktionsverhaltens kardialer Myozyten in Abhängigkeit des Zellursprungs

Aus den bisher beschriebenen Untersuchungen spontan kontrahierender, in ihrer Adhäsionsfläche unbeeinflusster Kardiomyozyten ließ sich zunächst ein Zusammenhang zwischen ihrem Signalverhalten und ihrer Zellform ableiten. Dabei zeigten vor allem länglich ausgerichtete Zellen mit Aspektverhältnissen $> 3,5$ und der damit verbundenen Zunahme ihrer inneren Ordnung eine besonders kurze Aufeinanderfolge des Calciumeinstroms und der daraus resultierenden Zellkontraktion (Abb. 3-4). Da das Aufzwingen einer künstlichen Zellform jedoch nicht zu einer Veränderung zelleigener Δt -Werte führte, wurden gewebsspezifische Isolationen kardialer Myozyten aus den Vorhöfen und den Ventrikeln embryonaler Rattenherzen durchgeführt (siehe 2.1.2). Diese Zellen wurden auf separaten Analysesubstraten kultiviert und wie zuvor beschrieben untersucht.

3.5.1. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten

Die Korrelationsanalyse zeigte, dass es sich bei den langsam schlagenden Zellen mit einer hohen Streuung im Δt nahezu ausschließlich um Zellen ventrikulären Ursprungs handelte. Der Δt lag zwischen 24 und 351 ms mit einem Median dieser insgesamt 63 gemessenen Zellen von 156 ms ($\mu = 157$ ms, $\sigma = 60$ ms). Der Median der Frequenz für diese Zellen betrug 0,55 Hz ($\mu = 0,61$ Hz, $\sigma = 0,25$ Hz). Die Zellpopulation mit niedrigem Δt und hoher Streuung der Kontraktionsfrequenz wurde hauptsächlich aus atrialen Zellen gebildet. Der Δt variierte nur geringfügig und der Median betrug für die 73 analysierten Zellen 22 ms ($\mu = 25$ ms, $\sigma = 11$ ms). Für die Frequenzen traten zwischen diesen Zellen Schwankungen im Bereich von 0,43 bis 3,4 Hz auf. Ihr Median lag bei 1,1 Hz ($\mu = 1,23$ Hz, $\sigma = 0,59$ Hz). Darüber hinaus besaßen die ventrikulären Zellen ein mittleres Aspektverhältnis von ungefähr 2, wohingegen atriale Zellen ein durchschnittliches Aspektverhältnis von 5 aufwiesen (Abb. 3-15).

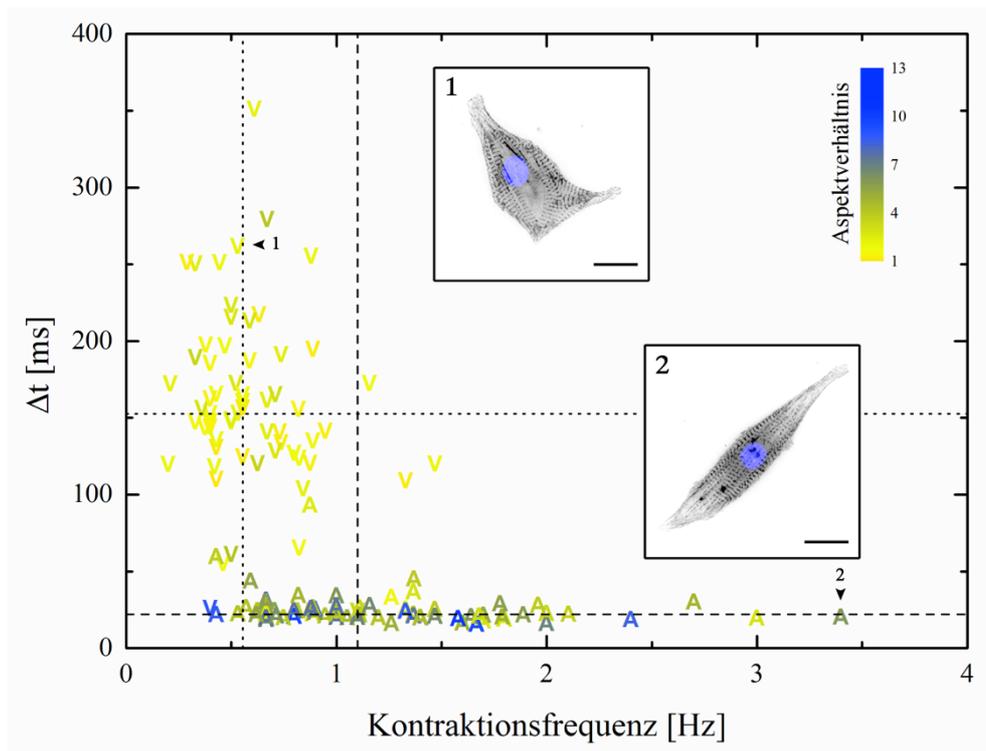


Abb. 3-15: Zusammenhang zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz Δt in Abhängigkeit des Zellursprungs. „V“ steht für ventrikuläre Zellen, „A“ für atriale Zellen. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über das Aspektverhältnis der Zelle. Die dünn gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters der ventrikulären Zellen dar, die dick gestrichelte Linie den der atrialen Zellen. Die eingefügten Bilder zeigen invertierte Graustufenbilder der gegen α -Actinin gefärbten Sarkomerstrukturen einer ventrikulären und einer atrialen Beispielszellen, in blau sind die Zellkerne dargestellt. Maßstäbe = 20 μm

3.5.2. Zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion in Abhängigkeit von Zellursprung und Zellarchitektur

Die Zellen wurden im Anschluss an die simultane Zweikanalmessung ebenfalls immunhistochemisch gefärbt und die α -Actinin-Signale der atrialen und ventrikulären Zellen mit Hilfe der makrogestützten Bildverarbeitungsroutine hinsichtlich ihrer Strukturparameter analysiert. Dabei wurden Direktionalität, Periodizität, Reichweite und die Länge der Hauptachse der Zellen untersucht. Für die ventrikulären Zellen betrug der Median des Periodizitätsparameters 0,11 und für die atrialen Zellen 0,21. Stärker unterschieden sie sich hinsichtlich der Direktionalität ihrer Myofibrillen (Abb. 3-16). Mit einem Median von 1,29 ($\mu = 1,35$, $\sigma = 0,27$; basierend auf $n = 40$, da die Immunfärbung nicht für alle Zellen geglückt war) kennzeichnete diese die nahezu ungeordnete Ausrichtung der Myofibrillen in den ventrikulären Zellen und war vergleichbar mit der Beispielszelle 1 aus Abb. 3-7.

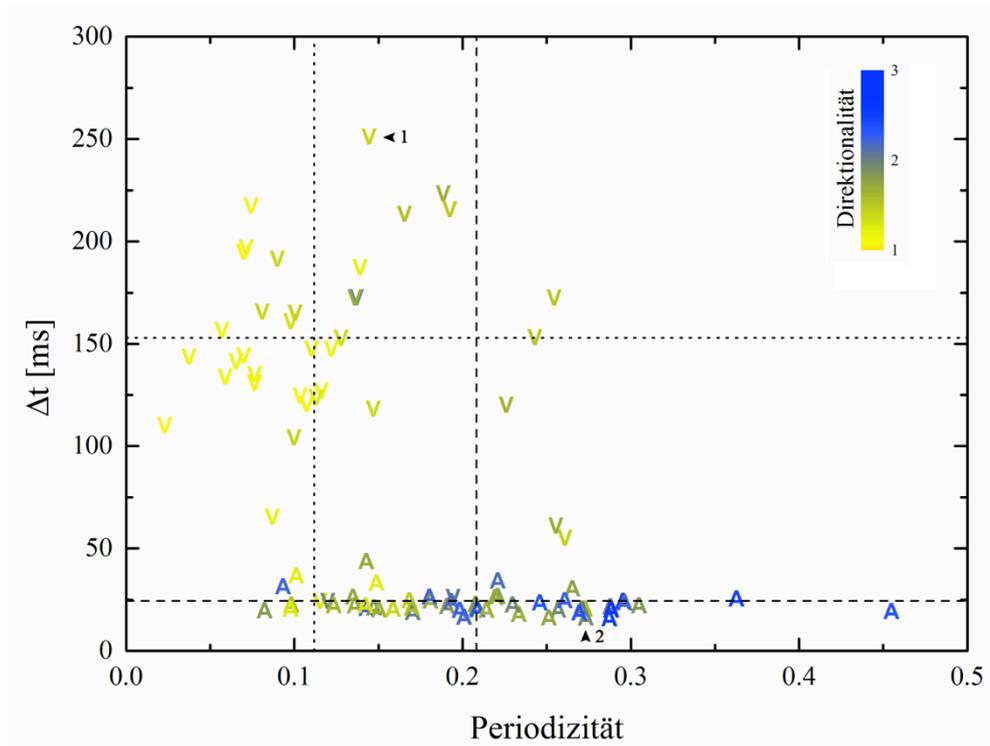


Abb. 3-16: Zusammenhang zwischen der Periodizität und dem zeitlichen Versatz Δt in Abhängigkeit des Zellursprungs. „V“ steht für ventrikuläre Zellen, „A“ für atriale Zellen. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Direktionalität der Zelle. Die dünn gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters der ventrikulären Zellen dar, die dick gestrichelte Linie den der atrialen Zellen. Die beiden schwarzen Pfeile zeigen die Position der beiden Beispielzellen aus Abb. 3-15 in der Verteilung.

Für atriale Zellen lag der Median der Direktionalität bei 1,83 ($\mu = 1,91$, $\sigma = 0,37$; $n = 50$, s.o.) und bestätigte die aus dem hohen durchschnittlichen Aspektverhältnis zu erwartende parallele Ausrichtung der Myofibrillen (vgl. Beispielzelle 2, Abb. 3-7).

Ein geringerer Unterschied ließ sich für die Persistenz der sich wiederholenden Sarkomerstrukturen entlang der Hauptachse der Zellen feststellen (Abb. 3-17). Auffällig war das vermehrte Auftreten von ventrikulären Zellen mit $RW = 0$. Diese Zellen zeigten neben der ungeordneten Ausrichtung ihrer Myofibrillen (vgl. Beispielzelle 1, Abb. 3-7) auch insgesamt schwächer ausgeprägte Sarkomerstrukturen, was unter Umständen zu falschen Resultaten der automatisierten Strukturanalyse hätte führen können. Eine zusätzliche visuelle Auswertung bestätigte jedoch das Ergebnis.

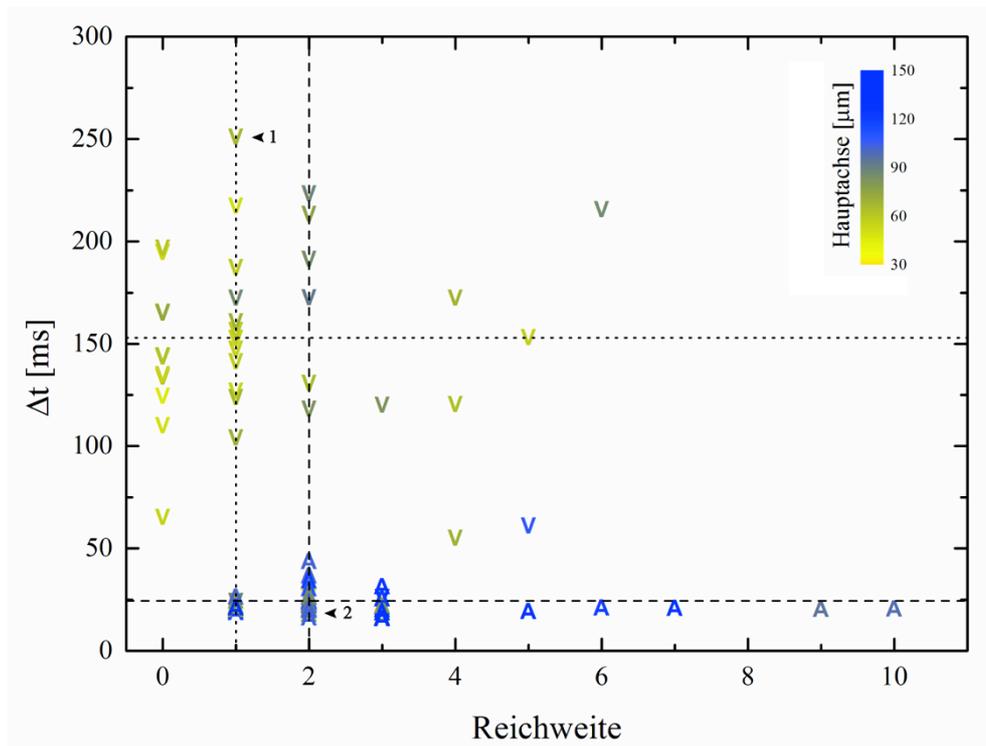


Abb. 3-17: Zusammenhang zwischen der Reichweite und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation in Abhängigkeit des Zellursprungs. „V“ steht für ventrikuläre Zellen, „A“ für atriale Zellen. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Länge der Hauptachse der Zelle. Die dünn gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters der ventrikulären Zellen dar, die dick gestrichelte Linie den der atrialen Zellen. Die beiden schwarzen Pfeile zeigen die Position der beiden Beispielzellen aus Abb. 3-15 in der Verteilung.

Deutlicher unterschieden sich die beiden Zellpopulationen in der Länge ihrer Hauptachsen. Die mittlere Länge für die ventrikulären Zellen betrug $69,2 \pm 16,7 \mu\text{m}$ ($n = 40$) und die der atrialen Zellen $101,2 \pm 24,1 \mu\text{m}$ ($n = 55$). Die hohe Direktionalität, die lange Hauptachse und das hohe Aspektverhältnis identifizierten die untersuchten Vorhofzellen, wie in der Literatur für (sino-)atriale Zellen beschrieben (Mangoni & Nargeot, 2008), als elongierte Strukturen mit zum Teil dicht gepackten Myofilamenten.

3.5.3. Beeinflussung des zeitlichen Versatzes in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten durch Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Unterschied des Δt zwischen den unter 3.2 und 3.4.1 identifizierten Subpopulationen auf den Zellursprung zurückführen ließ. Dabei bildeten ventrikuläre Zellen die Gruppe langsam schlagender Zellen mit einem hohen Δt und Zellen atrialer Zugehörigkeit die Gruppe schnell schlagender Zellen mit niedrigem Δt . Die charakteristische Form des Korrelationsverlaufs zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt blieb selbst dann erhalten, wenn diese beiden Zelltypen in definierten, für sie zum Teil untypischen Geometrien adhärten. In einen nächsten Schritt galt es zu klären, woher das unterschiedliche Signalverhalten zwischen den beiden Zelltypen herrührte. Ein Lösungsansatz basierte auf der Überlegung, das Signalverhalten der Zellen gezielt zu beeinflussen und ggf. in das des anderen Zelltypen umzukehren. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit den antagonistischen Neurotransmittern Acetylcholin und Epinephrin behandelt. Beide wirken durch Stimulation der an der Zelloberfläche lokalisierten muskarinergen bzw. adrenergen Rezeptoren über G-Protein gekoppelte Reaktionen auf die Aktivität der Adenylcyclase (Bers, 2002). Dadurch sollte indirekt durch Senkung bzw. Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration Einfluss auf die Phosphorylierung von an der Erregungs-Kontraktionskopplung beteiligten Proteine genommen und eine chronotrope (= die Kontraktionsfrequenz betreffende) Wirkung auf die Zellen erzielt werden.

Zur Analyse wurden pränatale Kardiomyozyten wie zuvor nach ihrer Gewebszugehörigkeit separiert und mittels simultaner Zweikanalmessung zunächst unter Kontrollbedingungen untersucht. Im Anschluss wurden die atrialen Zellen mit 1 μM und 25 μM Acetylcholin (ACh) sowie ventrikuläre Zellen mit 1 μM und 25 μM (-)-Epinephrin (Epi) nacheinander für jeweils 10 min inkubiert und analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass sich durch Behandlung mit dem Neurotransmitter ACh das Signalverhalten der atrialen Myozyten nicht umkehren ließ (Abb. 3-18). Im Gegensatz zu seiner eigentlichen negativ chronotropen Wirkung bewirkte es bei manchen Zellen sogar eine Steigerung der Kontraktionsfrequenz. Ihr Median lag in allen drei Durchgängen für die 18 gemessenen Zellen zwischen 1,34 und 1,44 Hz. Weder die Zugabe von 1 μM noch 25 μM bewirkte eine deutliche Änderung des Δt . Dieser stieg von 26 ms der Kontrollgruppe über 28 ms für 1 μM ACh auf 32 ms für 25 μM ACh und lag damit im Bereich der Ungenauigkeit des Analyseverfahrens (± 4 ms). Zwei Zellen (#1 und #12) stellten nach Zugabe von 25 μM ACh ihre Kontraktion ein. Die Behandlung ventrikulärer Zellen mit Epi ließ einen Effekt auf das Signalverhalten der Zellen erkennen, der für einige Zellen sogar eine Konzentrationsabhängigkeit aufwies. Für den Median der

Kontraktionsfrequenz ließ sich eine Erhöhung und für den Median des Δt eine Reduktion verzeichnen. Dabei stieg die Frequenz von anfänglichen 0,53 Hz nach Behandlung mit 1 μM Epi auf 0,95 Hz und für 25 μM auf 1 Hz an ($n = 23$). Damit einher ging die Reduktion des Δt von 162 ms über 109 ms auf 99 ms nach erfolgter Behandlung.

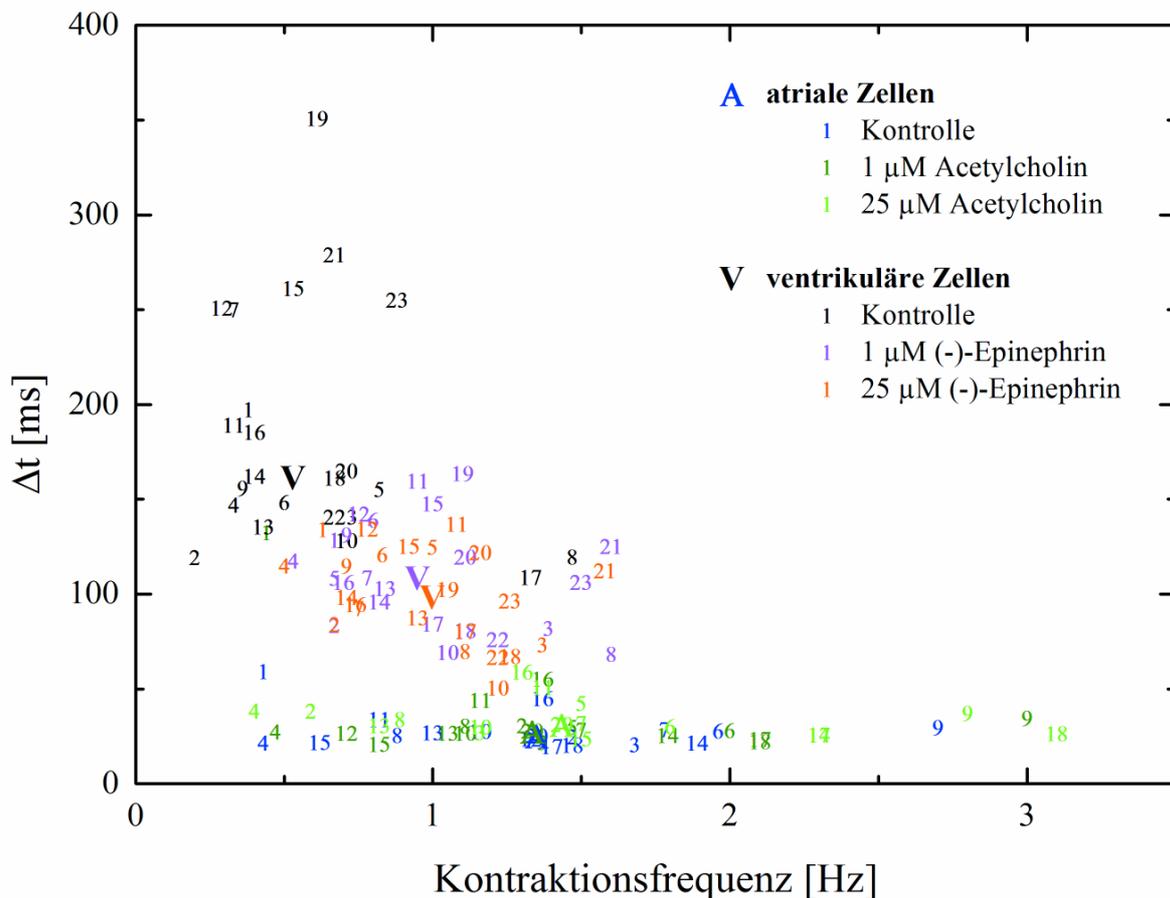


Abb. 3-18: Einfluss der Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren auf die Korrelation zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz Δt in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. Jedes Zahlentriplet entspricht der Messung einer atrialen bzw. ventrikulären Zelle unter Kontrollbedingungen (blau bzw. schwarz), nach Behandlung mit der niedrigen Konzentration (grün bzw. magenta) und mit der hohen Konzentration (gelb bzw. orange) des jeweiligen Neurotransmitters. Die Buchstaben „A“ und „V“ zeigen die Medianwerte aus allen atrialen und ventrikulären Zellen der entsprechenden Gruppe.

Zusätzlich wurde die Behandlung der beiden Zelltypen mit der höheren Konzentration der Neurotransmitter umgekehrt. Abb. 3-19 zeigt den konzentrationsabhängigen Einfluss der unterschiedlichen chemischen Stimulationen auf den Δt in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. Wie bereits in Abb. 3-18 gezeigt, ließ sich auch statistisch keine signifikante Änderung des Δt nach der Behandlung atrialer Zellen mit ACh

feststellen ($P > 0,05$). Das gleiche galt für die umgekehrte Behandlung mit $25 \mu\text{M}$ Epi ($P > 0,05$; $n = 13$). Im Gegensatz dazu war der Δt in Ventrikelzellen nach Behandlung mit Epi für beide Konzentrationen mit $P < 0,01$ signifikant niedriger als der Kontrollwert. Die umgekehrte Behandlung lieferte keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollmessung ($P > 0,05$; $n = 29$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und Mittelwertvergleich mit Bonferroni Post-hoc Test ($\alpha = 0,05$).

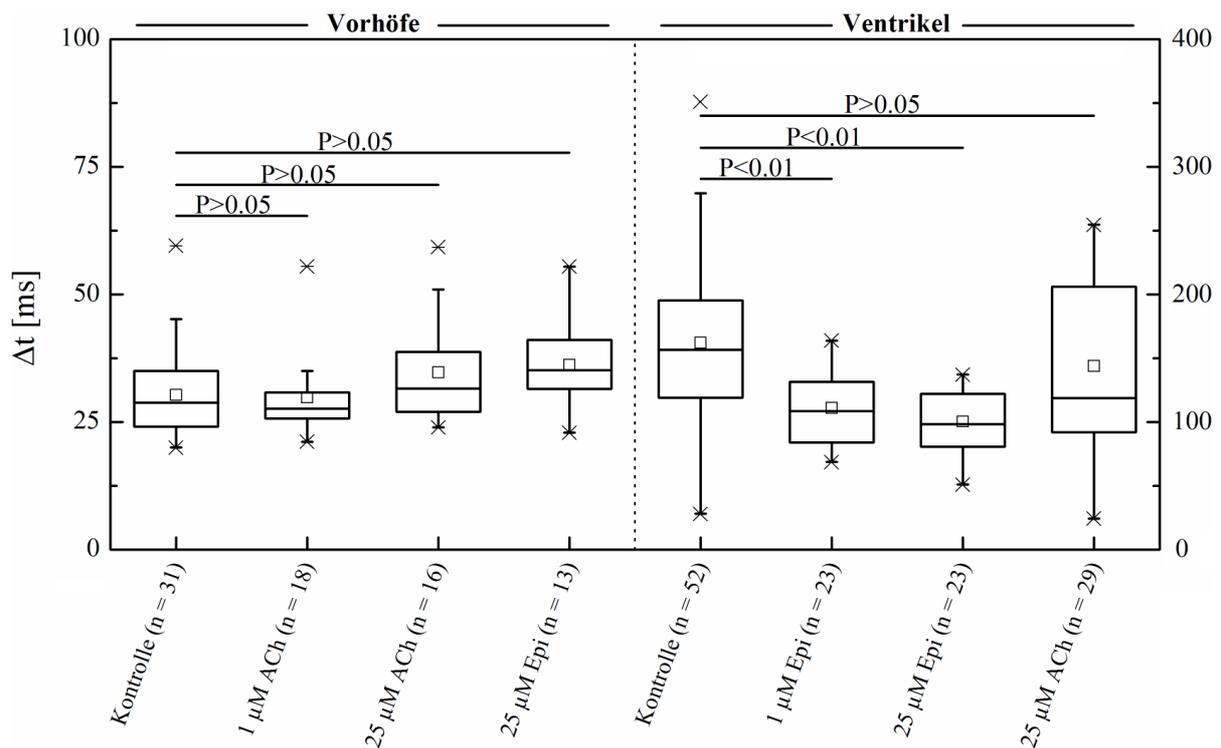


Abb. 3-19: Konzentrationsabhängiger Einfluss der Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren auf den zeitlichen Versatz Δt in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten. Zur besseren Lesbarkeit wurden die Ordinaten der beiden Zelltypen unterschiedlich skaliert; ACh = Acetylcholin, Epi = (-)-Epinephrin, n = Anzahl der Einzelmessungen, schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%-bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer

3.5.4. Abschätzung der kontraktilen Kräfte atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten nach Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren

Aus den gemessenen Substratdeformationen wurden die kontraktilen Gesamtkräfte der atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten vor und nach Zugabe der Neurotransmitter ermittelt. Generell ließ sich keine signifikante Änderung der Kontraktionskräfte nach Zugabe der Chemikalien feststellen. Auch der Vergleich der unbehandelten Kontrollmessungen atrialer und ventrikulärer Zellen ohne Chemikalienzugabe lieferte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($P < 0,05$). Abb. 3-20 zeigt die Summe aller kontraktilen Kräfte vor und nach Stimulation der atrialen Zellen mit 1 und 25 μM ACh und der ventrikulären Zellen mit 1 und 25 μM Epi. In den Kontrollmessungen sind alle gemessenen Zellen der vorangegangenen Experimente nach Gewebseparation berücksichtigt.

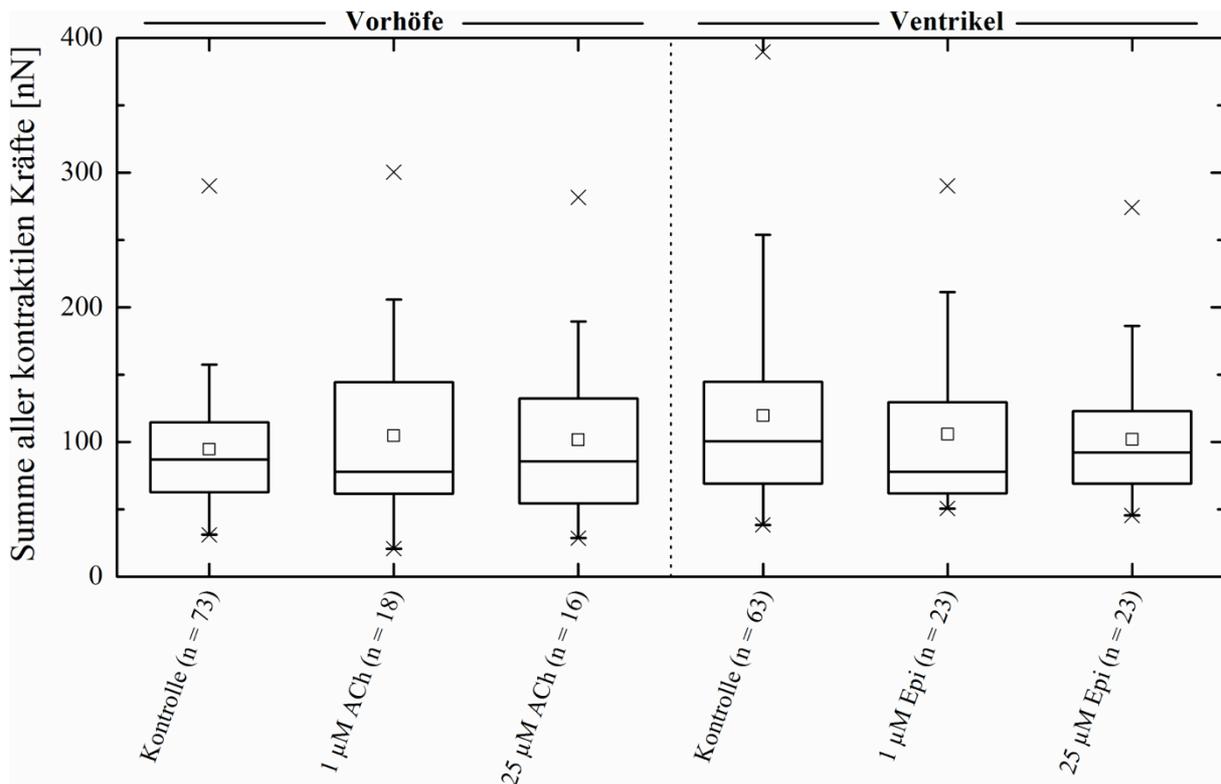


Abb. 3-20: Einfluss der Stimulation muskarinerger und adrenerger Rezeptoren auf die Summe aller kontraktilen Kräfte in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten; ACh = Acetylcholin, Epi = (-)-Epinephrin, n = Anzahl der Einzelmessungen, schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%-bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer

Der Median der Kontraktionskraft für unbehandelte, atriale Zellen betrug 87 nN ($\mu = 95$ nN, $\sigma = 48$ nN). Dieser sank nach Behandlung mit 1 μ M ACh auf 78 nN ($\mu = 105$ nN, $\sigma = 69$ nN) und stieg nach weiteren 10 min Inkubation mit 25 μ M ACh wieder auf 86 nN ($\mu = 102$ nN, $\sigma = 67$ nN) an. Der Median der Kontraktionskraft unbehandelter, ventrikulärer Zellen war mit 101 nN ($\mu = 120$ nN, $\sigma = 69$ nN) geringfügig größer als der der Vorhofzellen. Der positiv inotrope Effekt von Epi ließ sich anhand der Daten jedoch nicht bestätigen, da die kontraktile Gesamtkraft nach Behandlung mit 1 μ M Epi auf einen Median von 78 nN ($\mu = 106$ nN, $\sigma = 62$ nN) absank. Zwar stieg dieser Wert für 25 μ M wieder auf 92 nN ($\mu = 102$ nN, $\sigma = 52$ nN) an, erreichte jedoch nicht den Ausgangswert. Der Effekt der umgekehrten Behandlung der Zellen wurde an dieser Stelle nicht weiter untersucht.

3.6. Generierung definierter und funktionaler Herzmuskel-Mikrogewebe

Herzmuskelzellen liegen in ihrem nativen Zustand keineswegs als Einzelzellen vor, sondern bilden mit den umliegenden Zellen im Gewebeverband ein funktionelles Synzytium. Dabei handelt es sich um einen hoch-organisierten Zellverbund, in dem die Zellen über Glanzstreifen miteinander verbunden sind. Die in diesen enthaltenen Gap Junctions ermöglichen die Erregungsausbreitung zwischen den einzelnen Herzmuskelzellen und befähigen sie zur simultanen Kontraktion.

Der folgende Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Etablierung und Charakterisierung eines Modellsystems zur Untersuchung des koordinierten Kontraktionsverhaltens multizellulärer Herzmuskel-Mikrogewebe (μ -Gewebe). Dazu wurden differenzierte Kardiomyozyten aus der Mischkultur der Primärisolation mittels der unter 2.1.5 beschriebenen Technik angereichert und durch das unter 2.3.1 und 2.3.2 beschriebene Verfahren in Strukturen verschiedener Größe zur Adhäsion gebracht. Zwei Tage nach Aussaat füllten die Zellen die vorgegebenen Bereiche vollständig aus und wurden hinsichtlich ihres Kopplungs- und Kontraktionsverhaltens analysiert.

Für die Generierung definierter μ -Gewebe wurden aufgereinigte Kardiomyozyten verwendet, um ausschließlich die Interaktion zwischen Herzmuskelzellen zu untersuchen. Dabei wurden zwei Versuchsansätze verfolgt. Als Ausgangsmaterial für die Zellanreicherung wurde zum einen die gesamte aus der Isolation gewonnene Mischkultur, zum anderen wurde vor der Aufreinigung eine gewebsspezifische Trennung der Vorhöfe von den Ventrikeln vorgenommen. In beiden Fällen wurde das gesammelte Gewebe mechanisch und enzymatisch zerkleinert und die so vereinzelt Zellen als Ausgangsmaterial für die Zellaufreinigung verwendet. Aus den gewonnenen Kardiomyozyten wurden μ -Gewebe aufgebaut und deren elektrochemischen und zellmechanischen Eigenschaften charakterisiert. Danach wurden die Zellen immunhistochemisch gefärbt und hinsichtlich ihrer Zellarchitektur weiter untersucht.

3.6.1. Kontrollierbare und reproduzierbare Gewebsstrukturen

Bei den zu erzielenden Strukturen handelte es sich als Adhäsionsgrundlage um Rechtecke unterschiedlicher Flächen und Aspektverhältnisse. Neben zwei Quadraten mit 50 bzw. 100 μm Kantenlänge wurden insgesamt sechs Rechtecke gebildet, bei denen für jeweils 3 von ihnen eine Seite konstant gehalten und die andere zunehmend verbreitert wurde. Bei der einen Gruppe wurde die längere Seite konstant bei 100 μm gehalten, während die andere von 16 μm

über 25 μm auf 50 μm variierte. Im anderen Fall lag die Länge der konstanten Seite bei 200 μm , während die kurze Seite wie zuvor beschrieben variiert wurde.

Abb. 3-21 zeigt am Beispiel ausgewählter Zellen die Struktur der acht verschiedenen μ -Gewebe. Sowohl auf Basis der Sarkomeranordnung als auch des Spreitverhaltens der Zellen ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Ansätzen erkennen. In beiden Fällen ließen sich Zellverbände generieren, die dank des hohen Myozytenanteils vollkommen frei von Nicht-Herzmuskelzellen waren. Diese Zellen füllten die ihnen zur Verfügung stehenden Adhäsionsbereiche nahezu vollständig aus. Daher wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aller μ -Gewebe in diesem Abschnitt zusammengefasst. Die Strukturen blieben aufgrund des geringen Proliferationspotenzials der Kardiomyozyten formstabil. Je nach Gewebsgröße variierte die Anzahl der Zellen im Verband. In Bereichen hoher Zelldichte verliefen die Myofibrillen größtenteils ungeordnet. Je nach Anzahl der Zellen überlagerten sich die Zellkörper in manchen Bereich, sodass die Myofibrillen in unterschiedlichen Ebenen verliefen und eine detaillierte mikroskopische Erfassung mittels Epifluoreszenzbeleuchtung somit nur schwer möglich war. Die weiß umrahmten Einschübe in den Immunfärbungen zeigen Vergrößerungen von Bereichen, die den Verlauf der Fibrillen und die Ausprägung der Z-Banden veranschaulichen. In den Strukturen mit besonders hohen Aspektverhältnissen (16 μm x 100 μm , 25 μm x 100 μm , 16 μm x 200 μm und 25 μm x 200 μm) zeigte sich, ähnlich wie bei den Einzelzellen eine Ausrichtung der Myofibrillen entlang der Hauptachse der Struktur, jedoch verliefen sie dabei nicht mehr parallel zu dieser. Neben der Geometrie der Adhäsionsfläche wurde der Verlauf der Fibrillen zusätzlich durch die Ausrichtung der jeweiligen Zelle mitbestimmt. Insbesondere in den Bereichen benachbarter aneinandergrenzender Zellen (vgl. Abb. 3-21, 50 μm x 200 μm und 100 μm x 100 μm) ließen sich die abweichenden Orientierungen der Myofibrillen erkennen. Ihr Verlauf wurde primär von der Ausrichtung der jeweiligen Zelle dominiert.

Wie im Fall der Einzelzellen in definierten Geometrien ließ sich auch für die μ -Gewebe eine 5-20%ige Abweichung der Zellflächen von der zu erwartenden Größe der Strukturen erkennen. Auf Basis der Binärmasken der segmentierten Z-Banden ließen sich, ebenfalls vergleichbar zu den definierten Einzelzellen, ein Bedeckungsgrad der Sarkomere von $12 \pm 3\%$ bis $14 \pm 3\%$ ermitteln. Mit $10 \pm 4\%$ lag die 16 μm x 200 μm große Struktur als einzige außerhalb dieses stabilen Intervalls. Dies ist vermutlich auf die Qualität der Fluoreszenzmikrographen zurückzuführen, die eine akkurate Analyse nicht möglich machten. Darüberhinaus ließen sich aufgrund der aufwendigen Präparation zum Teil nur wenige Strukturen für einzelne Gruppen untersuchen.

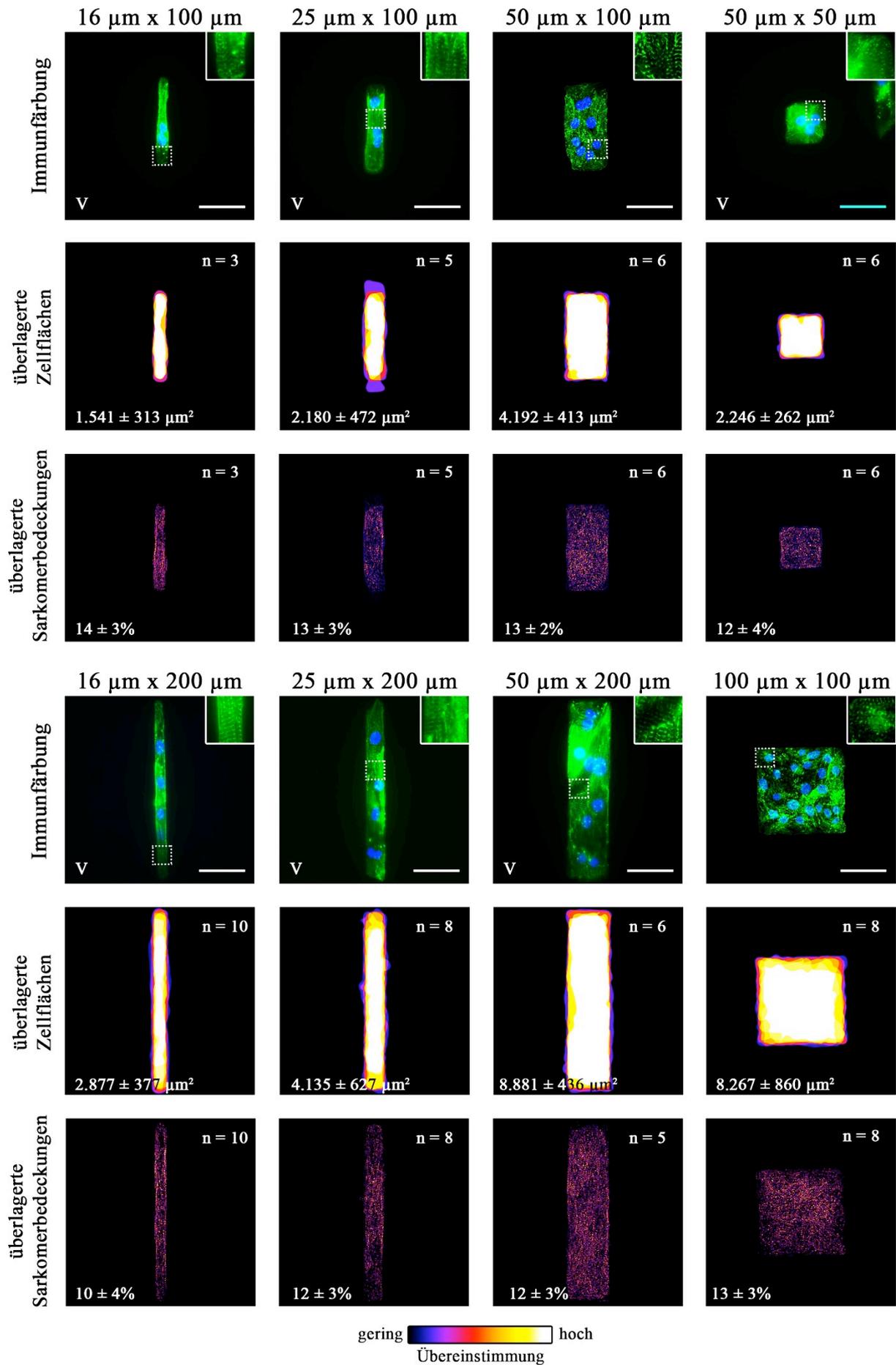


Abb. 3-21: Aufgereinigte Kardiomyozyten in acht künstlich erzeugten μ -Gewebe unterschiedlicher Größe. Die Zellen der aufgereinigten Kardiomyozytenfraktion wurden auf die konditionierten Substrate ausgesät und füllten nach Sedimentation die ihnen gebotenen Adhäsionsflächen im Verlauf des Spreitvorgangs aus. Durch chemische Passivierung des restlichen Substrats blieben die Zellen innerhalb ihrer vorgegebenen Grenzen und überwucherten diese selbst nach mehreren Tagen in Kultur nicht. Die Färbung der quergestreiften Myofibrillen durch Markierung der Sarkomerstrukturen (α -Actinin, grün) veranschaulicht die Ausrichtung des Zytoskeletts in Abhängigkeit der Form. Durch die Überlagerung aller Binärmasken der Zellflächen ließ sich die Reproduzierbarkeit der Zellformausprägung ermitteln. Gleiches wurde für die Binärmasken der segmentierten Sarkomerstrukturen durchgeführt und gab Aufschluss über die dominierende Lokalisation der Myofibrillen. Der Grad der Übereinstimmung lässt sich in beiden Fällen anhand der Farbskala ablesen. Die hell eingefärbten Bildpunkte stellen Bereiche hoher Übereinstimmung zwischen allen Masken dar. Die eingefügten Zahlen entsprechen den mittleren Zellflächen bzw. mittleren Bedeckungsgraden der Sarkomere \pm deren Standardabweichungen; n = Anzahl der in der Mittelung enthaltenen Masken. Die mit „V“ gekennzeichneten μ -Gewebe bestanden im jeweiligen Beispiel ausschließlich aus ventrikulären Zellen. Maßstäbe = 50 μ m

Zur Visualisierung der Zellkontakte wurden die μ -Gewebe zusätzlich gegen das an deren Bildung beteiligte β -Catenin gefärbt. Es ist Bestandteil der Adherens Junction (siehe 1.1.4.6) und vermittelt auf der intrazellulären Seite gemeinsam mit α -Actinin und weiteren Strukturproteinen die Bindung von Aktin-Mikrofilamenten an die transmembranen Cadherine, die die Zellen letztendlich miteinander verbinden. Abb. 3-22 zeigt die Verteilung von β -Catenin entlang der Zellgrenzen benachbarter Einzelzellen in den acht Beispielen unterschiedlicher μ -Gewebe. Für alle Strukturen ließ sich die Ausprägung von Zellkontakten nachweisen. Dabei existierten neben weitreichenden Säumen entlang der gesamten Kontaktgrenzen auch punktuelle Verbindungen. Anhand der Verteilung in den Zellverbänden mit hohen Aspektverhältnissen wurde deutlich, dass Zellen dazu neigten, die Länge ihrer Kontaktgrenzen zu maximieren. In den schmalen Strukturen zeichnete sich dieses Verhalten durch eine zwischen zwei Zellen diagonal verlaufende Adhäsionsbande aus (vgl. 16 μ m x 200 μ m und 25 μ m x 200 μ m). Neben seiner strukturgebenden Rolle kann β -Catenin darüber hinaus noch als Transkriptionsfaktor fungieren. Aus diesem Grund ließ sich in manchen Zellen vermutlich ebenfalls ein nukleäres Signal detektieren.

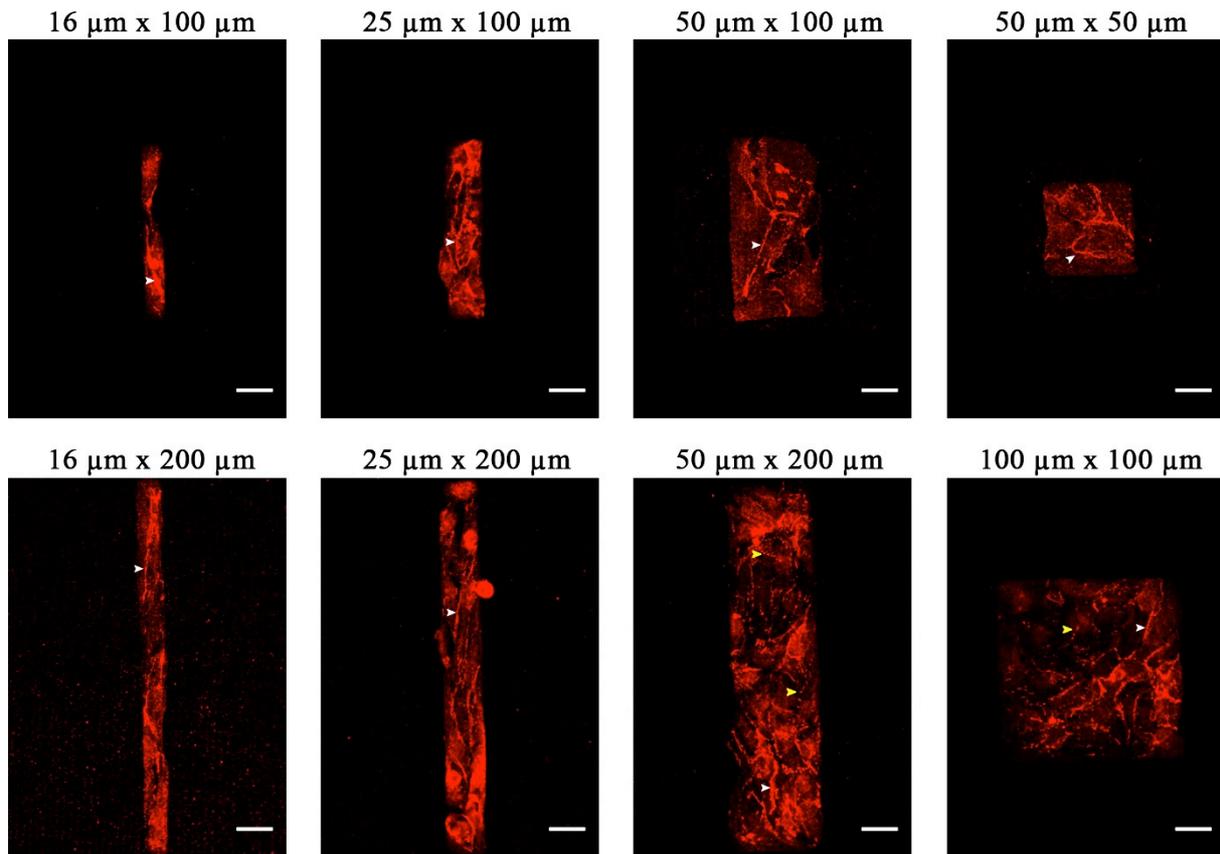


Abb. 3-22: Visualisierung der Zell-Zell-Kontakte mittels β -Catenin Markierung in künstlich erzeugten μ -Gewebe verschiedener Größe. Die Zellgrenzen benachbarter Zellen zeigten sich durch lange Adhäsionsstreifen (weiße Pfeilspitzen). Darüber hinaus bildeten sie Bereiche, in denen sie punktuell in Kontakt traten (gelbe Pfeilspitzen). Maßstäbe = 20 μ m

Die Ergebnisse zeigten bis hierhin, dass es möglich war aus vereinzelt Kardiomyozyten zusammenhängende, in ihrer Form begrenzte μ -Gewebe aufzubauen, die nach erfolgtem Adhäsions- und Spreitvorgang Myofibrillen mit für Herzmuskelzellen charakteristischer, durch die kontraktile Sarkomeruntereinheiten hervorgerufener Querstreifung bildeten. Darüber hinaus verbanden sich benachbarte Zellen über Zell-Zell-Kontakte und schafften somit die Voraussetzung für ein funktionelles Synzytium.

3.6.2. Elektro-chemische Kopplung in Herzmuskel-Mikrogeweben

Durch die erfolgreiche Substratkonditionierung fügten sich die vereinzelt Zellen strukturell zu multizellulären Verbänden zusammen. Die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte legte nahe, dass sich neben der mechanischen Verbindungen zwischen den Einzelzellen über *Adherens Junctions* ebenfalls *Gap Junctions* ausbildeten, die die Zellen eines μ -Gewebes zur elektro-chemischen Kopplung miteinander befähigten.

Zur Untersuchung der Synchronisation zwischen den Einzelzellen eines μ -Gewebes wurden diese mit dem Calcium-Indikator Fluo4-AM beladen und die Änderung der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs zeitlich hoch aufgelöst verfolgt. Zur Veranschaulichung der Synchronisation wurde der Signalverlauf der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs während eines Aktionspotenzials für verschiedene Bereiche eines μ -Gewebes analysiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 3-23 zeigen die acht Beispielgewebe während ihres Intensitätsmaximums. Für jedes der gezeigten μ -Gewebe wurden verschiedene Regionen ausgewählt und die lokale Intensitätsänderung innerhalb dieses Bereichs untersucht und gemeinsam mit den anderen Signalverläufen graphisch über die Zeit aufgetragen. Dabei wurden die Signalverläufe der unterschiedlichen Regionen eines Zellverbandes auf den hellsten Wert innerhalb der Struktur normiert. Unabhängig von Form oder Zusammensetzung der Gewebe ließ sich in allen Fällen zu Beginn ein synchroner Anstieg der Fluoreszenzintensität in den einzelnen Regionen der jeweiligen Struktur beobachten. Auch wenn sich die Signalverläufe der einzelnen Regionen einer Struktur in ihrer Amplitude und der Zeit bis zum lokalen Intensitätsmaximum unterschieden, so entsprachen sie sich jedoch in der Signaldauer und erreichten alle wieder gleichzeitig das Basisniveau. Abgesehen von den $50\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ großen Strukturen handelte es sich bei allen hier gezeigten μ -Geweben um aus ventrikulären Zellen aufgebauten Zellverbänden. Trotz der Zellhomogenität variierten die Signalformen für diese Strukturen ebenfalls zwischen den Regionen. Der deutlichste Unterschied der Signalformen innerhalb eines Verbandes war hier für das $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ große Gewebe zu erkennen. Während die Intensität in der oberen und unteren rechten Ecke stetig anstieg, erreichte sie in der oberen und unteren linken Ecke ein Plateau und fiel dann gemeinsam mit den anderen Regionen wieder auf das Basisniveau. In manchen μ -Geweben kam es an vereinzelt Stellen zu kurzen Calcium-Ereignissen, die sich wie für die $100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$ große Struktur gezeigt in kurzen Anstiegen der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen abzeichneten.

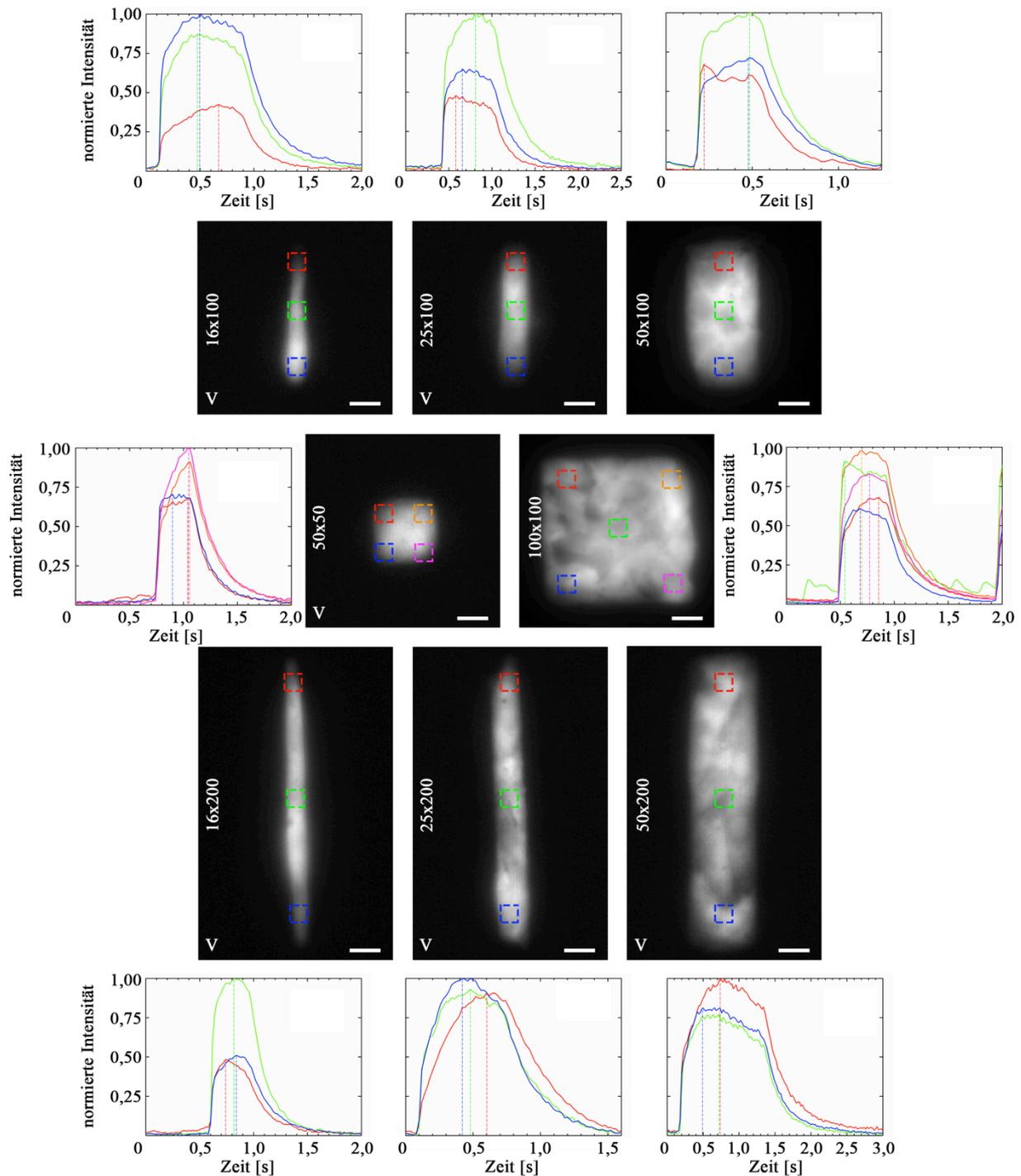


Abb. 3-23: Beispiele des räumlichen und zeitlichen Verlaufs der normierten Signalintensität des Calcium-Indikators Fluo4-AM in multizellulären μ -Gewebe verschiedener Größe. Für jedes Beispiel wurde der Signalverlauf in verschiedenen Regionen des Zellverbandes für die Dauer eines Aktionspotenzials erfasst und graphisch dargestellt. Die farbige Kurve entspricht der gemessenen Signalintensität im zugehörigen, gleichfarbigen Quadrat relativ zum globalen Intensitätsmaximum. Die gestrichelten Linie im Graphen zeigen den Zeitpunkt der maximalen Fluoreszenzintensität. Die mit „V“ gekennzeichneten μ -Gewebe bestanden in jeweiligen Beispiel ausschließlich aus ventrikulären Zellen. Maßstäbe = 20 μ m

Diese reichten jedoch nicht aus, um den Schwellenwert zur Ausbildung eines globalen Aktionspotenzials im gesamten Verband zu überschreiten.

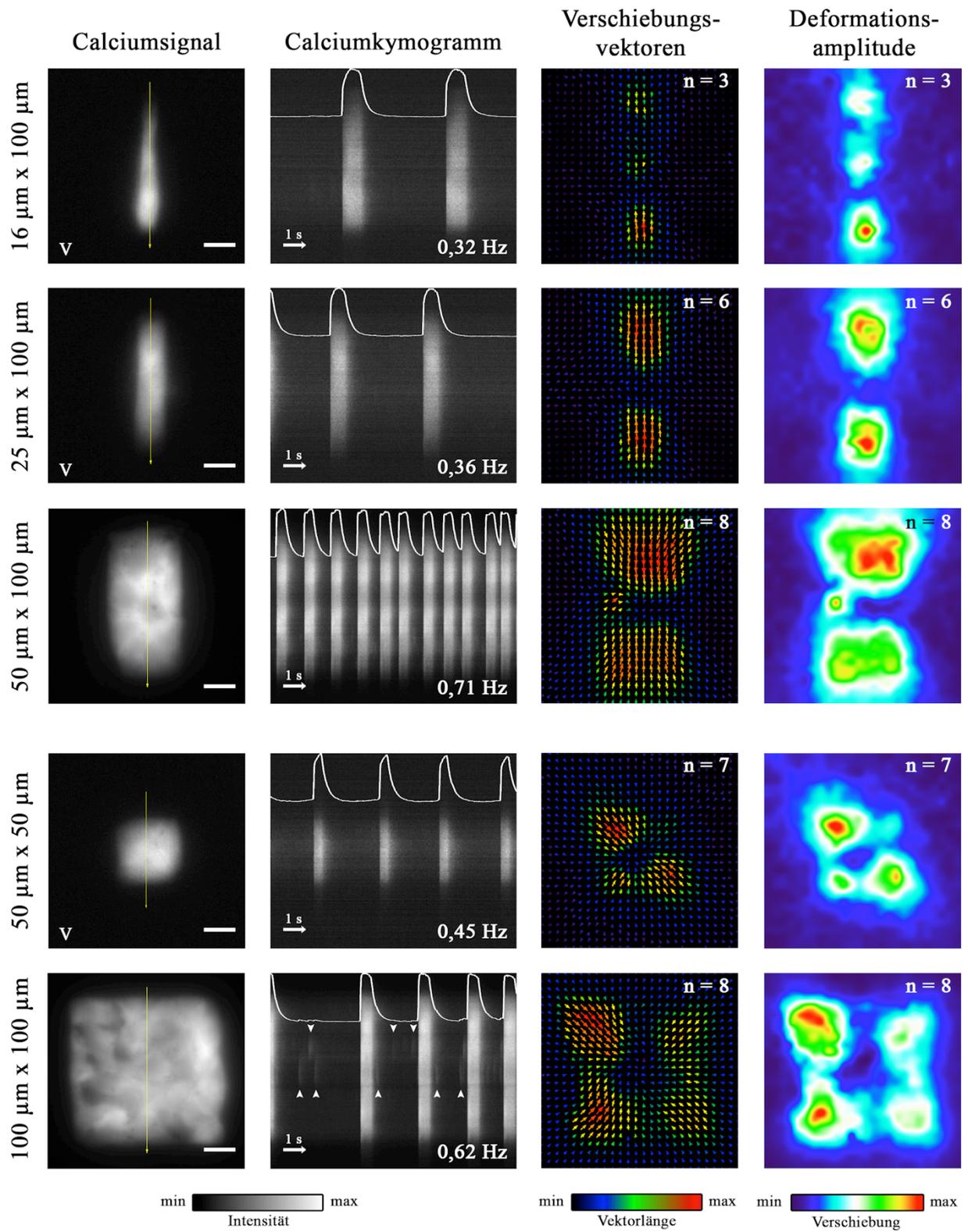
Der schnelle und gleichzeitige Anstieg der Signalintensität wies darauf hin, dass alle Bereiche des μ -Gewebes unabhängig von ihrer Entfernung zueinander gemeinsam depolarisierten. Zwar ließen sich gelegentlich Einzelevents beobachten, klassische Calciumwellen, speziell entlang der Strukturen mit hohem Aspektverhältnis tauchten allerdings auf Basis der hier verwendeten zeitlichen Aufnahmezeit nicht auf. Die elektro-chemische Kopplung der Kardiomyozyten bildete die notwendige Voraussetzung einer koordinierten und simultanen Kontraktion aller Zellen des μ -Gewebes.

3.6.3. Erregungs-Kontraktionskopplung in definierten Herzmuskel-Mikrogeweben

Im nächsten Schritt galt es zu überprüfen, ob die elektro-chemische Kopplung der Zellen innerhalb eines μ -Gewebes diese auch zu einer koordinierten Kontraktion befähigte. Dazu wurden die generierten Zellverbände mittels Zweikanalmessung hinsichtlich der Übersetzung des elektro-chemischen in ein mechanisches Signal in Form der Deformation ihres elastischen Analysesubstrats untersucht.

Wie für die Einzelzellen wurde für jedes der acht Beispiele der μ -Gewebe die Fluoreszenzintensität entlang eines vertikalen Linienprofils bestimmt und in einem Kymogramm spaltenweise nebeneinander aufgetragen (Abb. 3-24). Diese Kymogramme bestätigten zum einen den unter 3.6.2 beschriebenen simultanen Anstieg der Fluoreszenzintensität und damit den gleichzeitigen Einstrom von Calcium ins Zytoplasma der beteiligten Einzelzellen im Verband. Zum anderen ließen sich anhand der Kymogramme schwache, lokale Einzelereignisse erkennen, die jedoch nicht zur Auslösung eines globalen Aktionspotenzials führten.

Für alle μ -Gewebe wurde parallel zur Calciumanalyse die Substratdeformation anhand der Verschiebung der in das Substrat eingebetteten Markerkugeln bestimmt. Die daraus berechneten Verschiebungsvektorfelder wurden für alle identischen Strukturen auf Basis ihrer Zellflächen überlagert und die Länge der Vektoren an jeder Bildposition gemittelt. Die Vektorfelder und die daraus ermittelten Deformationsamplituden sind ebenfalls in Abb. 3-24 dargestellt. Aufgrund der zum Teil geringen Anzahl von Messungen wurden an dieser Stelle für jede Gruppe die Vektorfelder und Deformationsamplituden unabhängig der Zusammensetzung aller μ -Gewebe gemittelt.



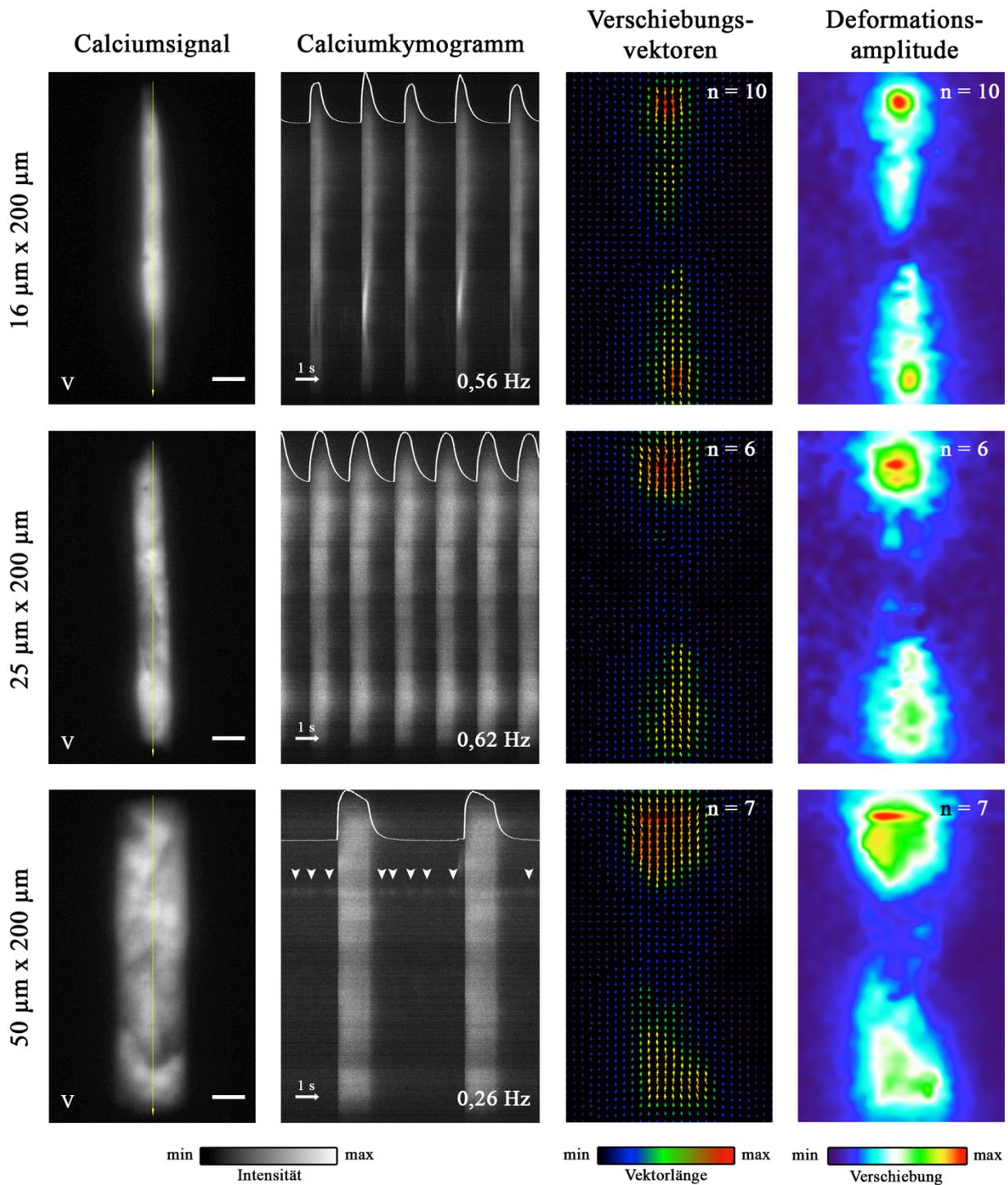


Abb. 3-24: Charakterisierung der Funktionalität kardialer Myozyten in kontrollierten Zellformen auf Basis ihres Calciumsignals und der durch ihre Kontraktion hervorgerufenen Substratdeformation. Die Bilder der ersten Spalte zeigen die Zellen aus Abb. 3-21 zum Zeitpunkt der maximalen Signalintensität. Die mit „V“ gekennzeichneten μ -Gewebe bestanden im jeweiligen Beispiel ausschließlich aus ventrikulären Zellen. Für jedes μ -Gewebe wurde die Grauwertintensität entlang eines Linienprofils (gelber Pfeil) mit einer zeitlichen Auflösung von 20 ms über eine Bildsequenz von 10 s ermittelt und alle Zeitpunkte nebeneinander in einem Kymogramm dargestellt. Das Linienprofil überspannt in den meisten Fällen mehr als drei Zellen. Anhand des simultanen Intensitätsanstieges ließ sich die funktionale Kopplung zwischen den Einzelzellen im Zellverband erkennen. Dunkle Spalten entsprechen einer niedrigen Fluoreszenzintensität während der Diastole des μ -Gewebes. Die Intensität stieg mit zunehmendem Calciumeinstrom bis zum Intensitätsmaximum während der Systole. Der

normierte Intensitätsverlauf ist am weißen Signalprofil abzulesen. Die Frequenz eines μ -Gewebes wurde berechnet, indem die Anzahl der Kontraktionen gezählt und durch den Betrag der Differenz zwischen den Zeitpunkten vor der ersten und nach der letzten Kontraktion geteilt wurde. Aus den Positionsunterschieden der fluoreszierenden Kugeln im relaxierten und maximal kontrahierten Zustand wurde für jedes μ -Gewebe ein Verschiebungsvektorfeld (VVF) berechnet. Diese wurde entsprechend der Zellflächen zur Deckung gebracht und gemittelt. Die relative Länge der Verschiebungsvektoren wurde zur Veranschaulichung über eine Skala farbindiziert. Aus den VVFs wurde anschließend die Deformationsamplitude bestimmt. n = Anzahl der in der Mittelung enthaltenen μ -Gewebe; Maßstäbe = 20 μm

Wie bereits bei den einzelligen Systemen aus Kapitel 3.3.2 ergab sich für die hier generierten Rechtecke ein Verschiebungsdipol, bei denen die stärksten Verschiebungen von den kurzen Kanten der Strukturen ausgehend in deren Zentrum zeigten und mit Annäherung an den Mittelpunkt der Struktur stetig abfielen, bis sie sich dort vollends kompensierten. Für die 16 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$, 50 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ und 16 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ großen μ -Gewebe ergab sich jedoch teilweise bis in die Nähe des Zentrums eine erkennbare Verschiebung. In diesen Fällen ist der Effekt vermutlich auf das unterschiedliche Adhäsionsverhalten der Zellen in den Einzelmessungen zurückzuführen und wird im Diskussionsteil näher betrachtet. Bei den quadratischen Strukturen ergaben sich ebenfalls zu den Einzelzellmessungen vergleichbare Verschiebungsmuster. Aus den Verschiebungsvektorfeldern geht hervor, dass die Hauptachsen der Verschiebung entlang der Winkelhalbierenden der rechten Winkel der quadratischen Strukturen verlaufen und ebenfalls in deren Zentrum zeigten. Zur Mitte des Gewebes nahmen sie ab bis sie schließlich nicht mehr nachzuweisen waren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Zellen in den künstlich generierten μ -Geweben funktionelle Synzytien bildeten, die in dieser Größenordnung qualitativ vergleichbare elektro-chemische und biomechanische Eigenschaften zu Einzelzellen in ähnlichen Geometrien geringerer Größe aufwiesen. Diese galt es im nächsten Schritt quantitativ zu erfassen.

3.6.4. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in definierten Herzmuskel-Mikrogeweben

Zur Bestimmung des Δt zwischen Calcium-Signal und der resultierenden Zellkontraktion wurden die unterschiedlichen μ -Gewebe aus Misch- und ventrikulären Zellverbänden analog zu den Messungen der Einzelzellen analysiert. Dabei wurden während der Zweikanalmessung die Änderung der Fluoreszenzintensität des Calcium-Indikators Fluo4-AM und die Verschiebung der im elastischen Substrat eingebetteten fluoreszierenden Markerkugeln simultan mit einer zeitlichen Auflösung von 50 Hz analysiert. Der berechnete Δt wurde gegen die Kontraktionsfrequenz aufgetragen (Abb. 3-25).

Die Korrelation zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt blieb, wenn auch schwächer ausgeprägt, für μ -Gewebe weitestgehend erhalten. Zellverbände mit Kontraktionsfrequenzen oberhalb des Medians wiesen niedrige Δt -Werte auf und solche unterhalb des Medians zeigten einen hohen Δt . Der Median der Kontraktionsfrequenz für die aus der Mischpopulation aufgebauten μ -Gewebe betrug 0,73 Hz ($\mu = 0,81$ Hz, $\sigma = 0,34$ Hz, $n = 34$) und für die ventrikulären Zellverbände 0,39 Hz ($\mu = 0,50$ Hz, $\sigma = 0,24$ Hz, $n = 23$). In beiden Fällen schlugen die mehrzelligen Systeme damit deutlich langsamer als die Einzelzellen (vgl. Abb. 3-15). Der Median des Δt für ventrikuläre Gewebe lag mit 147 ms ($\mu = 150$ ms, $\sigma = 71$ ms, $n = 23$) nur geringfügig höher als der Median der Misch-Gewebe mit 130 ms ($\mu = 130$ ms, $\sigma = 60$ ms, $n = 33$). Eine Messung der Misch-Gewebe konnte nicht ausgewertet werden. Im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Δt und der Gewebegeometrie ließ sich keine direkte Abhängigkeit erkennen. Sowohl die kleinen als auch die großen Formen wiesen unterschiedlich hohe Δt auf. Einige große Geometrien mit hohen Zellzahlen besaßen zum Teil kurze Δt . Tendenziell lag der Δt für Strukturen mit hohen Aspektverhältnissen vergleichsweise höher als der der restlichen Strukturen.

Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen der Zellfläche der μ -Gewebe und Δt untersucht (Abb. 3-26). Wie bereits für die Einzelzellen gezeigt, ließ sich auch hier keine Abhängigkeit des Δt von der Zellfläche erkennen (vgl. Abb. 3-4). μ -Gewebe mit einer Zellfläche $> 5000 \mu\text{m}^2$ besaßen für Δt , ähnlich wie für wenige Einzelzellen, einen Medianwert von 101 ms ($\mu = 120$ ms, $\sigma = 52$ ms, $n = 16$). Solche Strukturen, die aus ≥ 15 Zellen bestanden zeigten dabei sogar einen unterdurchschnittlichen Δt .

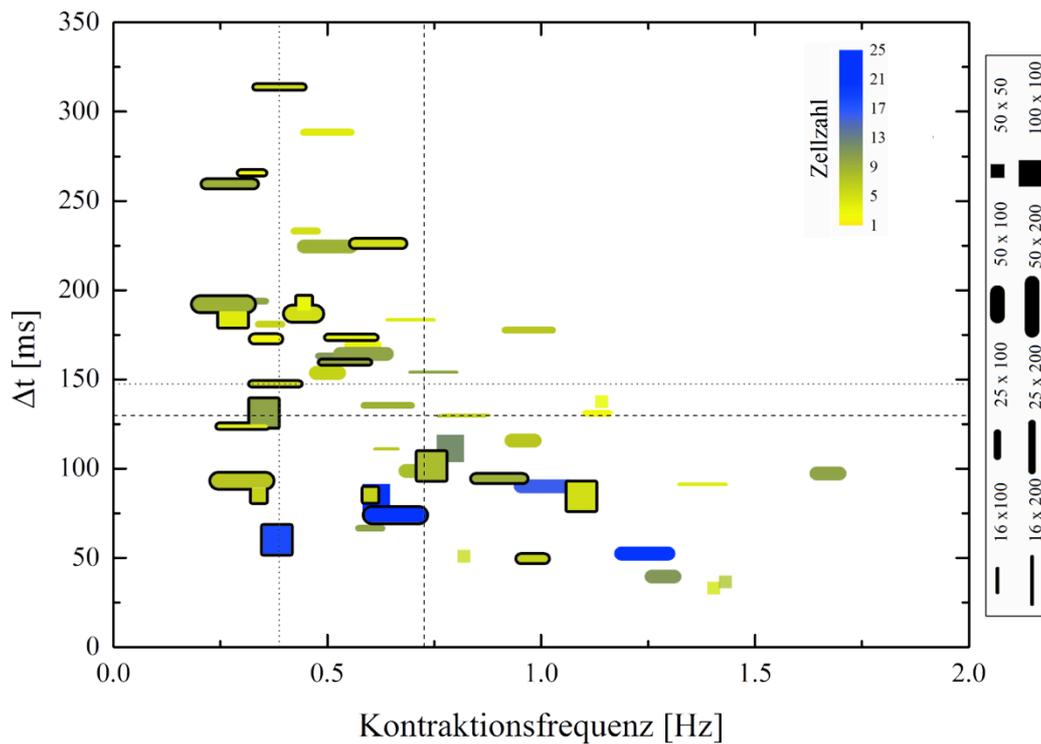


Abb. 3-25: Zusammenhang zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz Δt in Abhängigkeit der μ -Gewebegeometrie. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die in einem μ -Gewebe enthaltene Zellzahl. Die umrahmten Datenpunkte repräsentieren μ -Gewebe, die ausschließlich aus ventrikulären Zellen bestanden. Die dünn bzw. dick gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters der ventrikulären Zellverbände bzw. den der Mischpopulation dar.

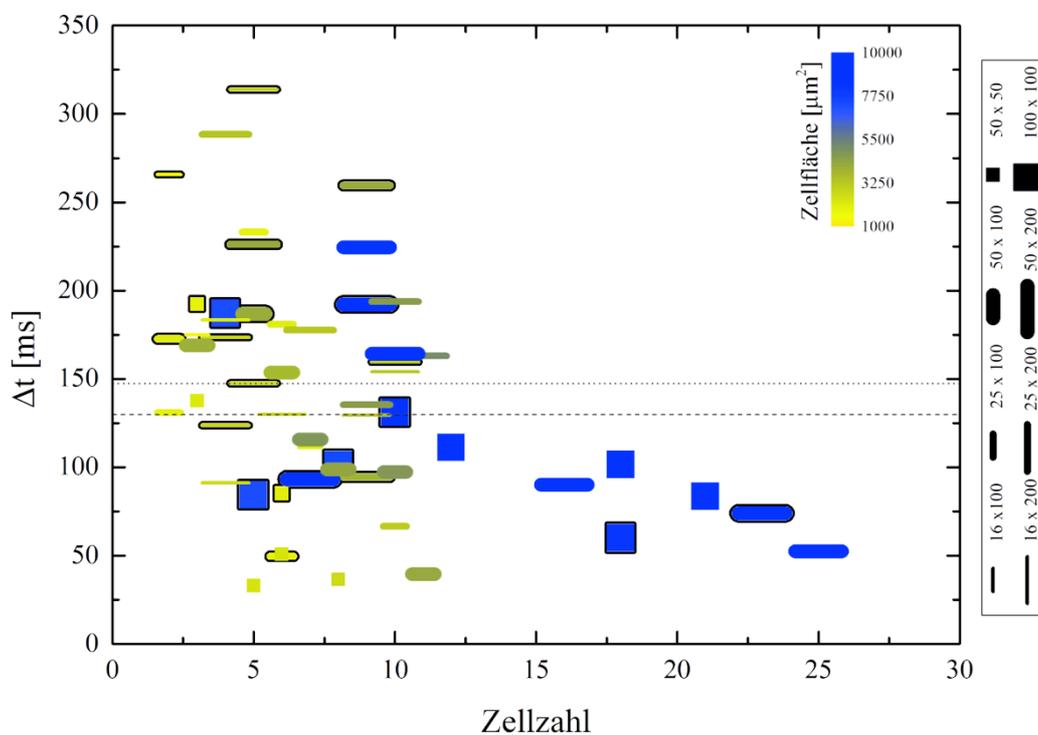


Abb. 3-26: Zusammenhang zwischen der Zellzahl und dem zeitlichen Versatz Δt in Abhängigkeit der μ -Gewebegeometrie. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Fläche des μ -Gewebes. Die umrahmten Datenpunkte repräsentieren μ -Gewebe, die ausschließlich aus ventrikulären Zellen bestanden.

In einer direkten Gegenüberstellung der Einzelmessungen aus den verschiedenen μ -Gewebegeometrien zeigte sich in fünf von acht Fällen ein höherer Medianwert für den Δt ventrikulärer Zellverbände im Vergleich zu ihren aus Mischpopulationen aufgebauten Gegenstücken (Abb. 3-27). Die $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ großen Strukturen beider Gruppen zeigten nahezu gleiche Medianwerte, für $25 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ und $50 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ließ sich für die ventrikulären μ -Gewebe ein niedrigerer Δt verzeichnen. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass die Ergebnisse auf einer kleinen Stichprobe basieren und stichhaltige Aussagen vermutlich erst nach weiteren Versuchen getroffen werden können.

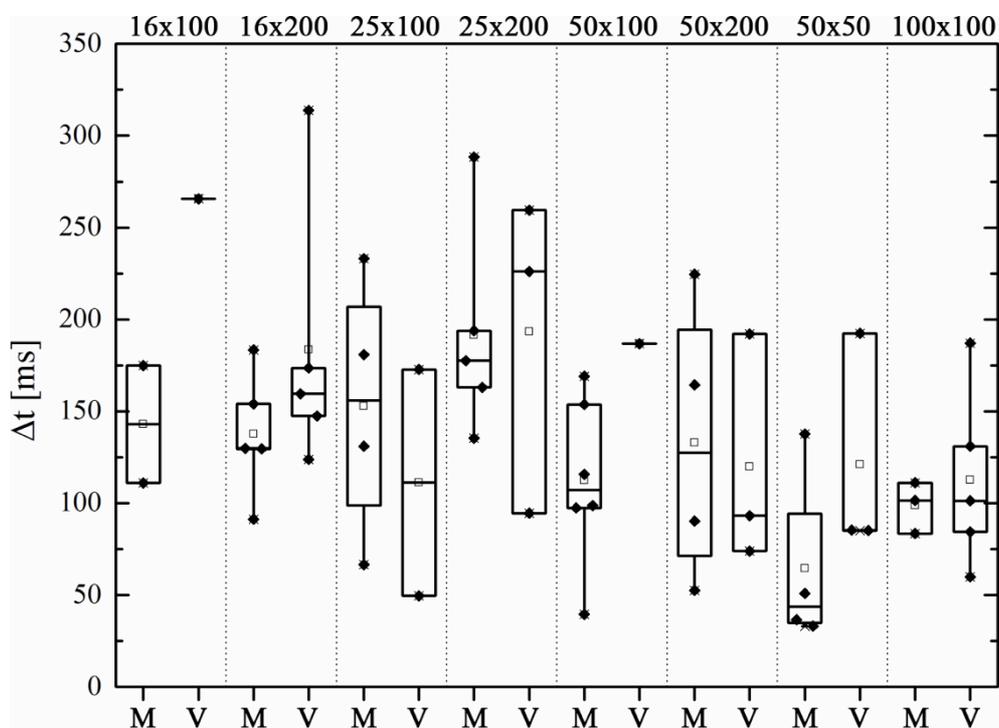


Abb. 3-27: Zusammenhang zwischen der μ -Gewebegeometrie und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Calcium-Signalen und Substratdeformation. Die Zahlen auf der oberen Abszisse entsprechen den vorgegebenen Abmessungen der μ -Gewebe in [μm]. M = μ -Gewebe aus gemischter Kardiomyozytenpopulation, V = μ -Gewebe aus ventrikulären Kardiomyozyten, schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%- bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer, Raute = Einzelmessung.

3.6.5. Abschätzung der kontraktile Kräfte kardialer Myozyten in definierten Herzmuskel-Mikrogeweben

Anhand der durch die Kontraktion der μ -Gewebe hervorgerufenen Substratdeformationen wurden deren kontraktile Gesamtkräfte bestimmt. Dabei ließ sich eine mit zunehmender Zellzahl und Größe des μ -Gewebes steigende Kontraktionskraft beobachten (Abb. 3-28). μ -Gewebe gleicher Größe kontrahierten stärker mit steigender Zellzahl.

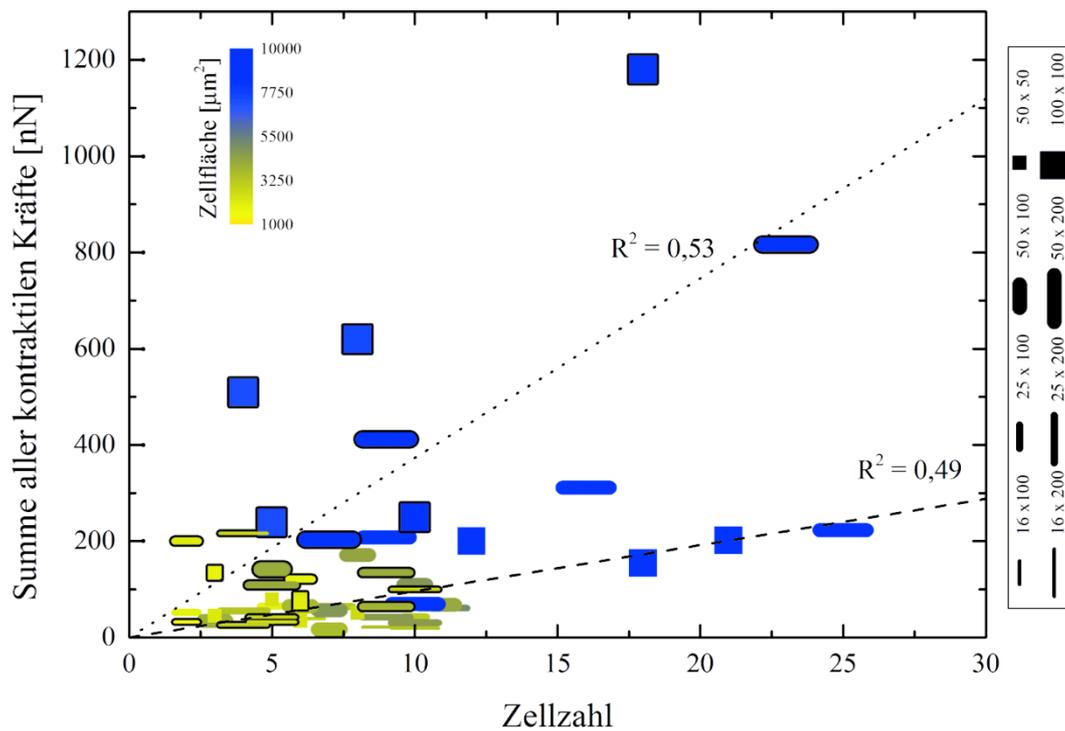


Abb. 3-28: Zusammenhang zwischen der Zellzahl und der Summe aller kontraktile Kräfte in Abhängigkeit der μ -Gewebegeometrie. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Fläche des μ -Gewebes. Die umrahmten Datenpunkte repräsentieren μ -Gewebe, die ausschließlich aus ventrikulären Zellen bestanden. Das Bestimmtheitsmaß R^2 der gepunkteten Linie gibt den Grad des Zusammenhangs zwischen Zellzahl und Kontraktionskraft ventrikulärer μ -Gewebe an, die gestrichelte Linie den der Misch-Gewebe.

Im direkten Vergleich der unterschiedlich zusammengesetzten μ -Gewebe gleicher Größe wiesen durchweg alle ventrikulären Zellverbände die höheren kontraktile Gesamtkräfte auf (Abb. 3-29). Wie unter 3.6.4 bereits angemerkt, sei auch hier auf die zum Teil geringe Anzahl an Einzelmessungen verwiesen. Die statistische Relevanz der Daten sollte durch weitere Folgeversuche verifiziert werden.

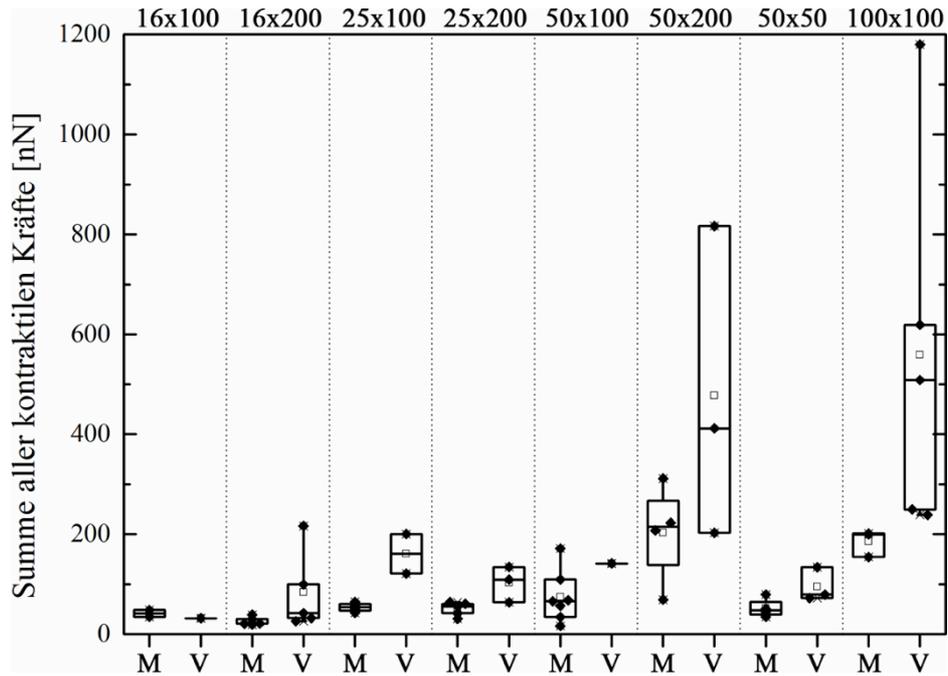


Abb. 3-29: Summe aller kontraktilen Kräfte in Abhängigkeit der μ -Gewebegeometrie; Die Zahlen auf der oberen Abszisse entsprechen den vorgegebenen Abmessungen der μ -Gewebe in [μm]. M = μ -Gewebe aus gemischter Kardiomyozytenpopulation, V = μ -Gewebe aus ventrikulären Kardiomyozyten, schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%- bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer, Raute = Einzelmessung.

3.7. Charakterisierung humaner, aus induziert pluripotenten Stammzellen-abgeleiteter Kardiomyozyten

In dieser Arbeit wurden differenzierte Kardiomyozyten aus embryonalen Rattenherzen hinsichtlich ihrer Erregungs-Kontraktionskopplung untersucht. Als Maß dafür dienten unter anderem der zeitliche Versatz zwischen Calcium-Signalen und der resultierenden durch die Zellkontraktion hervorgerufenen Substratdeformation. Mit Hilfe dieses Messverfahrens ließen sich durch die Korrelation zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt , aber auch auf Basis verschiedener Strukturparametern ventrikuläre und atriale Kardiomyozyten voneinander unterscheiden und anhand der für sie charakteristischen Kennzahlen innerhalb einer Mischkultur identifizieren.

In einem abschließenden Versuch sollte untersucht werden, inwiefern sich die in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden auf aus Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten anwenden ließen, um diese somit einer der beiden Zelltypen zuordnen zu können. Dazu wurden humane, aus induziert pluripotenten Stammzellen (engl.: *induced pluripotent stem cells*, *iPSCs*) abgeleitete Kardiomyozyten (Cor.4U, Axiogenesis, Köln) auf elastischen Analysesubstraten mit eingebetteten, fluoreszierenden Markerkugeln und einer Steifigkeit von 15 kPa für 2 Tage kultiviert und anschließend wie zuvor beschrieben mittels simultaner Zweikanalmessung analysiert.

3.7.1. Zellmorphologie iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten

Zur Untersuchung ihrer Zellmorphologie wurden die iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten in einem ersten Schritt gegen α -Actinin gefärbt und zur Bestimmung der Zellzahl wurden ihre Zellkerne mittels DAPI Behandlung visualisiert.

Abb. 3-30 veranschaulicht anhand von sechs Beispielen die typische Form und den Aufbau der verwendeten iPSC-Kardiomyozyten nach zweitägiger Kultur auf elastischen Silikonkautschuksubstraten. Einzelzellen bildeten rundliche Adhäsionsformen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Sarkomerstrukturen. Zumeist verliefen die Myofibrillen der Einzelzellen radial entlang der Zellgrenzen, wie es auch für die Primärzellen in künstlich generierten Kreisgeometrien der Fall war. Es ließen sich keine länglich aufgespreiteten Zellen erkennen.

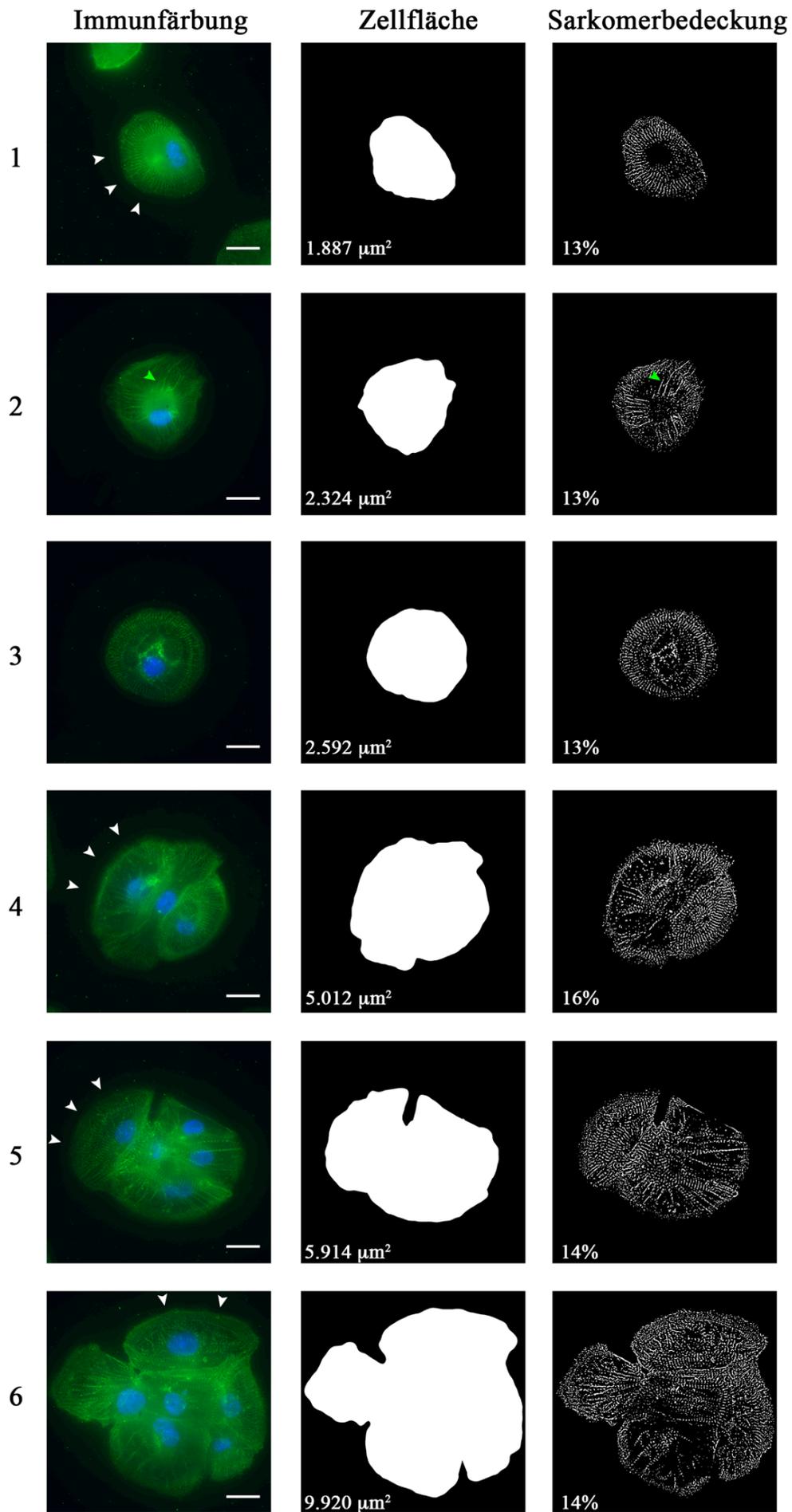


Abb. 3-30: Zellmorphologie iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten unterschiedlicher Größe als Einzelzellen (1-3) und im Zellverband (4-6). Aus den α -Actinin Färbungen (grün) wurden die Binärmasken der Zellfläche und der Sarkomere bestimmt. Die eingefügten Zahlen entsprechen den für die einzelnen Beispiele ermittelten Werten der Zellfläche und des Bedeckungsgrades der Zellfläche mit Sarkomeren. In blau sind die Kerne der Zellen zu erkennen. Die weißen Pfeilspitzen markieren die lamellenartigen Ausstülpungen des jeweiligen Zellkörpers. Die gelbe Pfeilspitze in Beispiel 2 markiert eine Stressfaser-artige Struktur. Maßstäbe 20 μ m

Auch in Zellverbänden behielten die Zellen ihre für sie charakteristisch rundliche Form und ließen sich daher am ehesten mit den weniger organisierten ventrikulären Primärzellen vergleichen. Manche Zellen besaßen lamellenartige Ausstülpungen des Zellkörpers und ähnelten damit polarisierten epidermalen Zellen. Jedoch konnten auch in diesen Ausstülpungen Myofibrillen identifiziert werden. Mit zunehmender Zellzahl ließ sich auch eine Vergrößerung der Zellfläche beobachten und der Bedeckungsgrad des α -Actinin Signals lag mit Werten zwischen 13-16% innerhalb des für Primärzellen ermittelten Bereichs. Der effektive Bedeckungsgrad der Sarkomere lag jedoch vermutlich unter diesem Wert, da Strukturen in dieser Auswertung mit einbezogen wurden, die offensichtlich nicht in den Z-Banden lokalisiert waren.

3.7.2. Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Calcium-Signal und Zellkontraktion in iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten

Die verwendeten iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten wurden aus konfluent in einer Monoschicht wachsenden und simultan schlagenden Zellverbänden enzymatisch vereinzelt und auf die zuvor beschichteten Analysesubstrate ausgebracht. Diese schlugen bereits nach wenigen Stunden wieder eigenständig und konnten nach 2 Tagen unter den zuvor beschriebenen Versuchsbedingungen untersucht werden, mit dem einzigen Unterschied, dass sie permanent im speziell für sie entwickelten und vom Hersteller bezogenen Medium (Ax-M-HC250, Cor.4U Kulturmedium, Axiogenesis) gehalten werden mussten. Der Austausch des Kulturmediums gegen den für alle anderen Versuche verwendeten Analysepuffer führte zu sofortigem Arrest der Zellkontraktion. Die Beladung der Zellen mit dem Calcium-Indikator Fluo4-AM erfolgte daher ebenfalls im mitgelieferten Kulturmedium. Trotz der Anwesenheit des im Medium enthaltenen Kälberserums, welches aufgrund seiner Aggregatbildung mit dem Farbstoff nicht im für die anderen Versuche verwendeten Ladepuffer (siehe 2.5.2) enthalten war, gelang eine Beladung der Cor.4U Zellen problemlos.

Von den insgesamt 74 Zellen mit einem regelmäßigen Calciumsignal konnten nur 36 Zellen bzw. Zellverbände hinsichtlich ihres Δt analysiert werden, da der Rest von ihnen trotz ihrer spontanen Depolarisation und deutlich erkennbarem Calciumstrom nicht in der Lage waren, das Substrat durch ihre Kontraktion zu deformieren. Bei den analysierten Zellen handelte es sich sowohl um Einzelzellen als auch um kleine Zellverbände. Für diese ließ sich der charakteristische Verlauf der Korrelation zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt ebenfalls nachweisen (Abb. 3-31). Der Median der Frequenz aller untersuchten Zellen lag bei 0,97 Hz ($\mu = 0,98$ Hz, $\sigma = 0,37$ Hz) und der Median des Δt betrug 62 ms ($\mu = 77$ ms, $\sigma = 43$ ms). Durch Unterteilung des Graphen auf Basis der Medianwerte ließen sich zwei Hauptpopulationen von Zellen identifizieren. Dabei lagen 15 der 18 Zellen mit einer Kontraktionsfrequenz $> 0,98$ Hz unterhalb des Medians des Δt (unterer rechter Quadrant) und ebenfalls 15 von 18 weiteren Zellen über dem Medianwert (oberer linker Quadrant). Die Zellzahl innerhalb der Zellverbände schien in diesem Zusammenhang keinen Einfluss auf das Signalverhalten zu haben.

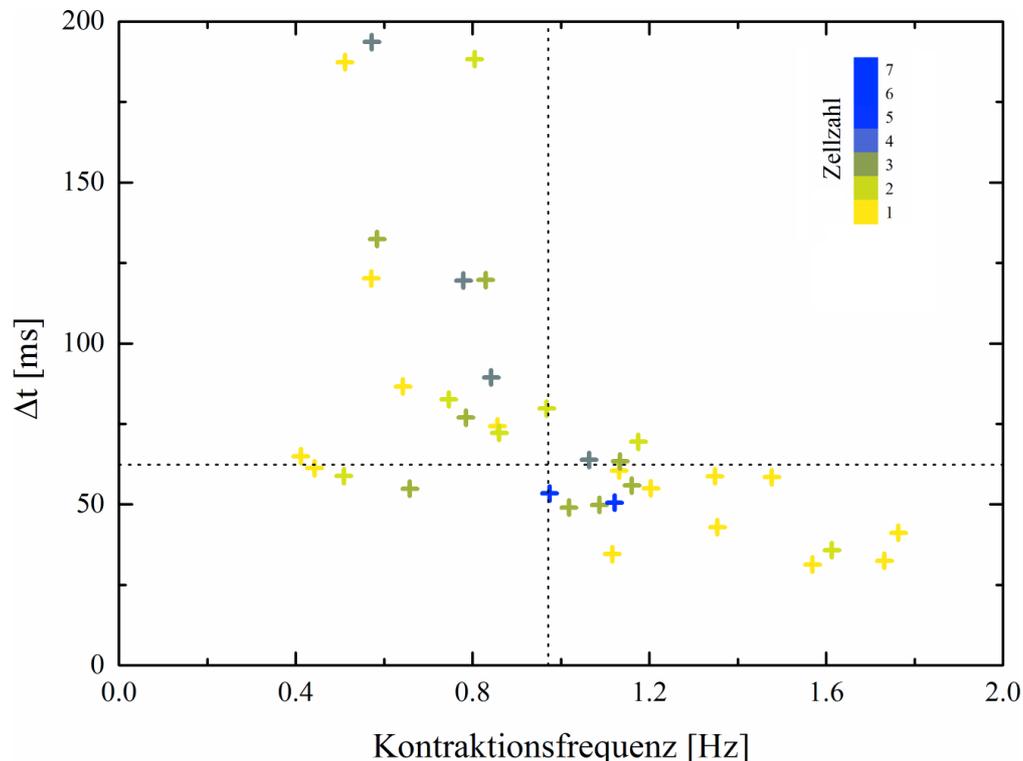


Abb. 3-31: Zusammenhang zwischen der Kontraktionsfrequenz und dem zeitlichen Versatz Δt in iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten. Jedes „+“ entspricht einer Einzelmessung, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Anzahl der Zellen innerhalb des analysierten Verbandes. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar.

3.7.3. Abschätzung der kontraktile Kräfte iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten

Wie bereits erwähnt war nur die Hälfte aller spontan kontrahierenden Cor.4U Zellen trotz erkennbarer Verkürzung des Zellkörpers in der Lage das unterliegende Substrat zu verformen. Aus den verbleibenden Zellen bzw. Zellverbänden wurden die kontraktile Kräfte ermittelt und in Abhängigkeit der Zellfläche und Zellzahl untersucht (Abb. 3-32).

Die Zellfläche stieg mit zunehmender Zellzahl an. Für alle analysierten Zellen und Zellverbände ergab sich ein Median von $2.764 \mu\text{m}^2$ ($\mu = 3.436 \mu\text{m}^2$, $\sigma = 2.069 \mu\text{m}^2$) und ein Aspektverhältnis von 1,18 ($\mu = 1,25$, $\sigma = 0,17$). Als Median erreichten die Cor.4U Zellen eine Kraft von 69 nN ($\mu = 90 \text{ nN}$, $\sigma = 79 \text{ nN}$). Bei 15 der insgesamt 36 Messungen handelte es sich um Einzelzellanalysen. Auf Einzelzellebene erreichten die iPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten einen Median von 57 nN ($\mu = 78 \text{ nN}$, $\sigma = 89 \text{ nN}$, Abb. 3-33). Die hohe Standardabweichung wurde durch einen Ausreißer mit 362 nN verursacht.

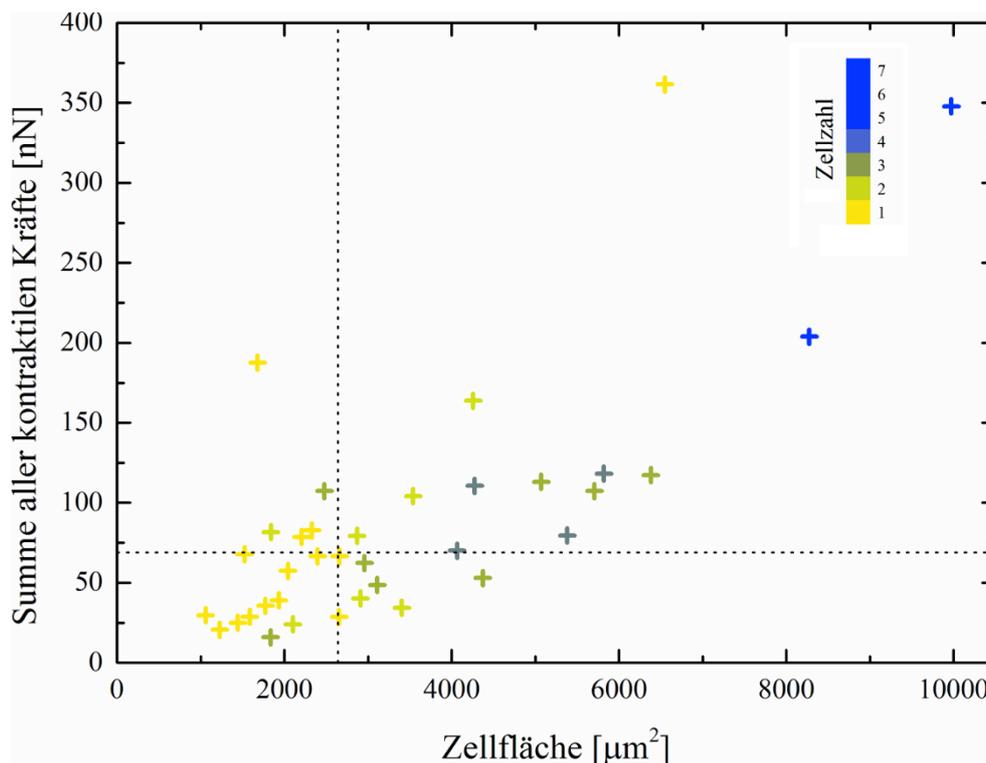


Abb. 3-32: Zusammenhang zwischen der Zellfläche und der Summe aller kontraktile Kräfte in iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten. Jedes „+“ entspricht einer Einzelmessung, die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Anzahl der Zellen. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des jeweiligen Analyseparameters dar.

Die kontraktile Gesamtkräfte der Cor.4U Zellen lagen damit im Vergleich zu denen der ventrikulären und atrialen Primärzellen deutlich niedriger (Abb. 3-33). Für die ventrikulären Zellen ergab sich ein Median von 101 nN ($\mu = 120$ nN, $\sigma = 69$ nN) und für atriale Zellen bei 87 nN ($\mu = 95$ nN, $\sigma = 48$ nN). Diese Werte stammten aus den unter 3.5.4 beschriebenen Untersuchungen.

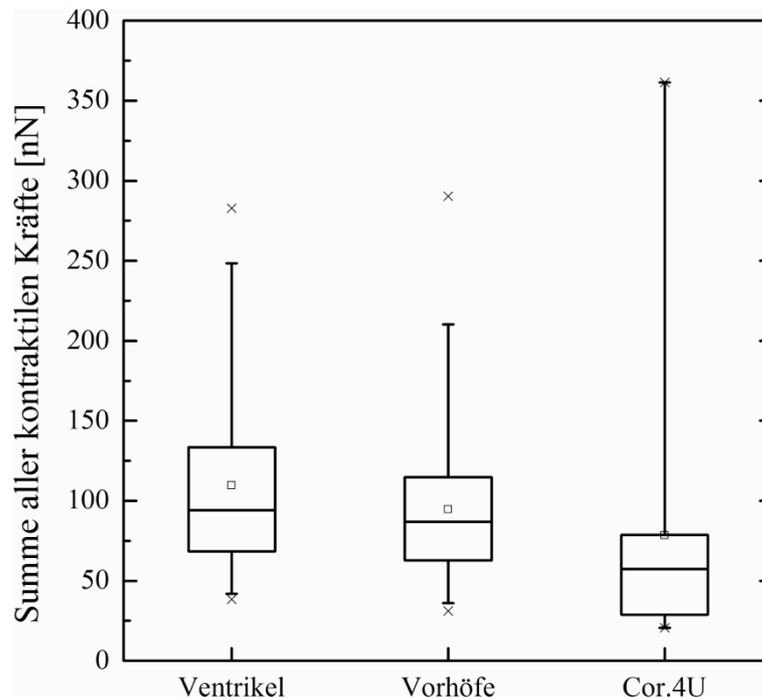


Abb. 3-33: Vergleich der Summe aller kontraktile Kräfte ventrikulärer und atrialer Kardiomyozyten und iPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten auf Einzelzellebene. Schwarzes Quadrat = Mittelwert, horizontale schwarze Linie = Median, Box = 25%- bzw. 75%-Quartil, Whisker = Min/Max, X = Ausreißer.

4. Diskussion

4.1. Niedrige Fusogenität kardialer Myozyten ermöglicht zellspezifische Anreicherung

Die Interaktionen von Zellen in mehrzelligen Systemen auf Gewebs- oder Organebene sind komplexe Prozesse, die zum Teil erst im Zusammenhang verstanden werden können, wenn deren individueller Beitrag zum Gesamtgefüge geklärt ist. Zu einem besseren Verständnis der Interaktion differenzierter Herzmuskelzellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrzellige Systeme, sogenannte μ -Gewebe, etabliert und biochemisch sowie zellmechanisch charakterisiert. Die Analyse stellte hohe Anforderungen an die Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit des zu untersuchenden Systems. Um die Homogenität der zu untersuchenden Systeme zu gewährleisten, wurden μ -Gewebe untersucht, die ausschließlich aus differenzierten, embryonal isolierten kardialen Myozyten bestanden. Diese bilden im murinen Myokard mit ungefähr 56% den Hauptanteil der Zellen. Neben den Herzmuskelzellen tragen Fibroblasten mit ca. 27% einen signifikanten Teil zur Gesamtzellzahl des Herzmuskels bei (Banerjee et al., 2007). Diese weisen im Gegensatz zu Kardiomyozyten zum Teil hohe Proliferationsraten auf mit Verdopplungszeiten zwischen 15 und 30 Stunden je nach Kulturbedingungen (Yusuf et al., 2013). Diese hohe Teilungsrate stellen für die Erhaltung definierter Strukturen mehrzelliger Systeme und Langzeitkulturen ein schwerwiegendes Problem dar, da Kardiomyozyten selbst als enddifferenzierte Zellen nahezu keine Teilungsrate mehr aufweisen. Aus diesem Grund mussten die isolierten Kardiomyozyten zunächst angereichert werden, um zum einen die Integration unerwünschter Zelltypen in die μ -Gewebe zu verhindern, zum anderen um das Analysesubstrat frei von proliferierenden Zellen zu halten, die die geordneten Strukturen überwachsen können.

Zur Anreicherung der kardialen Myozyten wurde eine Methodik entwickelt, dessen Basis ein System darstellte, welches im Institut entwickelt worden war. Es basierte auf der Funktionalisierung der Plasmamembran von Zellen mittels fusogener Liposomen (Kleusch et al., 2012; Csiszár et al., 2014; Hoffmann et al., 2014; Naumovska et al., 2014). Hierbei ist die Effizienz des Fusionsprozesses von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich. Während die Plasmamembran von Fibroblasten gut empfänglich für die Reaktion mit Fusionsliposomen (FLs) zu sein schien, zeigten Kardiomyozyten für die Behandlungsdauer von 4 min eine besonders niedrige Fusionseffizienz (Fusogenität). Diese Beobachtung wurde sich in der vorliegenden Arbeit zunutze gemacht, um die beiden Zellpopulationen nach erfolgter Primärisolation voneinander zu trennen. Dazu wurde in die FLs neben dem neutralen Lipid

DOPE und dem kationischen Lipid DOTAP zusätzlich ein DOPE-Biotin Konjugat eingebaut, welches nach Fusion der FLs mit der Zielzelle in ihre Plasmamembran inkorporiert wurde, um diese zu funktionalisieren. Die Biotingruppen eigneten sich aufgrund ihrer hohen Bindeaffinität zu Avidin ($K_d = 10^{-14}$ bis 10^{-15} mol/l; Hytönen et al., 2005) hervorragend für die selektive Markierung mittels Avidin-konjugierter Magnetpartikel (Hersch et al., 2015).

Der Fusionsmechanismus als solcher ist noch nicht vollkommen entschlüsselt. Es liegt jedoch nahe, dass die Fusogenität verschiedener Zellen mit ihrer charakteristischen Oberflächenbeschaffenheit zusammenhängen muss. Ein Indiz dafür lieferten Mounkes und Kollegen (Mounkes et al., 1998), als sie zeigten, dass die Aufnahme von kationischen Liposomen-DNA Komplexen in aktivierten Lymphozyten erst durch die Anwesenheit membranständiger Proteoglykane ermöglicht wurde. Der gleiche Effekt konnte auch für die Polyamin-basierten kationischen Lipide Lipofectamin und Transfectam gezeigt werden (Belting & Petersson, 1999a; b).

Dies würde ebenfalls eine Erklärung für die erfolglosen Versuche des transienten Transfers von Plasmid-DNA in kardiale Myozyten durch das nicht-virale Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI) liefern. PEI ist in der Biotechnologie zur Herstellung rekombinanter Proteine weit verbreitet. Aufgrund seiner hohen positiven Ladungsdichte ist es in der Lage Nukleinsäuren effizient zu kondensieren (Boussif et al., 1995). Diese bilden mit DNA positiv geladene transfektions-kompetente Komplexe (sogenannte „Polyplexe“), welche wiederum mit anionischen Resten an der Zelloberfläche wechselwirken. Ein postulierter Mechanismus für deren Aufnahme ist die unspezifische Bindung an die negativ geladenen Glykosaminoglykan-Seitenketten der Glypikane und Syndekane, den beiden Hauptgruppen der Heparansulfat-Proteoglykane (Kopatz, Remy & Behr, 2004).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die geringe Fusogenität kardialer Myozyten ist ihr instabiles Membranpotenzial. Für zell-penetrierende kationische Peptide konnte gezeigt werden, dass deren Aufnahme stark vom transmembranen Potenzial der Zielzelle abhängt (Rothbard et al., 2004; Lin & Alexander-Katz, 2013). Die verwendeten FLs besitzen ein Zeta-Potenzial von +75 mV (Hersch et al., 2015). Dieses stark positive Potenzial ermöglicht normalerweise den Kontakt zwischen den FLs und der negativ geladenen Plasmamembran. Frisch isolierte Kardiomyozyten zeigten bereits in Suspension spontane lokale oder globale Calcium-Ereignisse (Abb. 4-1). Während der Depolarisation einer Herzmuskelzelle steigt ihr Membranpotenzial von -90 mV auf +30 mV an (siehe 1.1.5.2). Es wäre denkbar, dass es daher aufgrund der Potenzialumkehr zu kurzzeitigen elektrostatischen Abstoßungsreaktionen zwischen den positiv geladenen FLs und der depolarisierten Zelle kommt.

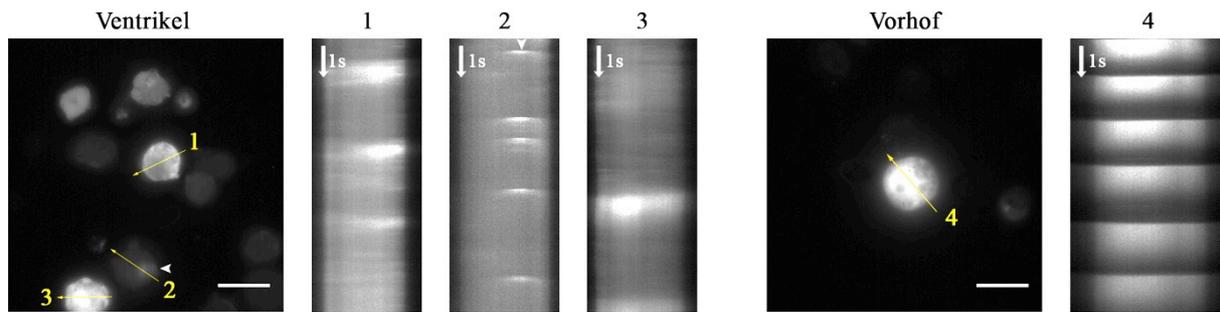


Abb. 4-1: Spontaner Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration in frisch isolierten, in Suspension befindlichen ventrikulären und atrialen Kardiomyozyten. Die Kymogramme verdeutlichen den Signalverlauf der Fluo4-AM Fluoreszenzintensität entlang der Linienprofile (gelbe Pfeile) in den Zellen 1 bis 4 in einem Zeitraum von 10 Sekunden. Die weiße Pfeilspitze in Zelle 2 markiert lokale Calcium-Ereignisse. Maßstäbe = 40 μm

Ähnliche Effekte wurden in Fall der SNARE-vermittelten Fusion zwischen biologischen Membranen beobachtet. Diese spielen unter anderem eine Schlüsselrolle bei dem vom endoplasmatischen Retikulum ausgehenden Vesikeltransport und dem Andocken des Transportvesikels an die Zielmembran (Burri et al., 2003) oder der Exozytose von Neurotransmittern aus Nervenzellen in den synaptischen Spalt (Schiavo et al., 1997). SNARE Proteine (engl.: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) lassen sich grob in zwei Kategorien klassifizieren. Zum einen *vesicle* oder *v*-SNAREs, die in der Membran des Transportvesikels lokalisiert sind, zum anderen *target* oder *t*-SNAREs, die sich in den Membranen der Zielkompartimente befinden (Malsam & Söllner, 2011). Treten beide in nahen räumlichen Kontakt vermitteln sie die Fusion der Donor- und der Zielmembran. Zur Analyse der Interaktion von *v*-SNAREs und *t*-SNAREs wurden diese in die Membranen von FLs integriert und deren Annäherung unter physiologischen Salzkonzentrationen mittels FRET-Messungen analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Verringerung der Ionenstärke des Analysepuffers zur Inhibierung der SNARE-vermittelten Membranfusion führte (van den Bogaart et al., 2011). Unter Kontrollbedingungen bei 150 mM KCl waren die Liposomen noch in der Lage sich auf 7Å anzunähern, während eine Reduktion der Ionenstärke in einem 5 mM KCl Puffer den Abstand auf 25Å erhöhte, was auf die ladungsbedingte Abstoßung der beiden FLs zurückzuführen war, da beiden hohe Anteile anionischer Lipide enthielten.

Die Hypothese der elektrostatischen Abstoßung zwischen den Kardiomyozyten und den FLs wurde überprüft, indem adhärent wachsende, spontan kontrahierende Myozyten mit dem Dihydropyridin Nifedipin behandelt wurden, um die L-Typ Calciumkanäle zu blockieren und somit die Depolarisation der Zellen zu unterdrücken. Allerdings ließ sich auf Basis weniger

Versuche keine erfolgreiche Fusion verzeichnen. Dieser Ansatz wird im Anschluss an diese Arbeit allerdings weiterhin verfolgt.

Die Charakterisierung der Aufreinigungseffizienz der kardialen Myozyten aus der Mischkultur der Primärisolation erfolgte auf Basis fluoreszenzmikroskopischer Analysen an adhärent wachsenden, fixierten und immunhistologisch markierter Zellen. Der in der Literatur beschriebene Myozyten-spezifische Oberflächenmarker SIRP α (Dubois et al., 2011) für die Anwendung in der Durchflusszytometrie erwies sich in unseren Händen als unbrauchbar. Eine weitere, nicht-genetische Möglichkeit zur zytometrischen Unterscheidung von Myozyten in Mischkulturen besteht in der Färbung ihrer Mitochondrien mittels Tetramethylrhodamin-Methylester Perchlorat (Hattori et al., 2010). Dieser Ansatz wurde jedoch nicht weiter verfolgt. Der Versuch der Etablierung einer eigenen zytometrischen Färbemethode durch Fixierung und Perforation der Zellen nach Isolation und anschließender Markierung intrazellulärer Strukturen war ebenfalls nicht erfolgreich. Die bei adhärent wachsenden Zellen hochspezifische Färbung des sarkomerspezifischen α -Actinins wurde in mehreren Versuchsansätzen erprobt. Diese ergab aber aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen des Sekundärantikörpers in allen Zellen der Primärisolation falsch-positive Signale. Auch die Konjugation des Primärantikörpers mit hochspezifischen, fluoreszenzmarkierten F(ab)₂ Fragmenten (Zenon Alexa Fluor 488 Ziege Anti-Maus IgG1 Kit, Life Technologies) lieferte keine Verbesserung, obwohl die Funktionalität der Konjugate in adhären Zellen überprüft wurde und diese durchaus zufriedenstellende Resultate zeigten.

Aus den Immunfärbungen der unter 3.6 gezeigten Ergebnisse der μ -Gewebe geht hervor, dass sich kardiale Myozyten zum einen erfolgreich anreichern ließen und diese zum anderen auch funktionell waren. In keinem der analysierten Zellverbände ließen sich Fibroblasten oder andere Zellsorten nachweisen. Die Quantifizierung des Myozytengehalts in den aufgereinigten Zellfraktionen (siehe 3.1) wies ebenfalls deutlich auf eine erfolgreiche Anreicherung hin. Zusätzlich wurde die Datensätze auch manuell ausgezählt. Dabei ergab sich für das Makro eine Abweichung von lediglich 2% unterhalb des Realwertes, wodurch die ermittelten Zellzahlen in Wirklichkeit minimal höher lagen, als vom Algorithmus bestimmt wurde.

4.2. Zellausrichtung und Sarkomeranordnung in definierten Geometrien bestimmen Muster der Substratdeformation

Innerhalb der vergangenen 20 Jahre konnte die vielfältige Wirkung der Form auf die Zellphysiologie nachgewiesen werden. So beeinflusst sie unter anderem das Zellspreiten und die Bildung von Adhäsionsstrukturen (Lehnert et al., 2004), Apoptose (Chen et al., 1997), Differenzierung und Migration (Parker et al., 2002), als auch Zellwachstum und Proliferation (Dike et al., 1999; Lauer, Klein & Offenhäusser, 2001). All diese Studien bedienten sich unterschiedlicher Techniken der Substratconditionierung zur kontrollierten Ablagerung adhäsionsvermittelnder Moleküle in definierten Bereichen (*micropatterning*). Die einfachste Methode ist das sogenannte *micro-contact printing* (μ CP), bei der Lösungen von einer Oberfläche mit niedriger Adsorption auf (meist) harte Oberflächen mit höherer Adsorption „gestempelt“ werden (Kumar & Whitesides, 1993). Diese Technik ermöglichte unter anderem das gerichtete Wachstum von Nervenfortsätzen und die Leitung von Axonen einzelner multipolarer Neuronen (Fricke et al., 2011).

Neben der Form spielt die Substratelastizität eine bedeutende Rolle für die Zellmorphologie, Proteinexpression und Zelldifferenzierung (Pelham & Wang, 1997; Peyton & Putnam, 2005; Discher, Janmey & Wang, 2005; Engler et al., 2006). So zeigte sich beispielsweise, dass Herzmuskelzellen Substratelastizitäten bevorzugten, die denen ihres nativen Gewebes am nächsten kamen (Gupta et al., 1994; Engler et al., 2008).

Für die hier durchgeführten Versuche mussten beide Parameter für die durchgeführten Analysen berücksichtigt werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Zellform auf den zeitlichen Versatz zwischen Calcium-Signal und Substratdeformation, aber auch für die Generierung kontraktile multizellulärer μ -Gewebe bedurfte es sowohl der gezielten Ablagerung von EZM-Proteinen zur Vermittlung der Zelladhäsion in abgegrenzten Gebieten, als auch die Gewährleistung eines weichen Analysesubstrats mit Elastizitäten im Bereich des gesunden Herzwes (15 kPa). *Micropatterning* weicher Hydrogele mittels μ CP führt wie im Fall von 6 bis 8 kPa weichem Polyacrylamid zu schlechter Kantenabbildung (Rape, Guo & Wang, 2011) oder basiert häufig auf komplexer chemischer Oberflächenaktivierung (Bhatnagar et al., 2008; Aratyn-Schaus et al., 2010; Tse & Engler, 2010). Der Versuch der kontrollierten Proteinablagerung auf dem in dieser Arbeit verwendeten elastischen Silikonkautschuksystem lieferte in vorangegangenen Arbeiten keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Der inhomogene Proteintransfer war dabei vermutlich auf einen zu niedrigen Adsorptionsgradienten zurückzuführen, da sowohl Stempel als auch Analysesubstrat aus

kreuzvernetztem PDMS bestanden und somit, trotz unterschiedlicher Elastizitäten ähnliche Bindungsstärken zum zu übertragenden Fibronectin besaßen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Technik zur Oberflächenstrukturierung mittels Proteinablagerung durch mikrostrukturierte Lochfolien verwendet (Hampe et al., 2014). Diese ermöglichte die Generierung definierter Zellformen und Gewebegeometrien durch Proteinphysisorption auf weichen Analysesubstraten, ohne deren Materialeigenschaften zu beeinflussen. In beiden Anwendungen ließen sich die Zellen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens kontrollieren und bildeten über die Dauer des Analysezeitraums formstabile Geometrien bzw. μ -Gewebe, die die reproduzierbaren Adhäsionsflächen ausfüllten. Sowohl für die definierten Geometrien als auch für die verschiedenen Formen der μ -Gewebe ließen sich jedoch Abweichungen der finalen Zellflächen von den durch die Größe der Schablonen vorgegebenen Adhäsionsflächen feststellen. In beiden Fällen waren die tatsächlichen Zellflächen um etwa 20% kleiner als die Vorgaben der Schablone. Aufgrund der konstant kleineren Fläche war davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen systematischen Fehler handelte. Der Grund dafür lag in der Beschichtungsmethode. Nach Auflegen der Epoxidharz-Lochfolien auf das elastische Analysesubstrat und Zugabe der Fibronectinlösung zur Substratconditionierung blieben kleine Luftblasen in den Aussparungen der Folie zurück. Diese mussten durch kurzes Anlegen eines Unterdrucks aus den Löchern entfernt werden, sodass die Lösung mit dem darunter liegenden Substrat in Kontakt treten und es zur Proteinphysisorption kommen konnte. Wie in Hampe et al. gezeigt, führt das alleinige Auflegen der Lochfolie auf das elastische Analysesubstrat bereits zur Aufwölbung des Silikons in die Zwischenräume der Lochfolie (Abb. 4-2A). Dieser Effekt wurde nach Vakuumbehandlung für besonders weiche Substrate umso markanter.

Die verwendeten 15 kPa Substrate zeigten nach Auflegen der Lochfolien vermutlich ein intermediäres Verhalten, es ist jedoch davon auszugehen, dass sich dieser Effekt nach Anlegen des Unterdrucks zur Entfernung der Luftblasen verstärkte. Die Bereiche, die in direkten Kontakt mit den Kanten der Lochfolie traten blieben nach Druckausgleich an diesen haften und standen während des Beschichtungsprozesses für die Proteinphysisorption nicht zur Verfügung. Abb. 4-2B zeigt ein Beispiel eines ersten Versuchs der Substratbeschichtung eines Elastomersubstrats. Der Unterdruck war so stark, dass sich der Rand der Schablonengeometrie im weichen Silikon abzeichnete und dieser selbst nach Entfernung der Lochfolie erhalten blieben. Die Zellen erreichten hierbei lediglich 65% der Schablonenfläche. Die Dauer der Unterdruckbehandlung wurde daraufhin reduziert und auf den

mikrostrukturierten Analysesubstraten ließen sich keine Veränderungen des Silikonkautschuks mehr erkennen (Abb. 4-2C).

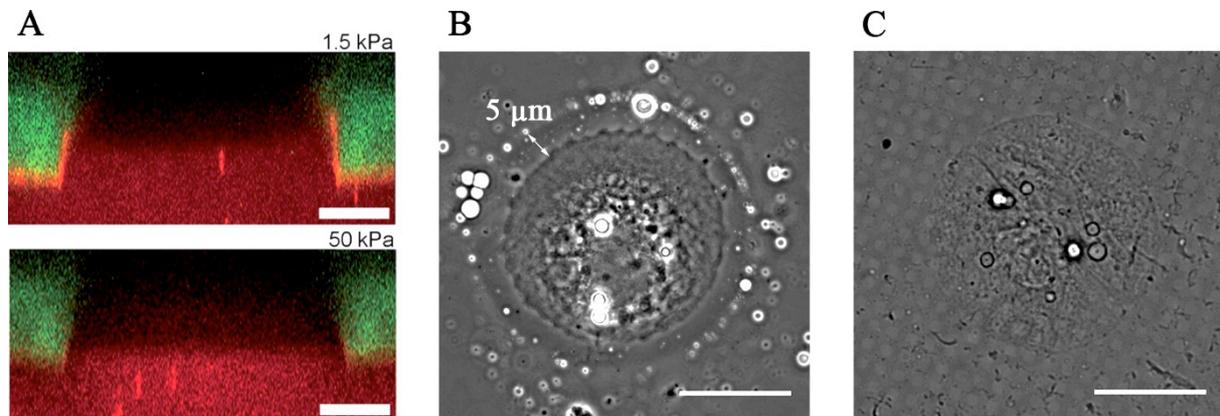


Abb. 4-2: Aufwölbung von crossvernetztem PDMS in die Zwischenräume der aufgelegten Lochfolie. (A) Die Silikonsubstrate wurden mit dem lipophilen kationischen Indocarbocyanin Farbstoff DiD (rot) gefärbt. Nach Auflegen der Epoxidharz-Lochfolien (grün durch Autofluoreszenz) wurde das Aufwölben des Silikonkautschuks auf zwei Substraten unterschiedlicher Elastizität mittels konfokaler optischer Sektionierung in z-Richtung analysiert. In beiden Fällen ließ sich eine Aufwölbung in das Lumen der Folienzwischenräume erkennen (Hampe et al., 2014). (B) Durchlichtaufnahme einer kreisförmigen Herzmuskelzelle auf einem Silikonkautschuksubstrat. Bei zu starkem Unterdruck zeichnete sich der Rand der Kreisschablone im Silikonkautschuk ab. Der 5 µm breite Steifen kam nicht mit der Proteinlösung in Kontakt, sodass die erwartete Zellfläche nicht erreicht wurde. (C) Durchlichtaufnahme einer kreisförmigen Herzmuskelzelle auf einem mikrostrukturierten Analysesubstrat und verringerter Unterdruckbehandlung. Hier ließen sich keine Abdrücke der Schablonenränder verzeichnen. Maßstäbe = 20 µm

Nach Optimierung des Beschichtungsverfahrens ließen sich kardiale Myozyten dazu bringen, unterschiedliche Zellformen anzunehmen und ihre Funktion als spontan kontrahierende Zelle ungehindert auszuüben. Die hohe Reproduzierbarkeit des Verfahrens ließ sich anhand der Überlagerungen der Zellflächen erkennen (Abb. 3-9). Darüberhinaus ging aus der Überlagerung der segmentierten Sarkomermasken hervor, dass die Ausrichtung der Myofibrillen durch die Zellgeometrie bestimmt wurde. Diese Ergebnisse ließen sich mit anderen Studien sehr gut vereinbaren (Bray, Sheehy & Parker, 2008; Parker et al., 2008). Des Weiteren spiegelte sich die Zellform deutlich in der Substratdeformation wider. Die für die Zellform charakteristischen Deformationsmuster wurden bereits in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Vergleichbare Resultate wurden ebenfalls für Zellen auf Polyacrylamid erzielt (Grosberg et al., 2011; Kuo et al., 2012). Bei genauerer Betrachtung ließ sich erkennen, dass nicht nur die Vorzugsrichtung der Zelle und die damit einhergehende Ausrichtung der Myofibrillen die

Deformationsmuster bestimmten, sondern dass die Verteilung der Sarkomere als kontraktile Untereinheiten innerhalb der Zelle ebenfalls einen maßgeblichen Einfluss auf diese besaßen.

Abb. 4-3 zeigt drei Beispiele kreisförmiger Kardiomyozyten auf Einzelzellebene. Die Signale der Z-Banden wurden wie unter 2.6.4 beschrieben segmentiert und die Hauptorientierung der Myofibrillen anhand der binärisierten Sarkomermasken manuell bestimmt.

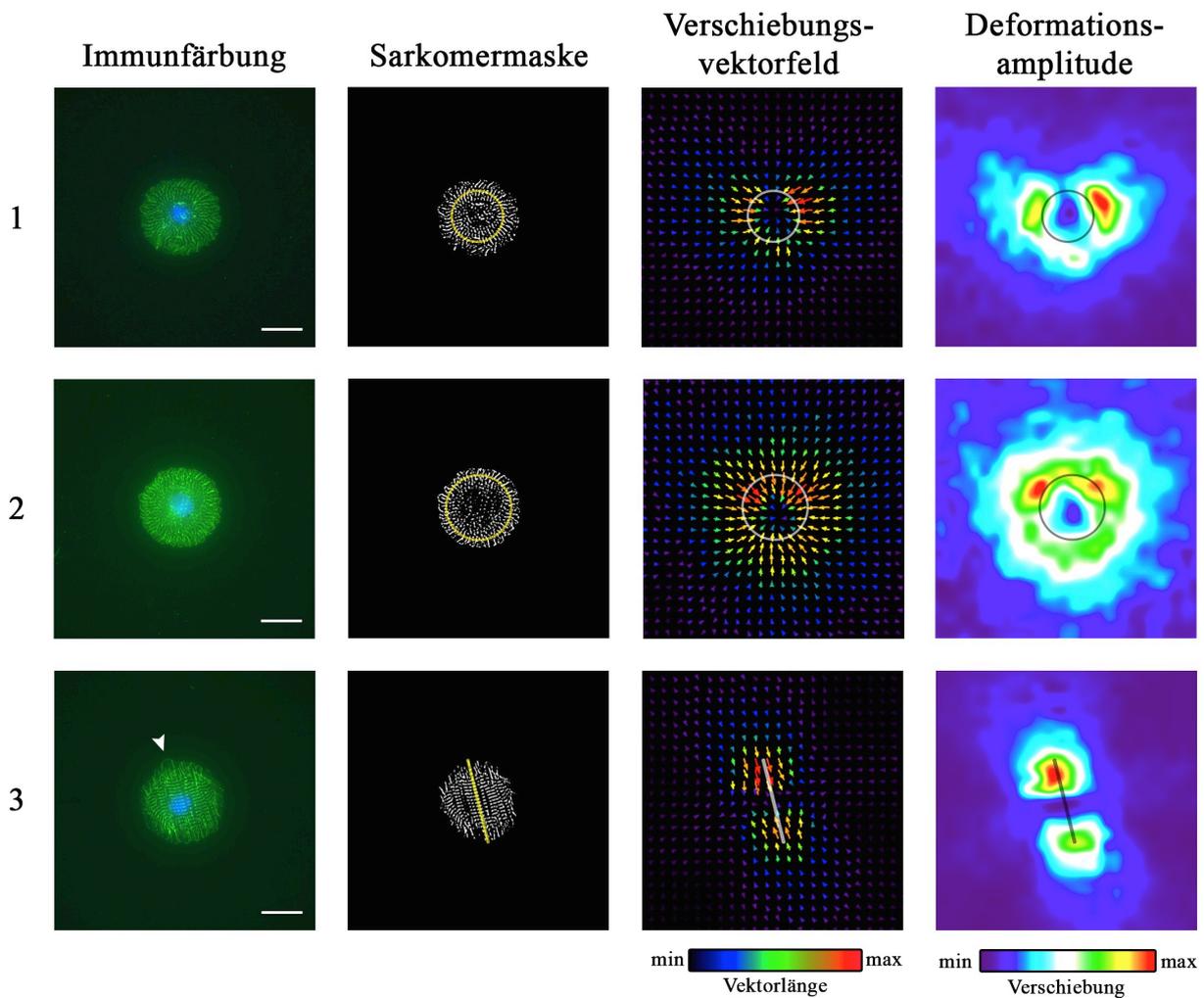


Abb. 4-3: Kreisförmige Kardiomyozyten mit unterschiedlicher Sarkomerverteilung. Die Färbung der quergestreiften Myofibrillen durch Markierung der Z-Banden (α -Actinin, grün) veranschaulicht die Ausrichtung der Myofibrillen relativ zur Zellform. Aus den Positionsunterschieden der fluoreszierenden Kugeln im relaxierten und maximal kontrahierten Zustand wurde für jede Zelle ein Verschiebungsvektorfeld (VVF) berechnet. Diese wurden entsprechend der Zellflächen zur Deckung gebracht und gemittelt. Die relative Länge der Verschiebungsvektoren wurde zur Veranschaulichung über eine Skala farbindiziert. Aus den VVFs wurde anschließend die Deformationsamplitude bestimmt. Farbige Kreise bzw. Linie verdeutlichen die Hauptorientierung der Myofibrillen auf Basis der binärisierten Sarkomermasken.

Die Myofibrillen verliefen in den ersten beiden Beispielen zwar jeweils kreisförmig, die unterschiedlichen Durchmesser der beiden Kreise verdeutlichen jedoch die unterschiedliche Position des Sarkomer-reichen kontraktile Rings. Im ersten Fall befand sich dieser näher am Zentrum des Kreises, im zweiten Fall verlief der kontraktile Ring entlang der Zellgrenze. Diese strukturellen Unterschiede zeichneten sich deutlich in den Verschiebungsvektorfeldern und den Deformationsamplituden ab.

Im dritten Beispiel verliefen die Myofibrillen trotz der kreisförmigen Zellgeometrie größtenteils parallel zueinander. Diese Ausrichtung wurde durch einen Symmetriebruch der Kreisstruktur hervorgerufen (Abb. 4-3, Bsp. 3), der wahrscheinlich durch eine Ungleichmäßigkeit während des Beschichtungsvorgangs verursacht wurde. Auch hier zeichnete sich die Orientierung der Myofibrillen im Deformationsfeld ab.

4.3. Der Zellursprung bestimmt den zeitlichen Versatz und die Zellform

Während des kardialen Aktionspotenzials tritt Calcium durch spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle in die Zelle ein. Der Einstrom von Calcium aus dem umgebenen Medium induziert die Freisetzung weiteren Calciums aus zellinternen Speichern, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Der Primäreinstrom und die Freisetzung bewirken durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration den Verlust der inhibierenden Wirkung des Troponin-Tropomyosin-Komplexes und bewirkten somit die Aktivierung des kontraktile Apparats (Bers, 2002). Dieser als Erregungs-Kontraktionskopplung bezeichnete Prozess findet während der initialen Phase des Aktionspotenziales statt. Die effiziente Kopplung zwischen Calciumsignal und Kontraktion der Myofilamente hängt zum großen Teil von der Lage der L-Typ Calciumkanäle zum junktionalen sarkoplasmatischen Retikulum ab (siehe 1.1.4.3), die bei ausreichender Nähe zueinander eine funktionelle Einheit, Couplon genannt, bilden (Franzini-Armstrong et al., 1999). Durch den Einstrom des Calciums durch die L-Typ Kanäle werden die in den Couplons lokalisierten Ryanodin-Rezeptoren des SRs aktiviert und es kommt zur Ausbildung lokaler, funkenartiger Calciumereignisse („*calcium sparks*“). In ausreichender Anzahl können diese durch Synchronisation zu einem globalen Calciumereignis führen (Cheng, Lederer & Cannell, 1993) und somit die Zellkontraktion aktivieren. Couplons befinden sich in differenzierten ventrikulären Herzmuskelzellen vermehrt in den T-Tubensystemen, wodurch dessen Verteilung ein bedeutender Einfluss auf die Ausbreitung intrazellulärer Calciumsignale zuzuschreiben ist (Song et al., 2005). Diese

sind in dem pränatalen Entwicklungsstadium der in dieser Arbeit analysierten Zellen erfahrungsgemäß im Vergleich zum SR jedoch noch nicht so stark ausgeprägt.

Die Erregungs-Kontraktionskopplung in differenzierten Kardiomyozyten wurde auf Basis des zeitlichen Versatzes zwischen Calciumsignal und Zellkontraktion (Δt) näher untersucht. Die Ergebnisse wurden in der Reihenfolge präsentiert, in der die Versuche durchgeführt wurden. Zunächst wurde in 3.2.1 der in Vorexperimenten beobachtete Zusammenhang zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt verifiziert und durch visuelle Auswertung der α -Actinin-Verteilung ein Zusammenhang zwischen dem Kontraktionsverhalten und der Zellgeometrie und der damit einhergehenden Orientierung des Zytoskeletts der untersuchten Einzelzellen postuliert. Letzteres wurde in 3.2.2 mittels einer Software-gestützten Strukturanalyse quantifiziert und der Zusammenhang zwischen ermittelten Strukturparametern und dem zeitlichen Versatz bestätigt. Zur Überprüfung des Sachverhaltes, ob sich das Signalverhalten einzelner Zellen durch Vorgabe ihrer Form kontrollieren ließe, wurde diese mittels der beschriebenen definierten Substratkonditionierung in unterschiedliche Geometrien gebracht (siehe 3.3.1). Diese wurden von den Zellen wahrgenommen und nach erfolgtem Spreitvorgang reproduzierbar ausgefüllt. Damit ging eine für die unterschiedlichen Zellformen charakteristische Anordnung der Myofibrillen und Zellform-typische Substratdeformationsmuster einher (siehe 3.3.2). Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen in denen für neonatale Kardiomyozyten ein Zellform-abhängiges Calciumsignal- und Kontraktionsverhalten beobachtet werden konnte (Adams et al., 2007; Geisse, Sheehy & Parker, 2009; Kuo et al., 2012).

Hinsichtlich der Korrelation zwischen Frequenz und Δt ließ sich jedoch kein Einfluss der Zellformen auf das Signalverhalten erkennen, sodass die Zellen weiterhin das identische Verhalten aufwiesen wie Zellen die in ihrer Adhäsion frei waren (siehe 3.4.1). Dies bedeutet, dass sich auch für geometrisch begrenzte Zellen eine Population mit überdurchschnittlich hoher Kontraktionsfrequenz und dafür niedrigem Δt und eine weitere Population mit niedriger Kontraktionsrate und überdurchschnittlich hohem Δt ergaben. Wie eingangs gezeigt (Abb. 1-8) ist die Dauer der erhöhten Calcium-Membranpermeabilität in ventrikulären Zellen nahezu doppelt so lang, wie der in Schrittmacher- und Vorhofzellen. Sie bedingt das Plateau in der zweiten Phase des Aktionspotenzials und ist damit der markanteste Unterschied zwischen dem atrialen und ventrikulären Aktionspotenzial (Giles & Imaizumi, 1988). Veranlasst durch die Ergebnisse zur Form und Dauer der detektierten Calciumsignale (siehe 3.2.3), wurden diese im Detail für alle analysierten Zellen gesichtet. Hierbei ließen sich vor allem die in Abb. 4-4 gezeigten Signalformen beobachten. Der zeitliche Verlauf des Calciumsignals

beeinflusst maßgeblich den zeitlichen Verlauf des Aktionspotenzials einer Herzmuskelzelle (Bers, 2002; Santana, Cheng & Lederer, 2010). Insbesondere das Intensitätsprofil 4 in Abb. 4-4 erinnerte in seiner Form stark an ein ventrikuläres Aktionspotenzial (Schram et al., 2002). Während sich zu 1 und 3 ähnliche Signalformen nicht direkt zuordnen ließen, vermittelten Signalverläufe mit Formen wie in Beispiel 2 gezeigt den Eindruck eines Schrittmacherpotenzials (He et al., 2003; Kolossov et al., 2005; Zhang et al., 2011a).

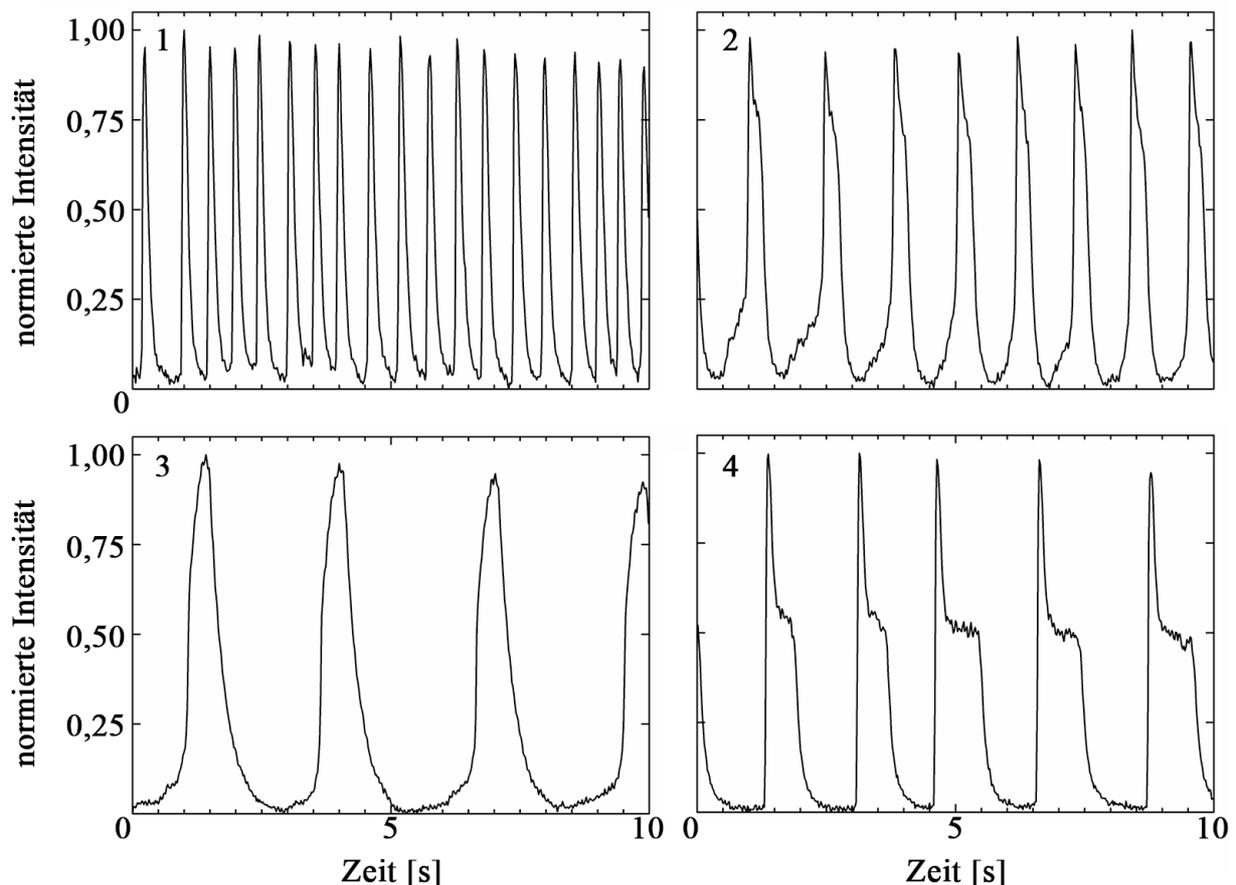


Abb. 4-4: Signalverläufe der normierten Fluoreszenzintensität der Calcium-Indikatoren Fluo4-AM in vier Beispielmessungen der unter 3.2 beschriebenen Einzelzellmessungen.

Zur genauen Charakterisierung wurden die Ventrikel und Vorhöfe der embryonalen Herzen nach erfolgter Isolation mechanisch voneinander getrennt und deren Zellen enzymatisch vereinzelt und separat analysiert. Durch die gewebspezifische Trennung konnten die atrialen Zellen als Zellpopulation mit niedrigem Δt und hohen Kontraktionsfrequenzen und ventrikuläre Zellen mit erhöhten Δt und zusätzlich niedriger Kontraktionsfrequenz identifiziert werden (siehe 3.5.1). Im Anschluss an die simultane Zweikanalmessung zur Bestimmung des Δt wurden die atrialen und ventrikulären Zellen analog zu den Zellen der Mischkultur fixiert, immunhistochemisch gegen α -Actinin markiert und die Aufnahmen

mittels der Strukturanalyse untersucht. Abb. 4-5 zeigt den Zusammenhang zwischen Aspektverhältnis und Δt für die Messungen der Mischkultur aus Kapitel 3.2.1 und für die atrialen und ventrikulären Zellen aus Kapitel 3.5.1.

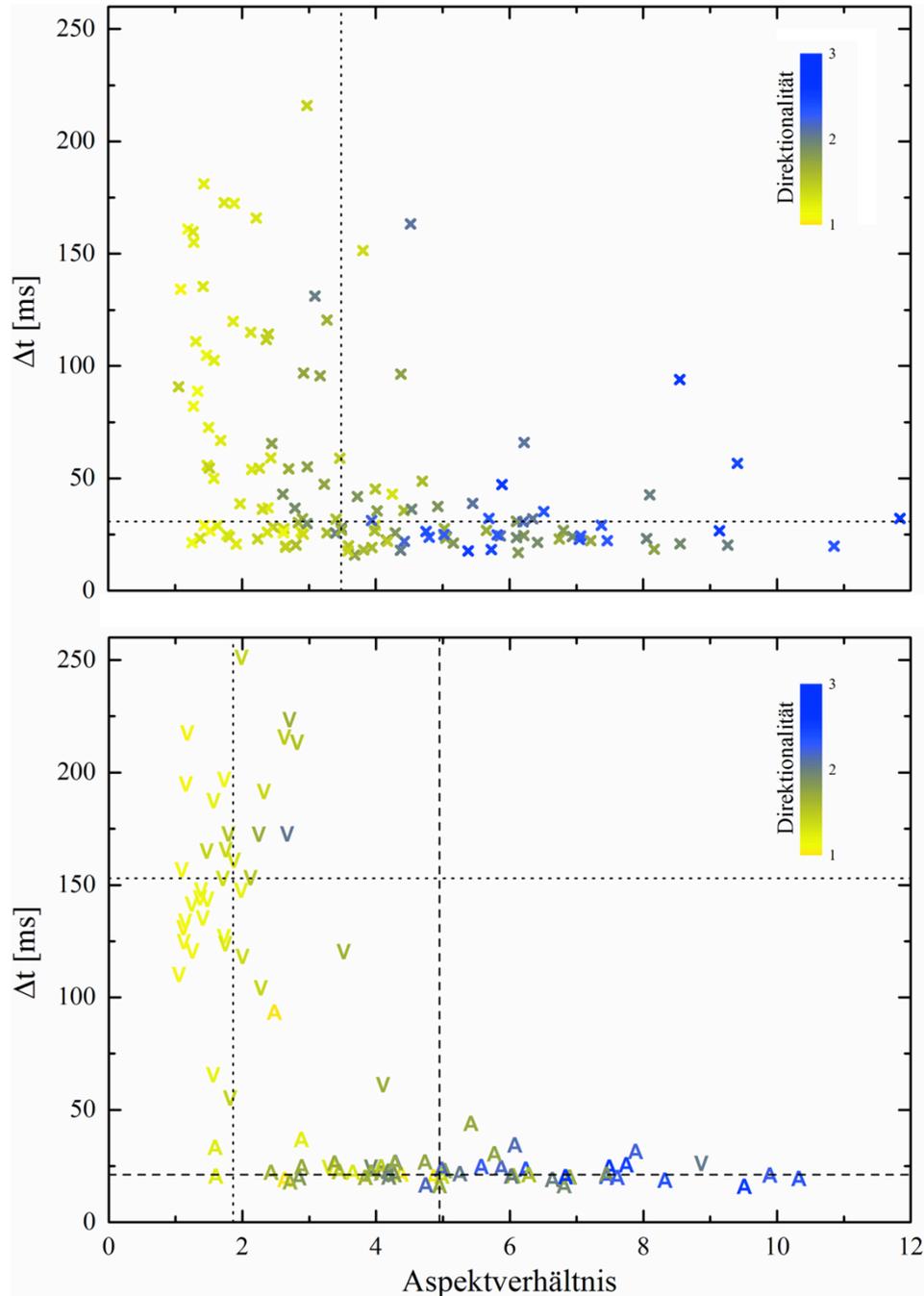


Abb. 4-5: Zusammenhang zwischen Aspektverhältnis und zeitlichem Versatz Δt . Jedes „x“ entspricht einer gemessenen Zelle der Mischkultur aus 3.2.1, „A“ und „V“ stehen für die Einzelmessungen atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten aus 3.5.1. Die Farbe eines Symbols gibt Auskunft über die Direktionalität der Zelle. Die gestrichelten Linien stellen den Medianwert des Analyseparameters dar (unten für die atrialen Zellen, die gepunktete Linie für die ventrikulären Zellen).

Zusätzlich wurde das Maß der Direktionalität mittels Farbskala für jede gemessene Zelle angezeigt. Aus den Daten geht deutlich hervor, dass sich die strukturellen Parameter der beiden Zelltypen in beiden Verteilungen widerspiegeln und eindeutig charakteristische Eigenschaften der individuellen Zellpopulation darstellten. Das heißt, dass sich atriale Zellen zum einen durch ihren niedrigen Δt auszeichneten, zum anderen aber auch durch ihr hohes Aspektverhältnis und der damit einhergehenden Parallelisierung ihrer Myofibrillen. Ventrikuläre Zellen besaßen dagegen einen hohen Δt und ein niedriges Aspektverhältnis. Gleichzeitig richteten sich die Myofibrillen in diesen Zellen weniger zueinander aus. Für Maus und Hase wurde die Morphologie isolierter atrialer Zellen unter anderem als länglich und spindelartig (Verheijck et al., 1998; Mangoni & Nargeot, 2001) charakterisiert, wohingegen neonatale ventrikuläre Zellen in der Literatur als pleomorph („mehrgestaltig“) beschrieben sind (Bray et al., 2008; Parker et al., 2008; Geisse et al., 2009).

Überträgt man diese Befunde auf die Ergebnisse aus Kapitel 3.4.1, dann bedeutet dies, dass der Zellsprung das Signalverhalten in geometrisch kontrollierten Zellen dominiert. Obwohl es sich bei den in diesem Abschnitt durchgeführten Versuchen um eine Mischkultur handelte, lässt sich auf Basis der Daten der gewebespezifischen Messungen (siehe 3.5.1) darauf schließen, dass es sich bei der Population mit niedrigem Δt um atriale Zellen und bei der Population mit hohem Δt um ventrikuläre Zellen handeln musste. Trotz der aufgezwungenen Zellform und damit Ausrichtung der Myofibrillen behielten diese Zellen jedoch das für sie typische Signalverhalten bei.

In wenigen Fällen ließen sich für atriale und ventrikuläre Zellen Ausreißer hinsichtlich ihres Signalverhaltens erkennen. Diese sind vermutlich der Präparationsmethode geschuldet, bei der während der mechanischen Trennung der Herzen Reste des jeweils anderen Gewebes zurückblieben und in die Proben ungewollt überführt wurden. Insbesondere die Frequenzvariabilität bei atrialen Zellen lässt des Weiteren den Schluss zu, dass in dieser Zellfraktion weitere Subpopulationen vorhanden sind (Verheijck et al., 1998), die sich aber aufgrund fehlender Markierungs- und Isolationsmethoden nicht voneinander trennen ließen.

Die Zellen der unterschiedlichen Regionen des Herzens unterscheiden sich wie hier gezeigt in ihrer Funktionalität und Morphologie. Es liegt nahe, dass der Unterschied der elektrophysiologischen und kontraktilen Eigenschaften atrialer und ventrikulärer Zellen auf molekularer Ebene zu suchen ist. Umso überraschender ist es, dass bisher jedoch nur wenige Gene identifiziert wurden, die diesem Unterschied zu Grunde zu liegen scheinen (Ng, Wong & Tsang, 2010).

Bei Betrachtung ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften fällt bereits auf, dass sich die Membranpotenziale der beiden Zellen unterscheiden. Das Ruhepotenzial atrialer Zellen liegt mit -70 mV geringfügig höher als das der Zellen des Arbeitsmyokards der Ventrikel mit -85 bis -90 mV (Schram et al., 2002). Amplitude und Dauer des atrialen Aktionspotenzials sind beide niedriger als bei ventrikulären Zellen (Giles & Imaizumi, 1988). Die Dauer des Aktionspotenzials wird zu einem großen Teil durch die Länge des Plateaus in Phase 2 bestimmt. Das empfindliche Gleichgewicht zwischen dem einwärts strömenden Calcium durch die L-Typ Kanäle ($I_{Ca,L}$) und dem auswärts gerichteten kompensatorischen Kaliumstrom (I_K) durch spannungsgesteuerte Kaliumkanäle ist maßgeblich für diesen Prozess (Widmaier et al., 2007; Katz, 2011; Marieb & Hoehn, 2013). In atrialen Zellen konnte eine Variante eines Kaliumkanals ($K_v1.5$) mit „ultraschneller“ (engl.: *ultrarapid*) Aktivierung des Auswärtsstroms (I_{Kur}) nachgewiesen werden (Feng et al., 1997). Während diese schnelle Variante in ventrikulären Zellen zu fehlen scheint (Li et al., 1996; Yue et al., 2000), existieren Versionen langsamer Aktivierung (I_{Ks} , I_{Kr}) in beiden Zelltypen (Giles & Imaizumi, 1988; Yue et al., 1996). Somit liegt der Grund für die kürzere Dauer der Phase 2 eines Aktionspotenzials möglicherweise in der gewebsspezifischen Expression und den Aktivierungskinetiken der unterschiedlichen Kaliumkanäle.

Auf der Ebene der kontraktilen Proteine lässt sich vor allem kardiales Myosin als möglicher Schlüsselspieler diskutieren. In Säugetieren liegen die schweren Ketten des Myosins in zwei Isoformen vor. Die schnelle α -MHC besitzt eine hohe ATPase-Aktivität und ist vor allem in den Vorhöfen lokalisiert während die langsame β -MHC vor allem in den Ventrikeln zu finden ist (Pope et al., 1980; Reiser et al., 2001). In *in vitro* Assays konnte gezeigt werden, dass die maximale Verkürzungsgeschwindigkeit der Myofilamente proportional zur ATPase-Aktivität ist und somit für die α -MHC bildenden Vorhofzellen höher ist als für die β -MHC enthaltenden Ventrikelzellen (Krenz et al., 2007). Dies liefert eine vorläufige Erklärung für die unterschiedlichen Kontraktions- und Relaxationskinetiken in atrialen und ventrikulären Myozyten (Piroddi et al., 2007). Die leichten Ketten bestehen aus einer essenziellen und einer regulatorischen Untereinheit. Die atriale Isoform der essenziellen Untereinheit ALC-1 besitzt im Vergleich zu ihrem ventrikulären Pendant VLC-1 eine schnellere Kinetik der Querbrückenbildung zu Aktin (Morano et al., 1996). Dies stellt eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der höheren Verkürzungsgeschwindigkeit atrialer Kardiomyozyten dar.

4.4. cAMP-Signalweg als möglicher Regulationsmechanismus für Δt

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Korrelation zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt durch den Zellursprung bestimmt wurde. Es blieb jedoch weiterhin zu klären, wodurch dieser Unterschied verursacht wurde und ob es sich ein bestimmtes Signalverhalten durch einen Eingriff in die Calciumhomöostase hervorrufen ließ. Des Weiteren galt zu klären, ob sich die beiden Kenngrößen (Frequenz und Δt) gegenseitig bedingten oder ob sich eine losgelöst von der anderen modulieren ließe. An dieser Stelle wurde bewusst auf eine elektrische Stimulation, wie das Anlegen externer Schrittmacherströme über Funktionsgeneratoren verzichtet, da diese der zu untersuchenden Zelle ggf. nicht die Möglichkeit geboten hätten, physiologisch auf diesen externen Reiz zu reagieren.

Stattdessen wurden die Zellen durch die Behandlung mit den beiden antagonistisch wirkenden Neurotransmittern Epinephrin und Acetylcholin stimuliert. Durch die Aktivierung spezifischer Rezeptoren beeinflussen beide die Aktivität der Adenylylcyclase und somit die intrazelluläre Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP (Bers, 2002). Vinogradova und Kollegen konnten nachweisen, dass atriale Zellen einen um ca. 66% höheren basalen cAMP Spiegel im Vergleich zu ventrikulären Zellen besitzen (Vinogradova et al., 2006). Die Stimulation β -adrenerger Rezeptoren durch Zugabe von Epinephrin aktiviert dabei die α -Untereinheit eines stimulatorischen GTP-bindenden Proteins (G_{α_s}), welches wiederum die membranständige Adenylylcyclase zur Umsetzung von ATP in das cyclische Adenosinmonophosphat anregt. Dieses aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche die Phosphorylierung bestimmter, an der Erregungs-Kontraktionskopplung beteiligter Proteine katalysiert (Abb. 4-6). Die Phosphorylierung von Phospholamban und Troponin I bedingt eine beschleunigte Relaxation der Myofilamente. Phospholamban ist ein endogener Inhibitor der SERCA. Seine Phosphorylierung durch die cAMP abhängige PKA löst diese Blockade und bedingt eine erhöhte Wiederaufnahmerate des zytosolischen Calciums in das sarkoplasmatische Retikulum (Li et al., 2000). Im Fall von TnI führt sie durch Senkung der Bindeaffinität für Calcium zur verstärkten Dissoziation des Kations von den Myofilamenten (Kentish et al., 2001).

Bereits die 10-minütige Behandlung der ventrikulären Zellen mit einer 1 μM Epinephrinlösung bewirkte eine signifikante Reduktion des Δt und eine damit einhergehende Steigerung der Kontraktionsfrequenz. Dieser Effekt wurde durch Erhöhung der Konzentration des Catecholamins geringfügig, wenn auch nicht signifikant, verstärkt (siehe 3.5.3).

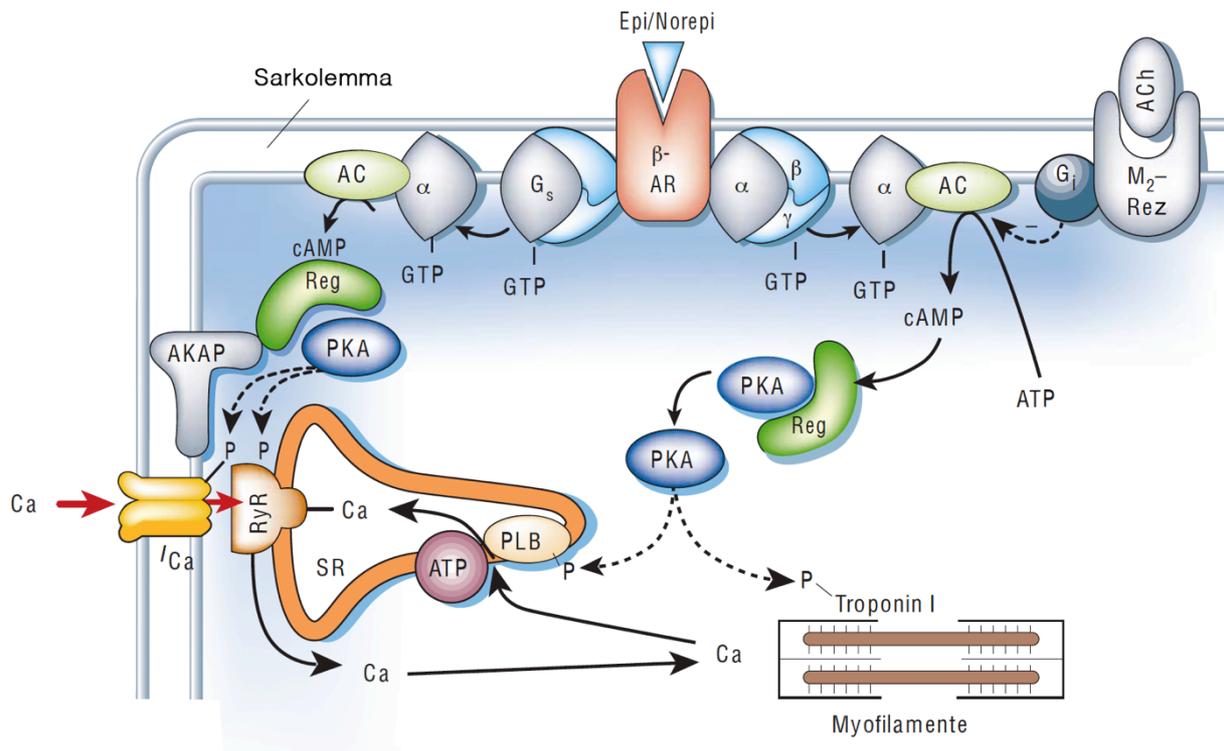


Abb. 4-6: cAMP vermittelte Phosphorylierung ausgewählter, an der Erregungs-Kontraktionskopplung beteiligter Proteine durch Aktivierung adrenerger und muskarinergere Rezeptoren; AC: Adenylylcyclase, ACh: Acetylcholin, β -AR: β -adrenerger Rezeptor, Epi/Norepi: Epinephrin/Norepinephrin, M_2 -Rez: M_2 -muskarinergere Rezeptor, PKA: Proteinkinase A, PLB: Phospholamban, SR: sarkoplasmatisches Retikulum (verändert nach Bers, 2002).

Acetylcholin dagegen aktiviert die α -Untereinheit eines inhibitorischen G-Proteins (G_{α_i}), die durch Hemmung der Adenylylcyclase den Umsatz von ATP zu cAMP senkt und somit die resultierende Signalkaskade abschwächt. Nach 10-minütiger Inkubation mit einer 1 μ M Acetylcholinlösung ließ sich für atriale Zellen keine signifikante Erhöhung des Δt feststellen und auch nach Erhöhung der Konzentration blieb der Wert für diese Zellen nahezu unverändert. Des Weiteren ließ sich keine Änderung der Kontraktionsfrequenz feststellen und auch die Behandlung mit Epinephrin zeigte auf diese Zellen keinen messbaren Effekt. An dieser Stelle blieb unklar, ob die Zellen tatsächlich keine Reaktion auf die Behandlung zeigten oder diese nicht messbar war. Verkerk und Kollegen wiesen für die Behandlung von atrialen Myozyten mit vergleichbaren Acetylcholinkonzentrationen sogar eine Verkürzung der Dauer des Aktionspotenzials nach (Verkerk et al., 2012). Es gilt jedoch zu beachten, dass es sich bei diesen Messungen um durch elektrische Stimulation künstlich zur Kontraktion angeregte Zellen handelte. Eine Verkürzung der Calciumsignaldauer ließ sich für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Vorhofzellen jedoch nicht verzeichnen. In anderen Arbeiten wird Acetylcholin jedoch durchaus ein Effekt auf die Kontraktionsfrequenz der Vorhofzellen

zugesprochen, allerdings in deutlich verringerten Konzentrationsbereichen zwischen 1-10 nM (Mangoni & Nargeot, 2008). Unter diesen Bedingungen verlangsamt es den Anstieg des Membranpotenzials während der diastolischen Depolarisation und führt somit zur Verlangsamung der Ausbildung von Aktionspotenzialen.

Ein Einfluss der Inkubationszeit konnte an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Für ventrikuläre Zellen ließ sich sowohl für die Stimulation adrenerger, als auch muskarinischer Rezeptoren bereits nach ca. 2 min eine deutliche Zellantwort hinsichtlich der Änderung in der intrazellulären cAMP Konzentration messen (Iancu et al., 2008), für atriale Zellen wurden *steady-state* Bedingungen nach 5 min erreicht (Verkerk et al., 2012). Die Ergebnisse liefern somit, zumindest in ventrikulären Zellen einen Erklärungsansatz für deren Signalverhalten.

Für eine abschließende Klärung des Mechanismus sind jedoch eine Reihe weiterer Analysen notwendig, die sich in Anbetracht der Mannigfaltigkeit regulatorischer Prozesse während der Kontraktion kardialer Zellen schwierig gestalten. Alleine der Werkzeugsatz, dem sich Zellen zur Calciumsignalgebung bedienen umfasst mit verschiedenen Rezeptoren, signalvermittelnden Proteinen und Molekülen, Ionenkanälen, Calcium puffernden Substanzen, Enzymen, Pumpen und Austauschern (Berridge, Bootman & Roderick, 2003) eine unerschöpfliche Bandbreite von Effektoren, die allesamt als Grundlage eines ganzen Forschungszweiges dienen können.

4.5. Synchronisation mehrzelliger Systeme führt zu höheren Kontraktionskräften

Im Körper liegen Herzmuskelzellen in Form eines Synzytiums vor in dem die elektrochemische Kopplung einzelner Kardiomyozyten die kontinuierliche Erregungsweiterleitung im Herzen und die simultane Kontraktion des Herzmuskels zur Beförderung des Bluts durch die Gefäße des Körpers ermöglicht. Dabei unterscheiden sich die Gewebe aus verschiedenen Regionen des Herzens aufgrund ihrer Zusammensetzung neben ihren electrophysiologischen auch in ihren mechanischen Eigenschaften. In dieser Arbeit konnte auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass die Kontraktionskraft atrialer Myozyten unterhalb der ventrikulärer Zellen lag (siehe 3.5.4). Dieses Ergebnis macht insofern Sinn, als dass atriale Zellen nicht die gleiche mechanische Arbeit verrichten müssen wie Zellen des Myokards. Unter normalen Bedingungen tragen die Vorhöfe mit gerade einmal 10% zur Füllung der Hauptkammern bei. Bei dieser handelt es sich vielmehr um einen passiven Prozess und der Großteil der Ventrikelfüllung erfolgt über den venösen Rückstrom (Klabunde, 2011). Nichtsdestotrotz besitzen atriale Zellen die Fähigkeit zur erhöhten Kraftgenerierung, da sie im Fall der körperlichen Beanspruchung in der Lage sein müssen, die verkürzte diastolische Füllung der Ventrikel durch Kontraktion der Vorhöfe zu kompensieren. Durch diesen „atrialen Kick“ tragen sie kurzzeitig mit 40% zur Ventrikelfüllung bei (Klabunde, 2011).

Obwohl die kontraktile Kräfte in atrialen und ventrikulären Myozyten auf Einzelzellebene nur geringfügig verschieden waren, zeigten sich jedoch auf Basis der Ergebnisse der multizellulären Systeme erhebliche Unterschiede. In allen Fällen der generierten μ -Gewebe konnte durch die Markierung von β -Catenin die Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3-22). Obwohl hier der Nachweis *Gap Junctions*-bildender Proteine nicht direkt erbracht wurde, ist aufgrund der elektrochemischen Kopplung der Zellen in den Verbänden (siehe 3.6.2) davon auszugehen, dass diese, wie in anderen Arbeiten bereits dokumentiert (McCain et al., 2012a; Desplantez et al., 2012; Beauchamp et al., 2012) ebenfalls Cx43 in den Kontaktzonen enthielten.

Die Fähigkeit zur koordinierten Krafterzeugung kardialer Myozyten in Zellverbänden ist Gegenstand intensiver Forschung, zu dem eine Reihe unterschiedlicher Modellsysteme zur Bestimmung der Kontraktionskraft existieren. Ein Ansatz ist die Analyse der durch die synchrone Zellkontraktion hervorgerufenen vertikalen Auslenkung dünner Muskelzell-„Biofilme“ (Feinberg et al., 2007; Alford et al., 2010; Shim et al., 2012). Dabei wachsen die Zellen zunächst planar auf einem dünnen Streifen eines elastischen Materials, der sich unter Ausübung der Zellkontraktion in die dritte räumliche Dimension verbiegt. Ein weiterer

Ansatz misst die Kontraktilität kardialer Myozyten, die in Hydrogelen eingebettet wurden. Diese bestehen zu großen Teilen aus EZM-Proteinlösungen, die durch chemische Kreuzvernetzung stabilisiert werden, um den eingebetteten Zellen eine Adhäsionsmatrix zu bieten. Diese rigiden Hydrogele werden zwischen elastischen Säulen aufgespannt, welche durch spontane oder induzierte Kontraktion verbogen werden (Boudou et al., 2012; van Spreeuwel et al., 2014). Diese Systeme erlauben die Bestimmung kontraktiler Kräfte auf makroskopischer Ebene, jedoch lässt sich aus ihnen nichts über den Beitrag einzelner Zellen an der Gesamtkontraktion des künstlichen Gewebes aussagen.

Im Zuge der Generierung definierter Zellformen ließ sich in wenigen Fällen die Adhäsion von zwei Kardiomyozyten auf einer Adhäsionsfläche beobachten, welche von den Zellen in gleicher Weise zu den Einzelzellen nahezu vollständig ausgefüllt wurden. Die Zell-Zellkontakte verliefen in allen Fällen diagonal (Abb. 4-7). Aus den Substratdeformationsanalysen ging für diese Zellpaare ein zu den Einzelzellen vergleichbares Verschiebungsmuster hervor, bei dem sich die Regionen der stärksten Verschiebung an den Enden der länglich orientierten Strukturen befanden.

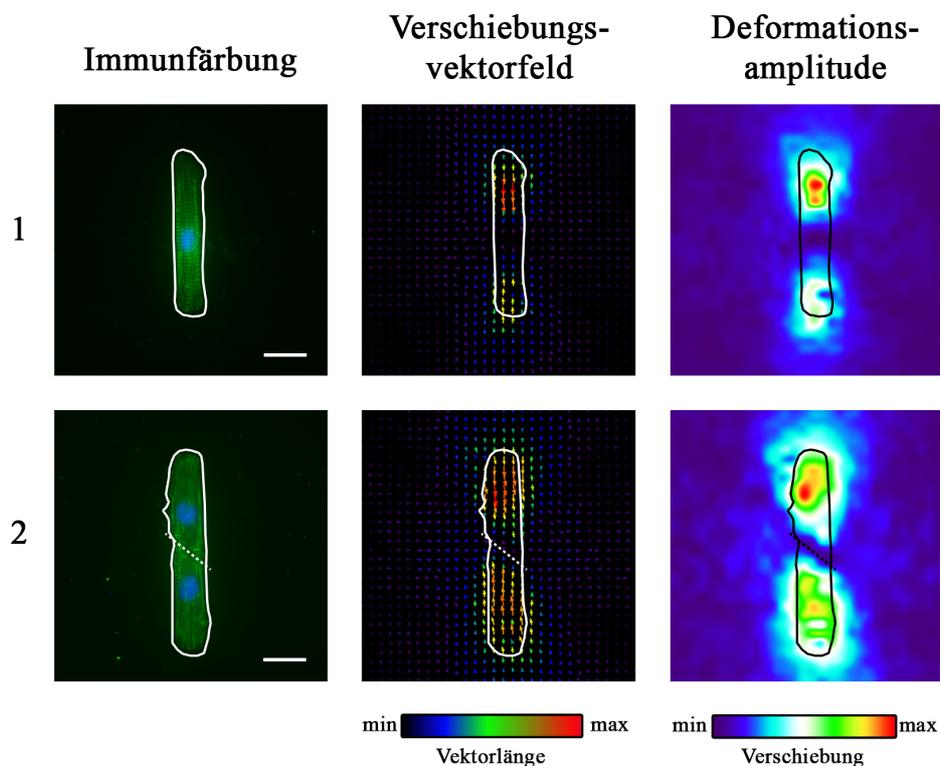


Abb. 4-7: Vergleich der Verschiebungsvektorfelder und Deformationsamplituden einer Einzelzelle und eines zweizelligen Zellverbandes kardialer Myozyten. Die durchgehenden weißen bzw. schwarzen Linien umranden die Zellflächen auf Basis des α -Actinin-Signals (grün) und verdeutlichen deren Position in den Bildern der Substratdeformationsanalyse. Die gestrichelte weiße bzw. schwarze Linie markiert den Bereich des Zell-Zell-Kontakts im Zellverband. Maßstäbe = 20 μ m

Analog zu den Einzelzellen ließ sich im Zentrum der Struktur keine Verschiebung nachweisen. Während dies bei den Einzelzellen in der Regel der Position des Zellkernes entsprach, handelte es sich bei den Doppelzellen um die Region des Zell-Zell-Kontakts. Dies ließ sich sehr gut mit den Befunden von McCain und Kollegen vereinbaren. Sie konnten zeigen, dass es in zweizelligen Systemen zu einem Maturierungsprozess kommt, der die kooperative Kopplung der Einzelzellen beeinflusst. Während die Einzelzellen im frühen Stadium in den Bereichen der späteren Zell-Zell-Kontakte noch Fokaladhäsionen besaßen und somit ihre kontraktile Kräfte noch verstärkt in das Substrat einleiteten, wurden diese im Verlauf von vier Tagen zurückgebildet und durch stabile Zell-Zell-Kontakte ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt waren auch in diesen Doppelzell-Systemen keine Verschiebungen im Bereich der Zell-Zell-Kontakte mehr sichtbar, da sich diese jetzt in den Glanzstreifen der Zellgrenzen gegenseitig kompensierten (McCain et al., 2012b). Die Tatsache, dass sich die Zellkräfte aufheben basiert auf dem Dipolcharakter der Verschiebungsfelder. Eine Kompensation ist die Voraussetzung für den Verbleib einer Zelle oder eines Verbandes an ihrem Standort. Würden sich die Zellkräfte nicht kompensieren, so käme es zu einer Bewegung in Richtung der stärkeren Kraft.

Der Vergleich der Zellkräfte ungefähr gleichgroßer Einzelzell- und Doppelzellsysteme wies auf ein additives kontraktiles Zellverhalten hin. Die Einzelzellen besaßen im Mittel eine Kontraktionskraft von 80 nN ($\sigma = 46$ nN, $n = 28$) während die Doppelzellen eine Kraft von 120 nN ($\sigma = 74$ nN, $n = 6$). Dieses spiegelte sich ebenso in den mehrzelligen μ -Geweben wider (siehe 3.6.5). So zeigten Zellverbände gleicher Größe mit zunehmender Zellzahl höhere Kontraktionskräfte. Die Form des μ -Gewebes und die damit einhergehende Ausrichtung der Zellen spielte hierbei, wie für in Hydrogelen eingebettete Zellen, eine untergeordnete Rolle (van Spreeuwel et al., 2014). Zusätzlich wurde der Einfluss des Calcium-Indikators auf die Zellkraft ermittelt. Mit einem K_d -Wert von 345 nM besitzt Fluo4 im Vergleich zu anderen Calcium-Indikatoren zwar eine relative niedrige Affinität zu Calcium (Gee et al., 2000), jedoch war nicht auszuschließen, dass er zu einem Puffereffekt innerhalb der Zellen führte und somit die Kontraktion beeinträchtigte. Daher wurden für 10 Zellen die Kontraktionskräfte vor und nach Zugabe des Farbstoffs bestimmt. Für diese ließ sich eine Reduktion der kontraktile Kräfte auf $85 \pm 20\%$ feststellen. Daher ist davon auszugehen, dass die ermittelten Zellkräfte in allen Messungen ohne Zugabe des Indikators höher lägen.

Trotz fehlender Marker zur zellspezifischen Unterscheidung zwischen atrialen und ventrikulären Zellen ließen die erhöhte Kontraktionsfrequenz und der geringere zeitliche Versatz der aus der Mischpopulation bestehender μ -Gewebe auf die Existenz atrialer Zellen

und deren Einfluss (vgl. Abb. 3-25) auf das Kontraktionsverhalten dieser Zellverbände schließen. Es ist davon auszugehen, dass die Erhöhung der Kontraktionsfrequenz durch die Anwesenheit der atrialen Zellen begründet werden kann. Für die ventrikulären Zellverbände lagen die Kontraktionsfrequenz mit einem Median von 0,39 Hz näher an dem Wert für ventrikuläre Einzelzellen als die Misch-Gewebe (0,73 Hz). Obwohl die atrialen Zellen die Frequenz im Vergleich zu den ventrikulären μ -Geweben anheben konnten, waren sie jedoch nicht in der Lage dem gesamten Verband eine schnelle Kontraktionsfolge einzuprägen. Vielmehr zeigten die Misch-Gewebe hinsichtlich ihrer Frequenz ein intermediäres Verhalten zwischen atrialen und ventrikulären Zellen. Ein ähnliches Verhalten konnte für Schrittmacherzellen im rechten Vorhof des adulten Herzens in Hasen festgestellt werden. Für diese Zellen wurde gezeigt, dass ihre Autorhythmie durch Nicht-Schrittmacherzellen im rechten Vorhof zum Teil elektrotonisch unterdrückt wird. Nach Isolation der Schrittmacherzellen aus ihrem Gewebe konnte eine Erhöhung der Schrittmacherfrequenz nachgewiesen (Kodama & Boyett, 1985; Kirchhof et al., 1987) und durch nachträgliche Kopplung mit einzelnen atrialen Zellen eine Reduktion der Impulsrate bewirkt werden (Joyner et al., 1998).

Auch wenn der Anteil atrialer Zellen in den aus Mischpopulationen bestehenden μ -Geweben nicht bekannt war, ließ sich für diese unabhängig von der Gewebegeometrie ein niedrigerer Δt und vor allem eine deutlich geringere Kontraktionskraft feststellen. Dieser Unterschied in der Kontraktionskraft war ausgehend von den Daten der Einzelzellanalysen zu erwarten, jedoch war der Effekt im Verband noch wesentlich stärker.

4.6. Identifikation atrialer und ventrikulärer Zellen auf Basis des Δt

Wie unter 3.5.1 und 4.5 besprochen zeigte sich für atriale und ventrikuläre Zellen eine für den jeweiligen Zelltypen charakteristische Korrelation zwischen Kontraktionsfrequenz und Δt . Auf Basis dieser Daten konnten zwei Populationen einer zuvor unbekanntes Mischpopulation als atriale und ventrikuläre Zellen identifiziert werden. Diese Befunde wurden zusätzlich durch Zellform und Myofibrillenorientierung beschreibende Strukturparameter gestützt. Somit stellte das in dieser Arbeit verwendete Lebendzell-Messverfahren aufgrund seiner hohen Reproduzierbarkeit eine verlässliche Alternative zur immunhistologischen Detektion gewebespezifischer Proteine für die Identifikation der beiden Zelltypen dar. Diese sind oft mit aufwendigen Färbeprotokollen verbunden und zeigen häufig unspezifische Markierungen.

Um die Methodik auf weitere Herzmuskelzellen zu erweitern, wurde mit Hilfe dieser Technik humane iPSC-abgeleitete Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Signalverhaltens und der oben erwähnten Parameter untersucht. Für 15 von insgesamt 36 (41,6%) gemessenen Zellen zeigte sich ein Vorhof-typisches Verhalten und für weitere 15 Zellen ein Ventrikel-typisches Verhalten hinsichtlich der Frequenz- Δt -Korrelation. Diese Werte ließen sich gut mit den Herstellerangaben bzgl. der Zusammensetzung der Cor.4U Zellen vereinbaren. Diese bestehen laut Hersteller zu ca. 60% aus Ventrikel-artigen Zellen und zu ca. 40% aus Zellen atrialen Ursprungs. Die Hälfte dieser atrialen Zellen entspricht dabei phänotypisch Schrittmacherzellen. Die Abweichungen der prozentualen Angaben sind möglicherweise auf die geringe Anzahl der Einzelmessungen zurückzuführen. Durch Erhöhung der Statistik würden sich die Medianwerte der Analyseparameter ggf. verschieben und eine schärfere Trennung der Populationen zulassen. Eine tiefergehende Strukturanalyse der Zellen wurde nicht im Detail durchgeführt, da sich keine Unterschiede im Phänotyp erkennen ließen. Wie unter 3.7.2 erwähnt zeigten 74 gemessene Zelle bzw. Zellverbände ein regelmäßiges Calciumsignal, jedoch konnten nur 36 dieser Messungen ausgewertet werden, da die restlichen Zellen keine detektierbare Substratdeformation verursachten. Dieser Effekt war besonders auf Einzelzellebene besonders stark ausgeprägt. Nach persönlicher Rücksprache mit Axiogenesis könnte dies an der relativ kurzen Inkubationszeit nach Zellvereinzeln liegen, die unter Umständen nicht ausreichte, damit sich die Zellen von der enzymatischen Loslösung aus dem konfluenten Zellverband erholten, um die zur Kraftübertragung notwendigen Zellstrukturen aufzubauen. Dies würde auch die zum Teil schwache Ausprägung und Organisation der Sarkomere erklären, die mittels α -Actinin-Färbungen analysiert wurden (siehe 3.7.1).

5. Ausblick

Neben der Untersuchung des Zellverhaltens unter physiologischen Bedingungen erlauben die in dieser Arbeit entwickelten Methoden ebenfalls die Induktion und nachfolgende detaillierte Analyse pathologischer Veränderungen. So bietet die Technik zur Generierung definierter Zellverbände die Möglichkeit zur Etablierung eines Mikroinfarktmodells auf zellulärer Ebene. In ersten Vorexperimenten wurden drei verschiedene Versuchsansätze zur künstlichen Induktion von Mikroläsionen in Zellverbänden erprobt. Dazu wurden in definierten μ -Geweben entweder eine Einzelzelle durch lokale Laserablation oder mehrere Zellen durch linienförmiges Abrastern mit einem kurzwelligen Laser zerstört (Abb. 5-1).

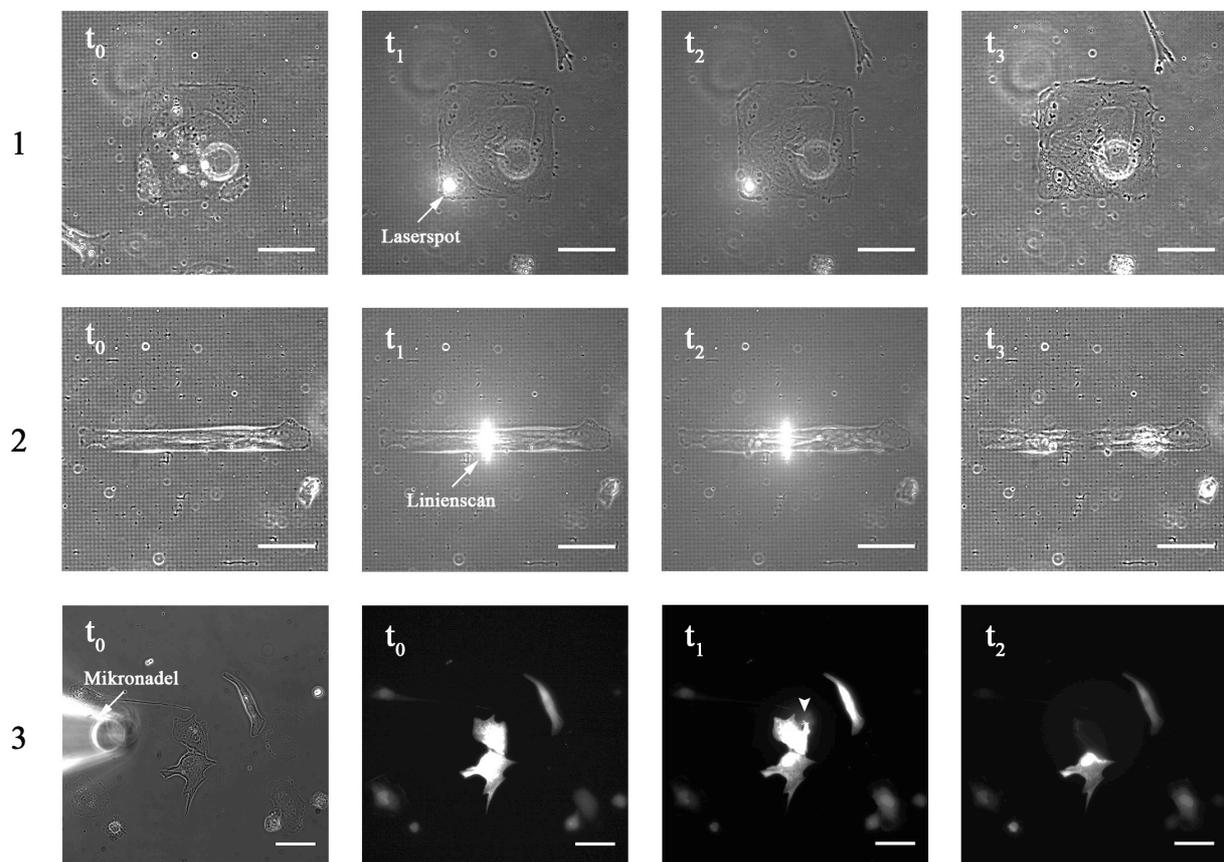


Abb. 5-1: Induktion von Mikroläsionen in kardialen μ -Geweben. Beispiele 1 und 2 zeigen kardiale Myozyten in intakten geordneten Zellverbänden (t_0). Zum Zeitpunkt t_1 wurden entweder eine Zelle lokal (Beispiel 1) oder mehrere Zellen im Zellverband (Beispiel 2) mit einem 405 nm Laser bestrahlt. Durch die anhaltende Laserablation wurden die Zellen im Bereich der Bestrahlung geschädigt (t_2) und zum Teil vollständig zerstört (Beispiel 2, t_3). Beispiel 3 zeigt Myozyten in ungeordneten Zellverbänden. Die Funktionalität der Zellen zum Zeitpunkt t_0 wurde durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität des Calcium-Indikators veranschaulicht. Zum Zeitpunkt t_1 wurde die obere der beiden Zellen mit einer Mikronadel zunächst punktiert (weiße Pfeilspitze) und anschließend rückstandsfrei aus dem Verband entfernt (t_2). Maßstäbe = 50 μ m

Dies führte im ersten Fall zum kurzzeitigen Flimmern des gesamten Zellverbandes. Im zweiten Fall konnte ein regelrechter Schnitt durch das μ -Gewebe erzielt werden. Als Grund für die primäre Schädigung wird die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies am Ort der Bestrahlung vermutet. Interessanterweise führten beide Behandlungen nachfolgend zum vollständigen Erliegen der Zellkontraktion des gesamten Verbandes. Durch den Aufbau von μ -Geweben unterschiedlicher Größe ließe sich die Reichweite der Schädigung untersuchen. Zusätzlich könnte überprüft werden, ob sich der Effekt durch die Zugabe von zur Blockade von *Gap Junctions* erprobten Substanzen wie z.B. Meclofenaminsäure oder 2-Aminoethyl-Diphenyl-Borat eingrenzen ließe, da Calciumkonzentrationsanalysen mittels Fluo4 eine schnelle Ausbreitung und nachfolgend konsistent erhöhte Konzentration im Gesamtzellverband andeuten.

Als alternative Methode zur Induktion lokaler Zellschädigung wurden Einzelzellen in einem Verband unter Zuhilfenahme einer in einen Mikromanipulator eingespannten feinen Glasnadel punktiert und anschließend rückstandsfrei aus diesem Verband entfernt. Dadurch könnte die Bildung zellschädigender Stoffe verhindert und untersucht werden, wie sich das sukzessive Entfernen einzelner Zellen auf das Signal- und Kontraktionsverhalten eines Zellverbandes auswirkt, welchen Anteil eine Einzelzelle zur Gesamtkraft des Gewebes beisteuert oder ob und wie das Fehlen einer Einzelzelle durch die verbleibenden Zelle kompensiert werden kann. Durch den zusätzlichen Einbau von Fibroblasten ließe sich die Interaktion der verschiedenen Zelltypen in definierten mehrzelligen Systemen auf elektrochemischer und mechanischer Ebene untersuchen.

Ausgehend vom mit Primärzellen vergleichbaren Signalverhalten induziert pluripotenter Stammzellen-abgeleiteter Kardiomyozyten könnten diese zum Aufbau der μ -Gewebe verwendet werden. Zum einen ließe sich damit auf die Verwendung des Biopsiematerials von Versuchstieren verzichten, zum anderen könnte an ihnen die Wirkung verschiedener Medikamente untersucht werden, die aufgrund ihrer humanen Herkunft verlässlichere und klinisch und therapeutisch relevantere Daten lieferten.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
Å	Ångström (= 0,1 nm)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AFM	<i>atomic force microscopy</i>
AJ	<i>Adherens Junction</i>
AP	Aktionspotenzial
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventrikular
BP	Bandpass
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumion
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CB	<i>cytoskeleton buffer</i> , Zytoskelettpuffer
CICR	<i>calcium-induced calcium release</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CSR	corbuläres sarkoplasmatisches Retikulum
Cx	Connexin
D	Direktionalität
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DiR	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanin Iodid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
DOPE	1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin
DOTAP	1,2-Dioleoyl-3-Trimethylammonium-Propan
Δt	zeitlicher Versatz zwischen Calciumsignal und Substratdeformation
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure

EKG	Elektrokardiogramm
E_m	Membranpotenzial
EMCCD	<i>electron multiplying charge-coupled device</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FA	Fokaladhäsion
FAK	Fokaladhäsionskinasen
FAP	Fokaladhäsions-Proteine
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , Fötales Rinderserum
FL	fusogenes Liposom
FN	Fibronektin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GJ	<i>Gap Junction</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperaziny)-Ethansulfonsäure
HMM	<i>heavy meromyosin</i>
Hz	Hertz
$I_{0,5}$	halbmaximale Intensität
I_f	<i>funny current</i>
IgG	Immunglobulin G
I_{max}	Intensitätsmaximum
I_{min}	Intensitätsminimum
InsP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
iPSCs	<i>induced pluripotent stem cells</i> , induziert-pluripotente Stammzellen
JSR	junktionales sarkoplasmatisches Retikulum
K^+	Kaliumion
K_d	Dissoziationskonstante
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
LMM	<i>light meromyosin</i>
M	Molekulargewicht
Max	Maximum

mbar	Millibar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
min	Minuten
Min	Minimum
ml	Milliliter
MLC	<i>myosin light chain</i>
mM	Millimol pro Liter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmikrometer
ms	Millisekunden
mV	Millivolt
MW	<i>molecular weight</i> , Molekulargewicht
μ	Mittelwert
μCP	<i>micro-contact printing</i>
μg	Mikrogramm
μ-Gewebe	Mikrogewebe
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol pro Liter
μm ²	Quadratmikrometer
n	Anzahl der Messungen
NA	numerische Apertur
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
nM	Nanomol pro Liter
nm	Nanometer
nN	Nanonewton
NSR	Netzwerk-sarkoplasmatisches Retikulum
P	Periodizitätsparameter
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung

PDMS	Polydimethylsiloxan
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PL	Phospholipid
PLB	Phospholamban
PMCA	Plasmamembran Calcium-Adenosintri-phosphatase
R	Korrelationskoeffizient
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RT	Raumtemperatur
RW	Reichweite
RyR	Ryanodin-Rezeptor
s	Sekunde
σ	Standardabweichung
SA	Sinoatrial
sCMOS	<i>scientific complementary metal-oxide semiconductor</i>
SERCA	sarko(endo)plasmatische Retikulum-Adenosintri-phosphatase
SLN	Sarkolipin
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TE	Trypsin-EDTA
t _F	Zeitpunkt der halbmaximalen Intensität
TM	Tropomyosin
Tn	Troponin
T-Tubuli	Transversaltubuli
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
Z-Scheibe	Zwischenscheibe

Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M. and Dunn, G. a. (1975) Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Experimental cell research*, **92**, 57–62.
- Adams, W.J., Pong, T., Geisse, N. a., Sheehy, S.P., Diop-Frimpong, B. and Parker, K.K. (2007) Engineering design of a cardiac myocyte. *Journal of Computer-Aided Materials Design*, **14**, 19–29.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science.
- Alford, P.W., Feinberg, A.W., Sheehy, S.P. and Parker, K.K. (2010) Biohybrid thin films for measuring contractility in engineered cardiovascular muscle. *Biomaterials*, **31**, 3613–21.
- Amin, A.S., Tan, H.L. and Wilde, A. a M. (2010) Cardiac ion channels in health and disease. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society*, **7**, 117–26.
- Aratyn-Schaus, Y., Oakes, P.W., Stricker, J., Winter, S.P. and Gardel, M.L. (2010) Preparation of complaint matrices for quantifying cellular contraction. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 1–6.
- Asahi, M., Sugita, Y., Kurzydowski, K., De Leon, S., Tada, M., Toyoshima, C., et al. (2003) Sarcolipin regulates sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) by binding to transmembrane helices alone or in association with phospholamban. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 5040–5045.
- Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K. and Baudino, T.A. (2007) Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **293**, H1883–H1891.
- Beard, N. a., Laver, D.R. and Dulhunty, a. F. (2004) Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **85**, 33–69.
- Beauchamp, P., Desplantez, T., McCain, M.L., Li, W., Asimaki, A., Rigoli, G., et al. (2012) Electrical Coupling and Propagation in Engineered Ventricular Myocardium With Heterogeneous Expression of Connexin43. *Circulation research*, **110**, 1445–53.
- Belting, M. and Petersson, P. (1999a) Protective role for proteoglycans against cationic lipid cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency in vitro. *The Biochemical journal*, **342** (Pt 2), 281–286.
- Belting, M. and Petersson, P. (1999b) Intracellular accumulation of secreted proteoglycans inhibits cationic lipid-mediated gene transfer. Co-transfer of glycosaminoglycans to the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 19375–19382.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Stryer, L. (2007) *Biochemistry*, 6th ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., et al. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)*, **324**, 98–102.
- Berridge, M.J. (2009) Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, **1793**, 933–40.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **4**, 517–29.
- Bers, D.M. (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, **415**, 198–205.
- Bersell, K., Arab, S., Haring, B. and Kühn, B. (2009) Neuregulin1/ErbB4 Signaling Induces Cardiomyocyte Proliferation and Repair of Heart Injury. *Cell*, **138**, 257–270.
- Beyer, E.C., Paul, D.L. and Goodenough, D. a. (1990) Connexin family of gap junction proteins. *The Journal of Membrane Biology*, **116**, 187–194.
- Bhatnagar, P., Nixon, A.J., Kim, I. and Kameoka, J. (2008) Protein functionalized micro hydrogel features for cell-surface interaction. *Biomedical Microdevices*, **10**, 567–571.
- Van den Bogaart, G., Thutupalli, S., Risselada, J.H., Meyenberg, K., Holt, M., Riedel, D., et al. (2011) Synaptotagmin-1 may be a distance regulator acting upstream of SNARE nucleation. *Nature structural & molecular biology*, **18**, 805–812.
- Bollini, S., Smart, N. and Riley, P.R. (2011) Resident cardiac progenitor cells: At the heart of regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **50**, 296–303.
- Bootman, M.D., Higazi, D.R., Coombes, S. and Roderick, H.L. (2006) Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *Journal of cell science*, **119**, 3915–25.
- Boudou, T., Legant, W.R., Mu, A., Borochin, M. a., Thavandiran, N., Radisic, M., et al. (2012) A Microfabricated Platform to Measure and Manipulate the Mechanics of Engineered Cardiac Microtissues. *Tissue Engineering Part A*, **18**, 910–919.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. a, Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., et al. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 7297–7301.
- Bray, M., Sheehy, S.P. and Parker, K.K. (2008) Sarcomere alignment is regulated by myocyte shape. *Cell motility and the cytoskeleton*, **65**, 641–51.
- Brembeck, F.H., Schwarz-romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M. and Birchmeier, W. (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions service Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. , 2225–2230.

- Burri, L., Varlamov, O., Doege, C. a, Hofmann, K., Beilharz, T., Rothman, J.E., et al. (2003) A SNARE required for retrograde transport to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 9873–9877.
- BurrIDGE, P.W., Keller, G., Gold, J.D. and Wu, J.C. (2012) Production of de novo cardiomyocytes: Human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell*, **10**, 16–28.
- Campa, V.M., Gutiérrez-Lanza, R., Cerignoli, F., Díaz-Trelles, R., Nelson, B., Tsuji, T., et al. (2008) Notch activates cell cycle reentry and progression in quiescent cardiomyocytes. *Journal of Cell Biology*, **183**, 129–141.
- Campbell, D.J., Beckman, K.J., Calderon, C.E., Doolan, P.W., Ottosen, R.M., Ellis, A.B., et al. (1999) Replication and Compression of Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer. *Journal of Chemical Education*, **76**, 537.
- Cesa, C.M., Kirchgessner, N., Mayer, D., Schwarz, U.S., Hoffmann, B. and Merkel, R. (2007) Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns. *The Review of scientific instruments*, **78**, 034301.
- Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M. and Ingber, D.E. (1997) Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*, **276**, 1425–1428.
- Cheng, H., Lederer, W.J. and Cannell, M.B. (1993) Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science (New York, N.Y.)*, **262**, 740–744.
- Clark, K.A., McElhinny, A.S., Beckerle, M.C. and Gregorio, C.C. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annual review of cell and developmental biology*, **18**, 637–706.
- Cornea, R.L., Jones, L.R., Autry, J.M. and Thomas, D.D. (1997) Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry*, **36**, 2960–2967.
- Csiszár, A., Csiszar, A., Pinto, J.T., Gautam, T., Kleusch, C., Hoffmann, B., et al. (2014) Resveratrol Encapsulated in Novel Fusogenic Liposomes Activates Nrf2 and Attenuates Oxidative Stress in Cerebromicrovascular Endothelial Cells From Aged Rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 1–11.
- Danowski, B. a, Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J.M. and Sanger, J.W. (1992) Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *Journal of Cell Biology*, **118**, 1411–1419.
- Davis, M.E., Hsieh, P.C.H., Grodzinsky, A.J. and Lee, R.T. (2005) Custom design of the cardiac microenvironment with biomaterials. *Circulation Research*, **97**, 8–15.
- Davis, J.P. and Tikunova, S.B. (2008) Ca²⁺ exchange with troponin C and cardiac muscle dynamics. *Cardiovascular Research*, **77**, 619–626.

- Dedek, K., Schultz, K., Pieper, M., Dirks, P., Maxeiner, S., Willecke, K., et al. (2006) Localization of heterotypic gap junctions composed of connexin45 and connexin36 in the rod pathway of the mouse retina. *European Journal of Neuroscience*, **24**, 1675–1686.
- Dembo, M. and Wang, Y.L. (1999) Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical journal*, **76**, 2307–2316.
- Desplantez, T., McCain, M.L., Beauchamp, P., Rigoli, G., Rothen-Rutishauser, B., Parker, K.K., et al. (2012) Connexin43 ablation in foetal atrial myocytes decreases electrical coupling, partner connexins, and sodium current. *Cardiovascular research*, **94**, 58–65.
- Diamantouros, S.E., Hurtado-Aguilar, L.G., Schmitz-Rode, T., Mela, P. and Jockenhoevel, S. (2013) Pulsatile perfusion bioreactor system for durability testing and compliance estimation of tissue engineered vascular grafts. *Annals of Biomedical Engineering*, **41**, 1979–1989.
- DiFrancesco, D. (2010) The role of the funny current in pacemaker activity. *Circulation research*, **106**, 434–46.
- Dike, L.E., Chen, C.S., Mrksich, M., Tien, J., Whitesides, G.M. and Ingber, D.E. (1999) Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, **35**, 441–448.
- Discher, D.E., Janmey, P. and Wang, Y.-L. (2005) Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, **310**, 1139–1143.
- Dokuparti, M.V.N., Pamuru, P.R., Thakkar, B., Tanjore, R.R. and Nallari, P. (2005) Etiopathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Journal of Human Genetics*, **50**, 375–381.
- Dubois, N.C., Craft, A.M., Sharma, P., Elliott, D. a, Stanley, E.G., Elefanty, A.G., et al. (2011) SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, **29**, 1011–8.
- Dvir, T., Timko, B.P., Kohane, D.S. and Langer, R. (2011) Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology*, **6**, 13–22.
- Van Eerd, J.-P. and Takahashi, K. (1975) The amino acid sequence of bovine cardiac troponin-C. Comparison with rabbit skeletal troponin-C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **64**, 122–127.
- Egger, M. and Niggli, E. (1999) Regulatory function of Na-Ca exchange in the heart: Milestones and outlook. *Journal of Membrane Biology*, **168**, 107–130.
- Endo, M. (1977) Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev*, **57**, 71–108.
- Engler, A.J., Carag-Krieger, C., Johnson, C.P., Raab, M., Tang, H.-Y., Speicher, D.W., et al. (2008) Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *Journal of Cell Science*, **121**, 3794–3802.

- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L. and Discher, D.E. (2006) Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, **126**, 677–689.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X. and Chen, C.S. (2011) A hitchhiker's guide to mechanobiology. *Developmental cell*, **21**, 35–47.
- Fabiato, A. (1983) Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *The American journal of physiology*, **245**, C1–C14.
- Failli, P., Fazzini, A., Franconi, F., Stendardi, I. and Giotti, A. (1992) Taurine antagonizes the increase in intracellular calcium concentration induced by alpha-adrenergic stimulation in freshly isolated guinea-pig cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **24**, 1253–1265.
- Fallon, R.F. and Goodenough, D.A. (1981) Five-hour Half-life of Mouse Liver Gap-junction Protein. *The Journal of Cell Biology*, **90**, 521–526.
- Farah, C.S. and Reinach, F.C. (1995) The troponin complex and regulation of muscle contraction. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **9**, 755–767.
- Feinberg, A.W., Feigel, A., Shevkopyas, S.S., Sheehy, S., Whitesides, G.M. and Parker, K.K. (2007) Muscular thin films for building actuators and powering devices. *Science (New York, N.Y.)*, **317**, 1366–70.
- Feng, J., Wible, B., Li, G.-R., Wang, Z. and Nattel, S. (1997) Antisense Oligodeoxynucleotides Directed Against Kv1.5 mRNA Specifically Inhibit Ultrarapid Delayed Rectifier K⁺ Current in Cultured Adult Human Atrial Myocytes. *Circulation Research*, **80**, 572–579.
- Frank, D., Kuhn, C., Katus, H. a. and Frey, N. (2006) The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *Journal of Molecular Medicine*, **84**, 446–468.
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. and Ramesh, V. (1999) Shape, size, and distribution of Ca²⁺ release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophysical journal*, **77**, 1528–1539.
- Fricke, R., Zentis, P.D., Rajappa, L.T., Hofmann, B., Banzet, M., Offenhäusser, A., et al. (2011) Axon guidance of rat cortical neurons by microcontact printed gradients. *Biomaterials*, **32**, 2070–2076.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., et al. (2002) Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science (New York, N.Y.)*, **296**, 503–507.
- Garrod, D.R., Berika, M.Y., Bardsley, W.F., Holmes, D. and Taberner, L. (2005) Hyper-adhesion in desmosomes: its regulation in wound healing and possible relationship to cadherin crystal structure. *Journal of cell science*, **118**, 5743–5754.
- Garrod, D. and Chidgey, M. (2008) Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et biophysica acta*, **1778**, 572–587.

- Gee, K.R., Brown, K. a, Chen, W.N., Bishop-Stewart, J., Gray, D. and Johnson, I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell calcium*, **27**, 97–106.
- Geiger, B., Spatz, J.P. and Bershadsky, A.D. (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **10**, 21–33.
- Geisse, N. a, Sheehy, S.P. and Parker, K.K. (2009) Control of myocyte remodeling in vitro with engineered substrates. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, **45**, 343–50.
- Giancotti, F.G. (1999) Integrin Signaling. *Science*, **285**, 1028–1033.
- Giles, W.R. and Imaizumi, Y. (1988) Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *The Journal of physiology*, **405**, 123–145.
- Gilmore, A.P., Wood, C., Ohanian, V., Jackson, P., Patel, B., Rees, D.J.G., et al. (1993) The cytoskeletal protein talin contains at least two distinct vinculin binding domains. *Journal of Cell Biology*, **122**, 337–347.
- Glynn, I.M. and Karlish, S.J. (1990) Occluded cations in active transport. *Annual review of biochemistry*, **59**, 171–205.
- Goldman, D.E. (1943) POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *The Journal of general physiology*, **27**, 37–60.
- Goodenough, D.A., Goliger, J.A. and Paul, D.L. (1996) Connexins, Connexons, and Intercellular Communication. *Annual Review of Biochemistry*, **65**, 475–502.
- Gottardi, C.J. and Gumbiner, B.M. (2004) Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *Journal of Cell Biology*, **167**, 339–349.
- Grant, A.O. (2009) Cardiac ion channels. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*, **2**, 185–94.
- Grosberg, A., Kuo, P.-L., Guo, C.-L., Geisse, N. a, Bray, M.-A., Adams, W.J., et al. (2011) Self-organization of muscle cell structure and function. *PLoS computational biology*, **7**, e1001088.
- Gupta, K.B., Ratcliffe, M.B., Fallert, M. a, Edmunds, L.H. and Bogen, D.K. (1994) Changes in passive mechanical stiffness of myocardial tissue with aneurysm formation. *Circulation*, **89**, 2315–2326.
- Hampe, N., Jonas, T., Wolters, B., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R., et al. (2014) Defined 2-D microtissues on soft elastomeric silicone rubber using lift-off epoxy-membranes for biomechanical analyses. *Soft Matter*, **10**, 2431–43.
- Harris, A.L. (2007) Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, **94**, 120–143.

- Hartsock, A. and Nelson, W.J. (2008) Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1778**, 660–669.
- Hassink, R.J., Pasumarthi, K.B., Nakajima, H., Rubart, M., Soonpaa, M.H., De La Rivière, A.B., et al. (2008) Cardiomyocyte cell cycle activation improves cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, **78**, 18–25.
- Hattori, F., Chen, H., Yamashita, H., Tohyama, S., Satoh, Y.-S., Yuasa, S., et al. (2010) Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. *Nature methods*, **7**, 61–66.
- He, J.-Q., Ma, Y., Lee, Y., Thomson, J. a and Kamp, T.J. (2003) Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circulation research*, **93**, 32–39.
- Hersch, N., Wolters, B., Dreissen, G., Springer, R., Kirchgeßner, N., Merkel, R., et al. (2013) The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening. *Biology open*, **2**, 351–61.
- Hersch, N., Wolters, B., Ungvari, Z., Gautam, T., Deshpande, D., Merkel, R., et al. (2015) Biotin-conjugated fusogenic liposomes for high-quality cell purification. *Journal of Biomaterials Applications*.
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed. Sinauer Associates.
- Hodgkin, A.L. and Katz, B. (1949) The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *The Journal of Physiology*, **108**, 37–77.
- Hoffmann, B., Csiszár, A., Hersch, N. and Zantl, R. (2014) Effizienter Molekültransfer in lebende Zellen mithilfe der Membranfusion. *BIOspektrum*, **20**, 540–541.
- Houben, S., Kirchgeßner, N. and Merkel, R. (2010) Estimating force fields of living cells - Comparison of several regularization schemes combined with automatic parameter choice. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, **6376 LNCS**, 71–80.
- Huppelsberg, J. and Walter, K. (2009) *Kurzlehrbuch Physiologie*, 3rd ed. Georg Thieme Verlag.
- Huxley, A.F. and Niedergerke, R. (1954) Structural Changes in Muscle During Contraction: Interference Microscopy of Living Muscle Fibres. *Nature*, **173**, 971–973.
- Hynes, R. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, **110**, 673–687.
- Hytönen, V.P., Määttä, J. a E., Nyholm, T.K.M., Livnah, O., Eisenberg-Domovich, Y., Hyre, D., et al. (2005) Design and construction of highly stable, protease-resistant chimeric avidins. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 10228–10233.

- Iancu, R. V, Ramamurthy, G., Warriar, S., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Jones, S.W., et al. (2008) Cytoplasmic cAMP concentrations in intact cardiac myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, **295**, C414–22.
- Imanaka-Yoshida, K., Enomoto-Iwamoto, M., Yoshida, T. and Sakakura, T. (1999) Vinculin, talin, integrin $\alpha 6 \beta 1$ and laminin can serve as components of attachment complex mediating contraction force transmission from cardiomyocytes to extracellular matrix. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **42**, 1–11.
- James, T.N. (2003) Structure and function of the sinus node, AV node and his bundle of the human heart: Part II - Function. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **45**, 327–360.
- Jessup, M. and Brozena, S. (2003) Heart Failure. *New England Journal of Medicine*, **348**, 2007–2018.
- Jiang, J.X. and Goodenough, D. a. (1996) Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 1287–1291.
- Johnson, R.G., Meyer, R. a, Li, X.-R., Preus, D.M., Tan, L., Grunenwald, H., et al. (2002) Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Experimental cell research*, **275**, 67–80.
- Jongen, W.M.F., Fitzgerald, D.J., Asamoto, M., Piccoli, C., Slaga, T.J., Gros, D., et al. (1991) Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca^{2+} in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin. *Journal of Cell Biology*, **114**, 545–555.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A. and Belmonte, J.C.I. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, **464**, 606–609.
- Jorgensen, A.O., Shen, A.C.Y., Arnold, W., McPherson, P.S. and Campbell, K.P. (1993) The Ca^{2+} -release channel/ryanodine receptor is localized in junctional and corbular sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. *Journal of Cell Biology*, **120**, 969–980.
- Joyner, R.W., Kumar, R., Golod, D. a, Wilders, R., Jongsma, H.J., Verheijck, E.E., et al. (1998) Electrical interactions between a rabbit atrial cell and a nodal cell model. *The American journal of physiology*, **274**, H2152–H2162.
- Kadambi, V.J. and Kranias, E.G. (1997) Phospholamban: a protein coming of age. *Biochemical and biophysical research communications*, **239**, 1–5.
- Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogórek, B., et al. (2010) Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circulation Research*, **107**, 305–315.
- Kaplan, J.H. (2002) Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annual review of biochemistry*, **71**, 511–535.
- Katz, A.M. (2011) *Physiology of the Heart*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Keith, A. and Flack, M. (1907) The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *Journal of anatomy and physiology*, **41**, 172–189.
- Kelleher, C.M. and Vacanti, J.P. (2010) Engineering extracellular matrix through nanotechnology. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, **7 Suppl 6**, S717–S729.
- Kentish, J.C., McCloskey, D.T., Layland, J., Palmer, S., Leiden, J.M., Martin, A.F., et al. (2001) Phosphorylation of Troponin I by Protein Kinase A Accelerates Relaxation and Crossbridge Cycle Kinetics in Mouse Ventricular Muscle. *Circulation Research*, **88**, 1059–1065.
- Kirchhof, C.J.H.J., Bonke, F.I.M., Allessie, M. a. and Lammers, W.J.E.P. (1987) The influence of the atrial myocardium on impulse formation in the rabbit sinus node. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, **410**, 198–203.
- Klabunde, R.E. (2011) *Cardiovascular Physiology Concepts*, 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kleusch, C., Hersch, N., Hoffmann, B., Merkel, R. and Csiszár, A. (2012) Fluorescent lipids: Functional parts of fusogenic liposomes and tools for cell membrane labeling and visualization. *Molecules*, **17**, 1055–1073.
- Kodama, I. and Boyett, M.R. (1985) Regional differences in the electrical activity of the rabbit sinus node. *Pflug Arch Eur J Phy*, **404**, 214–226.
- Kolossov, E., Lu, Z., Drobinskaya, I., Gassanov, N., Duan, Y., Sauer, H., et al. (2005) Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**, 577–579.
- Kopatz, I., Remy, J.S. and Behr, J.P. (2004) A model for non-viral gene delivery: Through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*, **6**, 769–776.
- Koval, M. (2006) Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in Cell Biology*, **16**, 159–166.
- Krenz, M., Sadayappan, S., Osinska, H.E., Henry, J. a, Beck, S., Warshaw, D.M., et al. (2007) Distribution and structure-function relationship of myosin heavy chain isoforms in the adult mouse heart. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 24057–24064.
- Kruger, M., Wright, J. and Wang, K. (1991) Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: Correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *Journal of Cell Biology*, **115**, 97–107.
- Kumar, A. and Whitesides, G.M. (1993) Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, **63**, 2002–2004.

- Kuo, P.-L., Lee, H., Bray, M.-A., Geisse, N. a, Huang, Y.-T., Adams, W.J., et al. (2012) Myocyte shape regulates lateral registry of sarcomeres and contractility. *The American journal of pathology*, **181**, 2030–7.
- Küpper, K. (2012) *Untersuchung Intrazellulärer Kalzium-Signale Bei Zellmechanischen Prozessen*. Bonn.
- Laflamme, M.A. and Murry, C.E. (2005) Regenerating the heart. *Nature biotechnology*, **23**, 845–856.
- Laird, D.W., Puranam, K.L. and Revel, J.P. (1991) Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes. *The Biochemical journal*, **273(Pt 1)**, 67–72.
- Lane, E.B. and McLean, W.H.I. (2004) Keratins and skin disorders. *Journal of Pathology*, **204**, 355–366.
- Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993) Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, **260**, 920–926.
- Lauer, L., Klein, C. and Offenhäusser, A. (2001) Spot compliant neuronal networks by structure optimized micro-contact printing. *Biomaterials*, **22**, 1925–1932.
- Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C. and Falk, M.M. (2002) Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 10446–10451.
- Lehnert, D., Wehrle-Haller, B., David, C., Weiland, U., Ballestrem, C., Imhof, B. a, et al. (2004) Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of cell science*, **117**, 41–52.
- Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E.G. and Bers, D.M. (2000) Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **278**, H769–H779.
- Li, G.-R., Feng, J., Yue, L., Carrier, M. and Nattel, S. (1996) Evidence for Two Components of Delayed Rectifier K⁺ Current in Human Ventricular Myocytes. *Circulation Research*, **78**, 689–696.
- Li, Z., Matsuoka, S., Hryshko, L. V., Nicoll, D. a., Bersohn, M.M., Burke, E.P., et al. (1994) Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 17434–17439.
- Liew, C.-C. and Dzau, V.J. (2004) Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nature reviews. Genetics*, **5**, 811–825.
- Lin, J. and Alexander-Katz, A. (2013) Cell membranes open “doors” for cationic nanoparticles/biomolecules: insights into uptake kinetics. *ACS nano*, **7**, 10799–808.

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Bretscher, A., et al. (2007) *Molecular Cell Biology*, 6th ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- Loewenstein, W.R. and Loewenstein, R. (1981) Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiological reviews*, **61**, 829–913.
- Lutolf, M.P., Gilbert, P.M. and Blau, H.M. (2009) Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature*, **462**, 433–441.
- Ma, P.X. (2008) Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60**, 184–198.
- Malsam, J. and Söllner, T.H. (2011) Organization of SNAREs within the Golgi stack. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **3**, 1–17.
- Mangoni, M.E. and Nargeot, J. (2001) Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovascular Research*, **52**, 51–64.
- Mangoni, M.E. and Nargeot, J. (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiological reviews*, **88**, 919–82.
- Marieb, E.N. and Hoehn, K. (2013) *Human Anatomy & Physiology*, 9th ed. Pearson Benjamin Cummings.
- Martinez, E.C. and Kofidis, T. (2011) Adult stem cells for cardiac tissue engineering. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **50**, 312–319.
- McCain, M.L., Desplantez, T., Geisse, N. a., Rothen-Rutishauser, B., Oberer, H., Parker, K.K., et al. (2012a) Cell-to-cell coupling in engineered pairs of rat ventricular cardiomyocytes: relation between Cx43 immunofluorescence and intercellular electrical conductance. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **302**, H443–50.
- McCain, M.L., Lee, H., Aratyn-Schaus, Y., Kleber, a. G. and Parker, K.K. (2012b) Cooperative coupling of cell-matrix and cell-cell adhesions in cardiac muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 9881–9886.
- McElhinny, A.S., Kolmerer, B., Fowler, V.M., Labeit, S. and Gregorio, C.C. (2001) The N-terminal end of nebulin interacts with tropomodulin at the pointed ends of the thin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 583–592.
- Van Meer, G., Voelker, D.R. and Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 112–124.
- Merkel, R., Kirchgessner, N., Cesa, C.M. and Hoffmann, B. (2007) Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness. *Biophysical journal*, **93**, 3314–23.
- Méry, A., Aimond, F., Ménard, C., Mikoshiba, K., Michalak, M. and Pucéat, M. (2005) Initiation of embryonic cardiac pacemaker activity by inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent calcium signaling. *Molecular biology of the cell*, **16**, 2414–2423.

- Mescher, A. (2013) *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition*, 13th ed.
- Millevoi, S., Trombitas, K., Kolmerer, B., Kostin, S., Schaper, J., Pelin, K., et al. (1998) Characterization of nebulin and nebulette and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *Journal of molecular biology*, **282**, 111–123.
- Milligan, R.A. (1996) Protein-protein interactions in the rigor actomyosin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 21–26.
- Mitra, S.K., Hanson, D. a and Schlaepfer, D.D. (2005) Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **6**, 56–68.
- Morano, M., Zacharzowski, U., Maier, M., Lange, P.E., Alexi-Meskishvili, V., Haase, H., et al. (1996) Regulation of human heart contractility by essential myosin light chain isoforms. *The Journal of clinical investigation*, **98**, 467–473.
- Mould, A.P., Akiyama, S.K. and Humphries, M.J. (1995) Regulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations: Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 26270–26277.
- Mounkes, L.C., Zhong, W., Cipres-Palacin, G., Heath, T.D. and Debs, R.J. (1998) Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 26164–26170.
- Naumovska, E., Ludwanowski, S., Hersch, N., Braun, T., Merkel, R., Hoffmann, B., et al. (2014) Plasma membrane functionalization using highly fusogenic immune activator liposomes. *Acta Biomaterialia*, **10**, 1403–1411.
- Ng, S.Y.S., Wong, C.K.C. and Tsang, S.Y.S.S.Y.S. (2010) Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future. *American Journal of ...*, 1234–1249.
- Nicoll, D., Longoni, S. and Philipson, K.D. (1990) Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Science (New York, N.Y.)*, **250**, 562–565.
- Nicoll, D., Ottolia, M., Lu, L., Lu, Y. and Philipson, K.D. (1999) A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na^{+} - Ca^{2+} exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 910–917.
- Nicoll, D., Quednau, B.D., Qui, Z., Xia, Y.R., Lusic, A.J. and Philipson, K.D. (1996) Cloning of a third mammalian Na^{+} - Ca^{2+} exchanger, NCX3. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 24914–24921.
- Novoyatleva, T., Diehl, F., Van Amerongen, M.J., Patra, C., Ferrazzi, F., Bellazzi, R., et al. (2010) TWEAK is a positive regulator of cardiomyocyte proliferation. *Cardiovascular Research*, **85**, 681–690.
- Nunes, S.S., Song, H., Chiang, C.K. and Radisic, M. (2011) Stem cell-based cardiac tissue engineering. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **4**, 592–602.

- Oceandy, D., Stanley, P.J., Cartwright, E.J. and Neyses, L. (2007) The regulatory function of plasma-membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) in the heart. *Biochemical Society transactions*, **35**, 927–930.
- Ojima, I. (1989) The Hydrosilylation Reaction. *Organic Silicon Compounds Volume 1 and Volume 2* pp. 1479–1526.
- Olivares, A.L. and Lacroix, D. (2013) *Computational Modeling in Tissue Engineering* (ed L Geris).
- Otsu, N., Smith, P.L., Reid, D.B., Environment, C., Palo, L., Alto, P., et al. (1979) A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *Automatica*, **20**, 62–66.
- Papa, I., Astier, C., Kwiatek, O., Raynaud, F., Bonnal, C., Lebart, M.C., et al. (1999) Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **20**, 187–197.
- Pardo, J. V., D'Angelo Siliciano, J. and Craig, S.W. (1983) Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers. *Journal of Cell Biology*, **97**, 1081–1088.
- Parker, K.K., Brock, A.L., Brangwynne, C., Mannix, R.J., Wang, N., Ostuni, E., et al. (2002) Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **16**, 1195–1204.
- Parker, K.K., Tan, J., Chen, C.S. and Tung, L. (2008) Myofibrillar architecture in engineered cardiac myocytes. *Circulation research*, **103**, 340–2.
- Pawley, J. (2006) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. Springer.
- Pelham, R. and Wang, Y. (1997) Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. ... *of the National Academy of Sciences*, **95**.
- Periasamy, M., Bhupathy, P. and Babu, G.J. (2008) Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular Research*, **77**, 265–273.
- Periasamy, M. and Huke, S. (2001) SERCA Pump Level is a Critical Determinant of Ca²⁺ Homeostasis and Cardiac Contractility. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **33**, 1053–1063.
- Peyton, S.R. and Putnam, A.J. (2005) Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *Journal of Cellular Physiology*, **204**, 198–209.
- Piroddi, N., Belus, A., Scellini, B., Tesi, C., Giunti, G., Cerbai, E., et al. (2007) Tension generation and relaxation in single myofibrils from human atrial and ventricular myocardium. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, **454**, 63–73.
- Pollack, G.H. and Huntsman, L.L. (1974) Sarcomere length-active force relations in living mammalian cardiac muscle. *The American journal of physiology*, **227**, 383–389.

- Pope, B., Pope, B., Hoh, J.F., Hoh, J.F., Weeds, a and Weeds, a. (1980) The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes. *FEBS Lett*, **118**, 205–208.
- Radisic, M., Marsano, A., Maidhof, R., Wang, Y. and Vunjak-Novakovic, G. (2008) Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems. *Nature protocols*, **3**, 719–738.
- Rahman, S., Carlile, G. and Evans, W.H. (1993) Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 1260–1265.
- Rape, A., Guo, W. -h. and Wang, Y. -l. (2011) Microtubule depolymerization induces traction force increase through two distinct pathways. *Journal of Cell Science*, **124**, 4233–4240.
- Rayment, I., Holden, H.M., Whittaker, M., Yohn, C.B., Lorenz, M., Holmes, K.C., et al. (1993) Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science (New York, N.Y.)*, **261**, 58–65.
- Reiser, P.J., Portman, M. a, Ning, X.H. and Schomisch Moravec, C. (2001) Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **280**, H1814–H1820.
- Reuter, H. and Seitz, N. (1968) The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *The Journal of physiology*, **195**, 451–470.
- Robinson, T.F., Factor, S.M. and Sonnenblick, E.H. (1986) The heart as a suction pump. *Scientific American*, **254**, 84–91.
- Rothbard, J.B., Jessop, T.C., Lewis, R.S., Murray, B. a. and Wender, P. a. (2004) Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 9506–9507.
- Rüegg, J.C. (1998) Cardiac contractility: How calcium activates the myofilaments. *Naturwissenschaften*, **85**, 575–582.
- Ruvinov, E., Harel-Adar, T. and Cohen, S. (2011) Bioengineering the infarcted heart by applying bio-inspired materials. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **4**, 559–574.
- Ruvinov, E., Sapir, Y. and Cohen, S. (2012) Cardiac Tissue Engineering: Principles, Materials, and Applications. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*, **4**, 1–200.
- Santana, L.F., Cheng, E.P. and Lederer, W.J. (2010) How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **49**, 901–903.
- Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J.E. and Söllner, T.H. (1997) Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 997–1001.

- Schillinger, W., Fiolet, J.W., Schlotthauer, K. and Hasenfuss, G. (2003) Relevance of Na⁺–Ca²⁺ exchange in heart failure. *Cardiovascular Research*, **57**, 921–933.
- Schram, G., Pourrier, M., Melnyk, P. and Nattel, S. (2002) Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circulation Research*, **90**, 939–950.
- Schwarz, U.S., Balaban, N.Q., Riveline, D., Bershadsky, A., Geiger, B. and Safran, S. a. (2002) Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. *Biophysical journal*, **83**, 1380–94.
- Segers, V.F.M. and Lee, R.T. (2007) Local delivery of proteins and the use of self-assembling peptides. *Drug Discovery Today*, **12**, 561–568.
- Segers, V.F.M. and Lee, R.T. (2011) Biomaterials to enhance stem cell function in the heart. *Circulation Research*, **109**, 910–922.
- Segretain, D. and Falk, M.M. (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1662**, 3–21.
- Shannon, T.R., Guo, T. and Bers, D.M. (2003) Ca²⁺ scraps: local depletions of free [Ca²⁺] in cardiac sarcoplasmic reticulum during contractions leave substantial Ca²⁺ reserve. *Circulation Research*, **93**, 40–45.
- Shattil, S.J., Kim, C. and Ginsberg, M.H. (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **11**, 288–300.
- Shim, J., Grosberg, A., Nawroth, J.C., Parker, K.K. and Bertoldi, K. (2012) Modeling of cardiac muscle thin films: pre-stretch, passive and active behavior. *Journal of biomechanics*, **45**, 832–41.
- Siegel, G., Albers, R.W., Brandy, S. and Price, D. (2005) *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 7th ed. Elsevier Academic Press.
- Silbernagl, S. and Despopoulos, A. (2012) *Taschenatlas Physiologie*, 8. Auflage. Thieme.
- Singelyn, J.M. and Christman, K.L. (2010) Injectable materials for the treatment of myocardial infarction and heart failure: The promise of decellularized matrices. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **3**, 478–486.
- Söhl, G. and Willecke, K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research*, **62**, 228–32.
- Song, L.S., Guatimosim, S., Gómez-Viquez, L., Sobie, E. a., Ziman, A., Hartmann, H., et al. (2005) Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* pp. 99–111.
- Sosinsky, G. (1995) Mixing of connexins in gap junction membrane channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 9210–9214.

- Van Spreeuwel, A.C.C., Bax, N.A.M., Bastiaens, A.J., Foolen, J., Loerakker, S., Boročin, M., et al. (2014) The influence of matrix (an)isotropy on cardiomyocyte contraction in engineered cardiac microtissues. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, **6**, 422–9.
- Sun, J., Ahmad, S., Chen, S., Tang, W., Zhang, Y., Chen, P., et al. (2005) Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca²⁺ signaling than homomeric counterparts. *American journal of physiology. Cell physiology*, **288**, C613–C623.
- Thiriet, M. (2013) Tissue Functioning and Remodeling in the Circulatory and Ventilatory Systems. *Biomathematical and Biomechanical Modeling of the Circulatory and Ventilatory Systems* pp. 189–269. Springer New York, New York, NY.
- Thomas, T., Jordan, K., Simek, J., Shao, Q., Jedeszko, C., Walton, P., et al. (2005) Mechanisms of Cx43 and Cx26 transport to the plasma membrane and gap junction regeneration. *Journal of cell science*, **118**, 4451–4462.
- Thompson, M., Kliever, a, Maass, D., Becker, L., White, D.J., Bryant, D., et al. (2000) Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. *Pediatric research*, **47**, 669–676.
- Tidball, J.G., Cederdahl, J.E. and Bers, D.M. (1991) Quantitative analysis of regional variability in the distribution of transverse tubules in rabbit myocardium. *Cell and Tissue Research*, **264**, 293–298.
- Tortora, G.J. and Derrickson, B. (2009) *Principles of Anatomy and Physiology*, 12th ed. Jon Wiley & Sons, Inc.
- Tous, E., Purcell, B., Ifkovits, J.L. and Burdick, J. a. (2011) Injectable acellular hydrogels for cardiac repair. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **4**, 528–542.
- Tse, J.R. and Engler, A.J. (2010) Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Current Protocols in Cell Biology*, 1–16.
- Tsien, R.Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**, 527–528.
- Tuvia, S., Buhusi, M., Davis, L., Reedy, M. and Bennett, V. (1999) Ankyrin-B is required for intracellular sorting of structurally diverse Ca²⁺ homeostasis proteins. *Journal of Cell Biology*, **147**, 995–1007.
- Veenstra, R.D., Wang, H.-Z., Beblo, D.A., Chilton, M.G., Harris, A.L., Beyer, E.C., et al. (1995) Selectivity of Connexin-Specific Gap Junctions Does Not Correlate With Channel Conductance. *Circulation Research*, **77**, 1156–1165.
- Verheijck, E.E., Wessels, A., van Ginneken, a C., Bourier, J., Markman, M.W.M., Vermeulen, J.L.M., et al. (1998) Distribution of atrial and nodal cells within the rabbit sinoatrial node: models of sinoatrial transition. *Circulation*, **97**, 1623–1631.

- Verkerk, A.O., Geuzebroek, G.S.C., Veldkamp, M.W. and Wilders, R. (2012) Effects of acetylcholine and noradrenalin on action potentials of isolated rabbit sinoatrial and atrial myocytes. *Frontiers in physiology*, **3**, 174.
- Vinogradova, T.M., Lyashkov, A.E., Zhu, W., Ruknudin, A.M., Sirenko, S., Yang, D., et al. (2006) High basal protein kinase A-dependent phosphorylation drives rhythmic internal Ca²⁺ store oscillations and spontaneous beating of cardiac pacemaker cells. *Circulation research*, **98**, 505–14.
- Voss, J., Jones, L.R. and Thomas, D.D. (1994) The physical mechanism of calcium pump regulation in the heart. *Biophysical journal*, **67**, 190–196.
- Vunjak-Novakovic, G., Lui, K.O., Tandon, N. and Chien, K.R. (2011) Bioengineering Heart Muscle: A Paradigm for Regenerative Medicine. *Annu Rev Biomed Eng.*, 245–267.
- Walker, C.A. and Spinale, F. (1999) The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular ...*, 375–382.
- Wang, Y., Mehta, P.P., Rose, B., Rose, B. and Rose, B. (1995) Inhibition of glycosylation induces formation of open connexin-43 cell-to-cell channels and phosphorylation and triton X-100 insolubility of connexin-43. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 26581–26585.
- Wang, H.-Z. and Veenstra, R.D. (1997) Monovalent Ion Selectivity Sequences of the Rat Connexin43 Gap Junction Channel. *The Journal of General Physiology*, **109**, 491–507.
- Weber, A. and Murray, J.M. (1973) Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiological reviews*, **53**, 612–673.
- Weber, A., Pennise, C.R., Babcock, G.G. and Fowler, V.M. (1994) Tropomodulin caps the pointed ends of actin filaments. *Journal of Cell Biology*, **127**, 1627–1635.
- Wei, C.J., Francis, R., Xu, X. and Lo, C.W. (2005) Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 19925–19936.
- Widmaier, E.P., Raff, H. and Strang, K.T. (2007) *Vander's Human Physiology - The Mechanisms of Body Function*, 11th ed. McGraw-Hill.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, a, Guldenagel, M., et al. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*, **383**, 725–737.
- Woodcock, E.A. and Matkovich, S.J. (2005) Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **37**, 1746–1751.
- World Health Organization. (2014) Global Status Report On Noncommunicable Diseases 2014.

- Ye, K.Y. and Black, L.D. (2011) Strategies for tissue engineering cardiac constructs to affect functional repair following myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **4**, 575–591.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. and Shibata, M. (2010) alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology*, **12**, 533–542.
- Yue, L., Feng, J., Li, G.R. and Nattel, S. (1996) Characterization of an ultrarapid delayed rectifier potassium channel involved in canine atrial repolarization. *The Journal of physiology*, **496** (Pt 3, 647–662.
- Yue, L., Wang, Z., Rindt, H. and Nattel, S. (2000) Molecular evidence for a role of Shaw (Kv3) potassium channel subunits in potassium currents of dog atrium. *The Journal of physiology*, **527 Pt 3**, 467–478.
- Yusuf, B., Gopurappilly, R., Dadheech, N., Gupta, S., Bhonde, R. and Pal, R. (2013) Embryonic fibroblasts represent a connecting link between mesenchymal and embryonic stem cells. *Development Growth and Differentiation*, **55**, 330–340.
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L. and Geiger, B. (2004) Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions*, **32**, 416–20.
- Zak, R. (1974) Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circulation research*, **35**, suppl II:17–26.
- Zamir, E. and Geiger, B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, **114**, 3583–90.
- Zhang, Q., Jiang, J., Han, P., Yuan, Q., Zhang, J., Zhang, X., et al. (2011a) Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell research*, **21**, 579–587.
- Zhang, B., Xiao, Y., Hsieh, A., Thavandiran, N. and Radisic, M. (2011b) Micro- and nanotechnology in cardiovascular tissue engineering. *Nanotechnology*, **22**, 494003.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rudolf Merkel danke ich für die Bereitstellung und die Nutzung der Labore im ICS-7 des Forschungszentrum Jülich und die hilfreichen Gespräche zu physikalischen und mathematischen Fragestellungen. Vielen Dank für Ihr Vertrauen und die Möglichkeit an Ihrem Institut zu arbeiten. Ihr Lob hat mir stets viel bedeutet.

Besonders danke ich meinen beiden Doktorvätern Herrn Prof. Dr. Dieter O. Fürst und Herrn PD Dr. Bernd Hoffmann für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Bernd, du hast mir so viele Türen geöffnet. Dir verdanke ich die letzten fünf Jahre meines wissenschaftlichen Werdegangs.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Kevin (Kit) Küpper für die Vorarbeiten zur Etablierung des Messsystems und die Entwicklung der zytoskelettalen Strukturanalysen. Du hast mir die Power von ImageJ nahegebracht.

Des Weiteren möchte ich Herrn Nico Hampe für die Lithographie der verwendeten Siliziumwafer und die Kalibrierung der Silikonkautschuk-Mischungen danken.

Herrn Dr. Ronald Springer und Herrn Georg Dreissen danke ich für die Hilfe bei MatLab Fragen.

Frau Dr. Agnes Csiszar und Herrn Tobias Braun danke ich für die Unterstützung bei der Herstellung der Fusionsliposomen und ihre Ausdauer bei der Einweisung in die Durchflusszytometrie.

Herrn Wolfgang Rubner danke ich für die Bestellungen dringend benötigter Materialien auch mal außerhalb der Reihe.

Besonders liegt mir der Dank an meinem Büronachbarn Herrn Dr. Erik Noetzel-Reiss am Herzen. Ich hege großen Respekt vor deiner Person als Wissenschaftler und bin zudem froh, dich zu meinen Freunden zählen zu dürfen. Ich danke dir für die vielen wichtigen und lustigen Momente, die ich mit dir teilen durfte und für deine Unterstützung in schwierigen Zeiten. Ich wünsche mir, dass wir dies auch weiterhin aufrecht erhalten werden.

Gleiches gilt für Herrn Nils Hersch. Du bist die Zuverlässigkeit in Person und ein guter Freund, für den ich auch in allen zukünftigen Wohnsitzen den Keller freibuddeln würde.

Darüber hinaus danke ich Herrn Olli Schulz und Herrn Jan Böhmermann für ihre Radiosendung, die mir im letzten Jahr das Pendeln kurzweilig gestaltet und in der Schreibphase dieser Arbeit das abendliche Abschalten ermöglicht hat.

Großer Dank an Herrn Stephan B. für mein Äpfelchen, auf dem nach anfänglichen Schwierigkeiten der Großteil dieser Arbeit entstanden ist.

Tausendfacher Dank gilt meiner Freundin Sarah und ihrer Familie, die mich stets unterstützt und motiviert haben. Danke für alles was ihr je für mich getan habt.

Sarah, du bist der wundervollste Mensch, den ich kenne. Ich danke dir für alles, was wir in den letzten sechs Jahren gemeinsam erlebt haben. Danke, dass du immer da bist und zu mir hältst. Danke für dein Verständnis in schwierigen Zeiten und deine Unterstützung in allen Lebenslagen. Ich bin unsagbar froh, dass wir uns haben und freue mich auf eine Zukunft mit dir. Du machst mich sehr glücklich. Rockstar-Mode: ON!

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Danke für die glückliche Kindheit und für die Kraft, die ihr mir in den letzten Jahren verliehen habt. Ihr habt mir geholfen, an meinen Aufgaben zu wachsen und zu dem Menschen zu werden, der ich jetzt bin.

Ich trage euch ewig in meinem Herzen.